

PPGCF UFPI
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas



ISSN 2237-7387



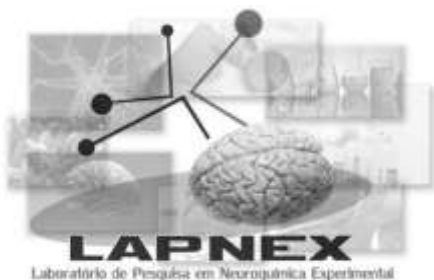
Volume 5 - Suplemento 1

Boletim Informativo

Geum

*Anais do I Workshop de
Projetos & Dissertações*

Teresina, Piauí
Outubro/2012



I Workshop de Projetos e Dissertações

Anais do Workshop

Autorizamos a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

A exatidão das referências, a revisão gramatical e as ideias expressas e/ou defendidas nos textos são de inteira responsabilidade dos autores.

BOLETIM INFORMATIVO GEUM. Teresina, PI, 2012. Volume 5, suplemento 1, out, 2012.

105p.

ANAIS DO I WORKSHOP DE PROJETOS E DISSERTAÇÕES. Sean Telles Pereira, Rivelilson Mendes de Freitas, Lívio César Cunha Nunes (orgs.)

I WORKSHOP DE PROJETOS E DISSERTAÇÕES

COORDENAÇÃO GERAL

Profa. Dra. Cleide Maria da Silva Leite

COORDENAÇÃO CIENTÍFICA

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

COMISSÃO CIENTÍFICA

Prof. Dr. Alexandre Araújo de Souza

Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante

Profa. Dra. Antonia Maria das Graças Lopes Cito

Prof. Dr. Benedito Borges da Silva

Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa

Profa. Dra. Cleide Maria da Silva Leite

Profa. Dra. France Keiko Nascimento Yoshioka

Prof. Dr. Giovanny Rebouças Pinto

Profa. Dra. Grazielle Roberta Freitas da Silva

Profa. Dra. Hercília Maria Lins Rolim Santos

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

Prof. Dr. Livio César Cunha Nunes

Profa. Dra. Maria das Graças Freire de Medeiros

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

Profa. Dra. Roseli Farias Melo de Barros

Prof. Dr. Sidney Gonçalo de Lima

COMISSÃO ORGANIZADORA

Mestranda Antonia Amanda Cardoso de Almeida

Mestrando Antonio Luiz Gomes Junior

Mestranda Giselle Zayra da Silva Oliveira

Mestranda Juliana Lima Nascimento

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

Graduando Rusbene Bruno Fonseca de Carvalho

AVALIADORES DE PÔSTERES

Ciências da Vida

Prof. Dr. André Luis Menezes Carvalho

Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira

Prof. Dr. Francisco de Assis Oliveira

Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida

Prof. Dr. Stanley Juan Chavez Gutierrez

Ciências da Saúde

Profa. Msc. Amanda Torres Nunes

Profa. MSc. Daniela Moura Parente

Prof. Dr. Fabricio Ibiapina Tapety

Profa. Dra. Lucielma Salmito Soares Pinto

Profª. Ms. Maria Regilda de Araújo Fernandes

Profa. Dra. Regilda Saraiva dos Reis Moreira Araújo

Ciências da Natureza

Profa. MSc. Carla Solange de Melo Escorcio

Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho

Prof. Dr. Janildo Lopes Magalhães
Profa. Dra. Mariana Helena Chaves
Profa. Dra. Mônica Regina Silva de Araújo

PROGRAMAÇÃO

Dia 30/10/2012

Manhã

8:00 – 8:30 h: Credenciamento

8:30 – 9:00 h: Abertura: Grupo Coral de Trompeste - Maestro Prof. Manuel Mendonça

10:00 – 11:00 h: Palestra de abertura: Aplicações da nanotecnologia na área médica e indústria farmacêutica

Palestrante: Profa. Dra. Carla Eiras

Local: Auditório do Curso de Graduação em Farmácia

10:00 – 11:00 h: Seção de Pôsteres I

1 - Ciências da Vida – CV (CV01 a CV02)

2 - Ciências da Saúde – CS (CS01 a CS03)

3 - Ciências da Natureza – CN (CN01 a CN02)

Local: Pátio do Auditório do Curso de Graduação em Farmácia

11:00 – 12:00 h: Seção de Pôsteres II

1 - Ciências da Vida – CV (CV03 a CV04)

2 - Ciências da Saúde – CS (CS04 a CS05)

3 - Ciências da Natureza – CN (CN03 a CN05)

Local: Pátio do Auditório do Curso de Graduação em Farmácia

Tarde

14:00 – 16:00 h: Seção oral I

Local: Auditório do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica

14:00 – 14:30 h: Ensaio pré-clínicos com epóxi-limoneno: perspectivas de um novo fitomedicamento

Palestrante: Antonia Amanda Cardoso de Almeida

14:30 – 15:00 h: Incremento de solubilidade do fármaco rifampicina por complexo de inclusão e dispersão sólida

Palestrante: Lyghia Maria Araújo Meirelles

15:00 – 15:30 h: Compósitos de paligorsquita/quitosana, obtidos por spray dried para incorporação de mesalazina (5-ASA)

Palestrante: Luis Alberto de Sousa Rodrigues

15:30 – 16:00 h: Métodos de investigação em genotoxicidade em ensaios pré-clínicos de novos fitomedicamentos

Palestrante: Antonio Luiz Gomes Júnior

16:00 – 17:30 h: Seção oral II

Local: Auditório do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica

16:00 – 16:30 h: Nanoencapsulação de um peptídeo isolado da secreção cutânea de rãs: citotoxicidade *in vitro* em células tumorais humanas

Palestrante: José Jauro Lopes de Anchiêta Júnior (Handersom Rodrigues)

16:30 – 17:00 h: Estabilidade de fitocosméticos: ensaios físico-químicos aplicados

Palestrante: Mayara Ladeira Coelho

17:00 – 17:30 h: Estudo fitoquímico de *Platonia insignis* (bacuri) direcionados para o tratamento do Mal de Alzheimer

Palestrante: Patrícia Regia Pereira dos Santos

17:30 – 18:30 h: Espetáculo Teatral: "APARECEU A MARGARIDA" (tragicomédia) - Grupo Mosay de Teatro

Local: Auditório do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica

Dia 31/10/2012

Manhã

8:00 – 10:00 h: Palestra: Biomarcadores de Genotoxicidade na análises de novos fármacos

Palestrante: Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo

Local: Auditório do Curso de Graduação em Farmácia

10:00 – 11:00 h: Seção de painéis IV

1 - Ciências da Vida – CV (CV05 a CV09)

2 - Ciências da Saúde – CS (CS06 a CS07)

3 - Ciências da Natureza – CN (CN06 a CN07)

Local: Pátio do Auditório do Curso de Graduação em Farmácia

11:00 – 12:00 h: Seção de painéis V

1 - Ciências da Vida – CV (CV05 a CV07)

2 - Ciências da Saúde – CS (CS08 a CS10)

3 - Ciências da Natureza – CN (CN08 a CN10)

Local: Pátio do Auditório do Curso de Graduação em Farmácia

Tarde

14:00 – 16:00 h: Seção oral III

14:00 – 14:30 h: Avaliação da atividade antioxidante do 5TIO1 em áreas cerebrais de camundongos

Palestrante: Amanda Campos Fortes (Aldenora Maria X. Rodrigues)

14:30 – 15:00 h: Propriedades ansiolíticas do 5TIO1

Palestrante: Amanda Campos Fortes (Guilherme Antônio L. de Oliveira)

15:00 – 15:30 h: Estudo do potencial antioxidante in vitro e in vivo do extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* spp *punctatum* Cass. (Asteraceae).

Palestrante: Daniella Fernandes de Carvalho

15:30 – 16:00 h: Desenvolvimento de formulação líquida do tipo spray a base de pilocarpina e avaliação da atividade silagoga.

Palestrante: Giuliano André Silva Santos

16:00 – 17:30 h: Seção oral IV

16:00 – 16:30 h: Estudos de Pré-formulação do fármaco dapsona: Avaliação da Estabilidade e Desenvolvimentos de métodos

Palestrante: Mayara Ladeira Coelho

16:30 – 17:00 h: Ensaio pré-clínico de um produto natural para avaliação de seu possível efeito anticonvulsivante: Mecanismo de ação

Palestrante: Talita Mendes de Oliveira (Paula Benvindo Ferreira)

17:00 – 17:30 h: Ensaio pré-clínico de um produto natural para avaliação de seu possível efeito anticonvulsivante: Avaliação do efeito antioxidante

Palestrante: Talita Mendes de Oliveira (Maria dos Remédios Mendes)

17:30 – 18:00 h: ENCERRAMENTO

Local: Pátio do Auditório do Curso de Graduação em Farmácia

SUMÁRIO

	Pág.
Apresentação -----	06
Lista de trabalhos completos aprovados para o I Workshop de Projetos & Dissertações -----	07
Lista de resumos aprovados para o I Workshop de Projetos & Dissertações -----	10
Apresentações orais -----	11
Apresentações em pôsteres -----	40

I WORKSHOP DE PROJETOS E DISSERTAÇÕES

APRESENTAÇÃO

A proposta do “**I WORKSHOP DE PROJETOS E DISSERTAÇÕES**” é divulgar na UFPI e demais instituições superiores do Estado do Piauí os projetos e dissertações em andamento dos Cursos de Pós-Graduação e que abrangem as áreas de Ciências da Vida, Ciências da Saúde e Ciências da Natureza.

O workshop tem como público alvo Alunos de Graduação, Pós-Graduação e Professores Pesquisadores participantes, ou não, dos programas de pós-graduação da UFPI e de outras Instituições de Ensino Superior. Durante o evento projetos e dissertações serão apresentados na forma de banner e oral visando divulgar as atividades de pesquisa realizadas no âmbito da Pós-Graduação da UFPI. Os trabalhos desenvolvidos por alunos vinculados aos Programas de Pós-Graduação serão avaliados por bancas; O objetivo principal é promover a integração ensino-pesquisa entre a UFPI e outras Instituições de forma a incentivar o intercâmbio entre seus pesquisadores e estudantes das instituições participantes.

I WORKSHOP DE PROJETOS E DISSERTAÇÕES

LISTA DE TRABALHOS COMPLETOS

CN01 - Perfil fitoquímico e qualificação da atividade biológica de uma fração isolada de *Bellis perennis*

Autores: Cassio Herbert Santos de Melo; Katrícia Maria Feitosa Cardoso; Thiago Henrique Costa Marques; Rivelilson Mendes de Freitas.

CN02 - Atividade antioxidante in vitro da fração rica em casearinas extraída das folhas de *Casearia sylvestris* Sw

Autores: Éverton José Ferreira de Araújo; Oskar Almeida Silva; Paulo Michel Pinheiro Ferreira; Rivelilson Mendes de Freitas.

CN03 - Avaliação in vivo de um nanocarreador transdérmico contendo fenobarbital na epilepsia induzida por pilocarpina: resultados preliminares e perspectivas

Autores: Kayo Alves Figueiredo; Shirlene Cesário Medeiros; André Luis Menezes Carvalho; Rivelilson Mendes de Freitas.

CN04 - Obtenção do extrato seco otimizado de *Bauhinia forficata* Link por atomização em *spray dryer*

Autores: Paula do Nascimento Batista; Thaisa Cardoso de Oliveira; Maria das Graças Freire de Medeiros; Lívio César Cunha Nunes.

CN05 - Preparo do complexo $(-)$ Borneol β -CD por *spray drying*

Autores: Raiane Moraes Silva; Márcio dos Santos Rocha; Ulisses Nogueira Aguiar; José Couras da Silva Filho; Aldeídia Pereira de Oliveira; Sidney Gonçalo de Lima.

CN06 - Atividades biológicas de derivados sintéticos da riparina

Autores: Luciana Muratori Costa; Geandra Batista Lima Nunes; Paõlla Rodrigues Policarpo; Stanley Juan Chavez Gutierrez; Rivelilson Mendes de Freitas.

CN07 - Análise cromatográfica do complexo OELC β -CD

Autores: Márcio dos Santos Rocha; Sidney Gonçalo de Lima.

CN08 - Ensaios físico-químicos de uma formulação fitocosmética de produto natural

Autores: Mônica Cristiane Soares Mendes; Mayara Ladeira Coêlho; Mirna Luciano de Gois da Silva; Ana Paula dos Santos Correia Lima da Silva; Joselma Sousa Lacerda; José Arimatéia Dantas Lopes; Rivelilson Mendes de Freitas.

CN09 - Complexos de inclusão rifampicina/ciclodextrinas

Autores: Jocélio Felipe Araújo de Sousa Cavalcante; Rhilder Borges Reis; Lyghia Maria Araújo Meirelles; Lívio Cesar Cunha Nunes; Alexandre Araújo de Souza.

CN10 - Obtenção e caracterização de biofilmes à base dos polímeros naturais pectina e goma do cajueiro

Autores: Rosana Mírian Barros Mendes; Itaciara Erliny Maria da Silva Melo; Cleide Maria da Silva Leite; Rivelilson Mendes de Freitas.

CS01 - Monitoramento de alterações nucleares e de enzimas antioxidantes em pacientes com câncer de mama em tratamento FAC e AC

Autores: Antonio Luiz Gomes Júnior; Marcia Fernanda Correia Jardim Paz; Laís Iasmin Soares da Silva; Simone da Costa e Silva Carvalho; André Luiz Pinho Sobral; Rivelilson Mendes de Freitas; Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante.

CS02 - Ensaios pré-clínicos com a ciano-carvona

Autores: Gabriela da Costa Soares; Thallita Castelo Branco de Andrade; Thiago Henrique Costa Marques; Rivelilson Mendes de Freitas.

CS03 - Avaliação da toxicidade reprodutiva do Garcinielliptone FC (GFC) extraído da *Platonia insignis* Mart em ratos Wistar

Autores: Joselma Sousa Lacerda; Mirna Luciano de Gois da Silva; Ana Paula dos Santos Correia Lima da Silva; Mônica Cristiane Soares Mendes; Rivelilson Mendes de Freitas.

CS04 - Avaliação genotóxica da fração hidroalcoólica do babaçu (*Orbinya phalerata* M.) através do teste *Allium cepa* L.

Autores: Laís Iasmin Soares da Silva; Alisson Ferreira Dantas; Antonio Luiz Gonzaga Júnior; Nougá Cardoso Batista; Lívio César Cunha Nunes; Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante.

CS05 - Efeito antioxidante de LCNa: dosagem de nitrito

Autores: Giselle Zayra da Silva de Oliveira; Johanssy da Silva Oliveira; Viviane Pinheiro Alves de Almeida; Lina Clara Gayoso e Almendra Ibiapina Moreno; Natanael Viana Lourenço; Thallita Castelo Branco Andrade; Rivelilson Mendes de Freitas; Hercília Maria Lins Rolim Santos.

CS06 - Atividade antidepressiva do fitol no nado forçado

Autores: Pauline Sousa dos Santos; Thiago Ferreira Lima; Rivelilson Mendes de Freitas; Jéssica Pereira Costa; Damião Pergentino de Sousa.

CS07 - Estudo da toxicidade, em camundongos, tratados com extrato aquoso do pó do mesocarpo de *Orbignya phalerata* Mart

Autores: Priscila de Sousa Vieira; Ana Paula dos Santos Correia Lima da Silva; José Carlos C. Lima da Silva Filho; Lívio César Cunha Nunes; Rivelilson Mendes de Freitas.

CS08 - Fotobiomodulação experimental na prevenção de enfisema pulmonar

Autores: Rafael Leite Dantas; Lívio César Cunha Nunes.

CS09 - Análise fitoquímica qualitativa e avaliação tóxica de frações do mesocarpo do babaçu (*Orbignya phalerata* M.)

Autores: Ronny Petterson dos Santos Araújo; Alisson Ferreira Dantas; Antonio Luiz Gonzaga Júnior; George Lailson da Silva Oliveira; Nougá Cardoso Batista; Lívio César Cunha Nunes; Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante.

CS10 - Toxicidade aguda do estragol em camundongos

Autores: Thallita Castelo Branco de Andrade; Antonio Luiz Gomes Junior; Giselle Zayra da Silva Oliveira; Marcello Holanda de Andrade; Thiago Ferreira Lim; Rivelilson Mendes de Freitas; Sidney Gonçalo de Lima.

CV01 - Ensaio pré-clínico do TG1 isolado do bacuri

Autores: Aldenora Maria Ximenes Rodrigues; Patricia Régia Pereira dos Santos; Joaquim Soares da Costa Júnior; Rivelilson Mendes de Freitas; Chistiane Mendes Feitosa.

CV02 - Avaliação do potencial antioxidante in vitro do nerolidol

Autores: José Damasceno Nogueira Neto; Oskar Almeida Silva; Francisco Rodrigo de Azevedo Oliveira; Damião Pergentino de Sousa; Rivelilson Mendes de Freitas.

CV03 - *Spray-dried*: complexo bacuri e ciclodextrina

Autores: Juliana Lima Nascimento; Antonia Maria das Graças Lopes Citó; Daniel Dias Arcanjo Rufino; Joaquim Soares da Costa Júnior; Márcio dos Santos Rocha; Ytallo Samuel Barros.

CV04 - Pensamento do ciclo de vida e os plásticos

Autores: Elaine Aparecida da Silva; José Machado Moita Neto.

CV05 - Acupuntura auricular no tratamento de pessoas com sintomatologia do estresse

Autores: Lívia Betania da Costa; Nayra Lisbeth Ferreira Lima; Osmar Ferreira da Silva Filho.

CV06 - Análise microbiológica e físico-química da água de uma faculdade particular de Teresina – PI

Autores: Guilherme Antônio Lopes de Oliveira; Aldenora Maria Ximenes Rodrigues; Maiza Lacerda Barbosa; Wallesk Gomes Moreno; Francialza Veras Viana Lopes; Débora de Alencar Franco Costa; Lyssa Cavalcante de Carvalho; Adriana Saraiva dos Reis.

CV07 - Avaliação toxicogenética do fruto Noni (*Morinda citrifolia*)

Autores: Germano Pinho de Moraes; Antonio Luiz Gomes Júnior; Márcia Fernanda Correia Jardim Paz; Simone da Costa e Silva Carvalho; Kátia da Conceição Machado; Débora Cássia Vieira Gomes; Rodrigo Mendes de Carvalho; Alisson Ferreira Dantas; Jaqueline Nascimento Picada; Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante.

CV08 - Efeitos do Garcinielliptone FC da *Platonia insignis* Mart sobre a performance reprodutiva de ratas Wistar

Autores: Mirna Luciano de Gois da Silva; Priscila de Sousa Vieira; Ana Paula dos Santos Correia Lima da Silva; Joselma Sousa Lacerda; Rivelilson Mendes de Freitas.

CV09 - Qualidade microbiológica da água obtida de poços e usada para consumo humano na regional IV de Teresina - PI

Autores: Paulo Renzo Guimarães Júnior; Alan Bruno da Silva Ferreira; Ronaldo Costa.

OR01 - Avaliação da atividade antioxidante do 5TIO1 em áreas cerebrais de camundongos

Autores: Aldenora Maria Ximenes Rodrigues; Amanda Campos Fortes; Antonia Amanda Cardoso Almeida; Pauline Sousa dos Santos; Waldecy de Lucca Junior; Rivelilson Mendes de Freitas; Francisco Jaime Mendonça Júnior; José Lamartine Soares Sobrinho; Monica Felts de La Roca Soares.

OR02 - Compósitos de paligorsquita/quitosana, obtidos por *spray dried* para incorporação de mesalazina (5-ASA)

Autores: Luís Alberto de Sousa Rodrigues; Edson Cavalcanti da Silva Filho; Lívio César Cunha Nunes; Cleide Maria da Silva Leite.

OR03 - Desenvolvimento de formulação líquida do tipo spray a base de pilocarpina e avaliação da atividade silagoga

Autores: Giuliano André Silva Santos; Laisa Lis Fontinele de Sá; Lívio César Cunha Nunes.

OR04 - Ensaio pré-clínico de um produto natural para avaliação de seu possível efeito anticonvulsivante: mecanismo de ação

Autores: Talita Mendes de Oliveira; Paula Benvindo Ferreira; Rivelilson Mendes de Freitas; Sidney Gonçalves de Lima.

OR05 - Ensaio pré-clínico de um produto natural para avaliação de seu possível efeito anticonvulsivante: avaliação do efeito antioxidante

Autores: Talita Mendes de Oliveira; Rusbene Bruno Fonseca Carvalho; Maria dos Remédios Mendes de Brito; Rivelilson Mendes de Freitas; Sidney Gonçalves de Lima.

OR08 - Estudo do potencial antioxidante in vitro e in vivo do extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* spp *punctatum* Cass. (Asteraceae)

Autores: Daniella Fernandes de Carvalho; George Laylson da Silva Oliveira; Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante; Roseli Farias Melo de Barros.

OR09 - Estudo fitoquímico de *Platonia insignis* (bacuri) direcionados para o tratamento do Mal de Alzheimer

Autores: Patrícia Régia Pereira dos Santos; Antonia Amanda Cardoso de Almeida; Rivelilson Mendes de Freitas; Chistiane Mendes Feitosa.

OR10 - Estudos de pré-formulação do fármaco dapsona: avaliação da estabilidade e desenvolvimentos de métodos

Autores: Mayara Ladeira Coêlho; Larissa Araújo Rolim; Pedro José Rolim Neto; José Lamartine Soares Sobrinho.

OR11 - Incremento de solubilidade do fármaco rifampicina por complexo de inclusão e dispersão sólida

Aluno: Lyghia Maria Araújo Meirelles; Jocélio Felipe Araújo de Sousa Cavalcante; Rhilder Borges Reis; Alexandre Araújo de Souza.

OR13 - Nanoencapsulação de um peptídeo isolado da secreção cutânea de rãs: citotoxicidade in vitro em células tumorais humanas

Autores: José Jauro Lopes Anchiêta Júnior; Handerson Rodrigues Silva Lima; Gardênia Carmen Gadelha Militão; Nereide Stela Santos Magalhães; Hercília Maria Lins Rolim Santos.

OR14 - Propriedades ansiolíticas do 5TIO1

Autores: Guilherme Antônio Lopes de Oliveira; Amanda Campos Fortes; Rivelilson Mendes de Freitas; Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior; José Lamartine Soares Sobrinho; Monica Felts de La Roca Soares.

I WORKSHOP DE PROJETOS E DISSERTAÇÕES

LISTA DE RESUMOS

OR06 - Ensaio pré-clínico com epóxi-limoneno: perspectivas de um novo fitomedicamento

Autora: Antonia Amanda Cardoso de Almeida.

OR7 - Estabilidade de fitocosméticos: ensaios físico-químicos aplicados

Autora: Mayara Ladeira Coêlho.

OR12 - Métodos de investigação em genotoxicidade em ensaios pré-clínicos de novos fitomedicamentos

Autor: Antonio Luiz Gomes Júnior.



I Workshop de Projetos e Dissertações

Apresentações orais

OR01 - Avaliação da atividade antioxidante do 5TIO1 em áreas cerebrais de camundongos

Aldenora Maria Ximenes Rodrigues¹ (IC), Amanda Campos Fortes² (PG), Antônia Amanda Cardoso Almeida (PG)¹, Pauline Sousa dos Santos (IC)¹, Waldecy de Lucca Junior (PQ)³, Rivelilson Mendes de Freitas¹ (PQ), Francisco Jaime Mendonça Júnior⁴ (PQ), José Lamartine Soares Sobrinho⁵ (PQ), Monica Felts de La Roca Soares⁵ (PQ).

1. Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.
2. Laboratório de Pesquisa em Cosméticos e Medicamentos do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.
3. Universidade Federal de Sergipe, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Morfologia, Sergipe, Alagoas, Brasil.
4. Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.
5. Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos Correlatos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

* Autor principal

aldenora_amxr@hotmail.com

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Tiofeno. Catalase. Superóxido dismutase. Western blot.

RESUMO

O 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta [b] tiofeno-3-carbonitrila, 5TIO1, é um novo derivado do 2-aminotiofeno com uma promissora atividade farmacológica. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antioxidante do 5TIO1 em diferentes áreas do sistema nervoso central de camundongos. Foram utilizados camundongos Swiss adultos tratados, via intraperitoneal, com Tween 80 0,05% dissolvido em salina 0,9% (grupo controle) e 5TIO1 nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 10 mg kg⁻¹. Os homogenatos cerebrais – hipocampo, corpo estriado, córtex frontal e cerebelo – foram obtidos após 24 h de observação. A atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase, a peroxidação lipídica e o conteúdo de nitrito foram avaliados utilizando métodos espectrofotométricos. Para esclarecer o mecanismo de ação do 5TIO1 sobre o estresse oxidativo, também foi realizado o teste de Western blot para as enzimas superóxido dismutase e catalase. O 5TIO1 diminui a peroxidação lipídica e o conteúdo de nitrito em todas as áreas cerebrais, e aumentou as atividades antioxidantes das enzimas, especialmente, no cerebelo. Os dados do teste de Western blot não demonstraram evidências na upregulation dessas enzimas depois da administração desse composto. Esses dados sugerem que o 5TIO1 pode proteger o cérebro contra danos neuronais, regularmente, observados durante neuropatologias.

INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo tem sido um mecanismo patogênico comum associado a muitos dos principais transtornos psiquiátricos, como a ansiedade, devido à vulnerabilidade oxidativa intrínseca do cérebro (NG et al., 2008). Crescentes evidências sugerem correlação entre o desequilíbrio do mecanismo de defesa antioxidante e a ansiedade (VOLLERT et al., 2011). Portanto, os efeitos benéficos dos antioxidantes contra vários transtornos e doenças induzidas pelo estresse oxidativo têm recebido muita atenção (NIKI, 2010), impulsionando o desenvolvimento de novos fármacos que podem, eventualmente, exercer ações neuroprotetoras (MILITÃO et al., 2010; VAUZOUR, 2012).

O 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta [b] tiofeno-3-carbonitrila, também chamado de 5TIO1, é um novo derivado do 2-aminotiofeno sintetizado por uma reação de duas etapas, partindo da reação de Gewald, seguida pela condensação com 2,6-diclorobenzaldeído (MENDONÇA-JÚNIOR et al., 2011). O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antioxidante do 5TIO1 em diferentes áreas do sistema nervoso central (SNC) de camundongos adultos através da determinação da peroxidação lipídica, do conteúdo de nitrito e da atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (Mn-SOD). Para esclarecer o mecanismo do 5TIO1 sobre o estresse oxidativo para o desenvolvimento de novos fármacos neuropsicoativos, optou-se por realizar o teste de Western blot para as enzimas Mn-SOD e CAT nos homogenatos cerebrais de camundongos após 24 horas de observação.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss, albinos, machos, pesando entre 25 a 30 g, com dois meses de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí. Os animais receberam água e ração tipo pellets (Purina®) com livre acesso e foram mantidos com iluminação controlada (12h de ciclo claro/escuro) e temperatura (25 ± 2 °C). Os protocolos experimentais e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí (nº 031/12).

Tratamento

O 5TIO1 foi fornecido pelo Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas da UEPB. Este foi emulsificado com o veículo – solução de Tween 80 0,05% (Sigma-EUA) dissolvido em solução salina 0,9%. Os animais foram tratados com a substância experimental nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹, via intraperitoneal (i.p.). O grupo controle recebeu veículo em um volume constante de 10 mL kg⁻¹, administrado pela mesma via.

Protocolo experimental

Os animais foram testados durante o período de luz e observados em uma sala fechada com temperatura constante (25 ± 2 °C). Todos os testes foram realizados em dias diferentes, com grupos distintos de animais.

Determinação da peroxidação lipídica e do conteúdo de nitrito

A peroxidação lipídica foi avaliada por meio da determinação dos níveis de TBARS (substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico). Foram preparados homogenatos a 10% (w/v) em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4 para cada área cerebral investigada, grupo controle (n=7) e 5TIO1 0,1; 1,0 e 10,0 (n=7). Os resultados foram expressos em mmol min⁻¹ µg proteína⁻¹. O conteúdo de nitrito nos grupos experimentais, grupo controle (n=7) e 5TIO1 0,1; 1,0 e 10,0 (n=7), foram determinados com base na reação de Griess. Os resultados foram expressos em µM.

Método da determinação da atividade da catalase e superóxido dismutase

Os 10% dos homogenatos de cada área cerebral foram, separadamente, centrifugados (800×g, 20 min), e os sobrenadantes utilizados para ensaio de atividades de superóxido dismutase e catalase. A atividade da catalase foi medida nos grupos experimentais, grupo controle (n=7) e 5TIO1 0,1; 1,0 e 10,0 (n=7), utilizando o princípio básico da medida da velocidade de produção de O₂ e H₂O. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry. Os resultados foram expressos em U µg de proteína⁻¹. Atividade da Mn-SOD nos grupo controle (n=7) e 5TIO1 0,1; 1,0 e 10,0 (n=7) foi testada por meio da taxa de redução do citocromo C pelos radicais superóxidos, utilizando o sistema xantina - xantina oxidase como fonte geradora de radical ânion superóxido (O₂⁻). Os resultados foram expressos em U µg de proteína⁻¹. Uma unidade (U) da atividade da M-SOD corresponde à inibição de 50% da reação do O₂⁻ com o citocromo C. Obteve-se a concentração da proteína.

Western blot

Para o teste de immunoblotting, os homogenatos de cada área cerebral foram misturados com uma solução tampão (roti-Load 1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Alemanha) de acordo com o procedimento do fabricante e, em seguida, tais soluções foram colocadas em banho-maria (95 °C) por 5 min. As proteínas foram separadas utilizando SDS-PAGE (gel de separação de 5 a 25%). A quantidade de proteína foi de 10 Ag. Após a separação, as proteínas foram coradas com Coomassie Brilliant Blue e transferidas para um papel de nitrocelulose, e, em seguida, os sítios de ligações não específicas são saturados com uma solução de bloqueio (Chemicon International, Hofheim, Alemanha). As membranas foram

incubadas durante a noite com os anticorpos primários contra: 1) CAT (polyclonal, UBI, Lake Placid, NY, EUA, 1:1.500) e 2) Mn-SOD (polyclonal, Assayama, Japão, 1:800), seguida de incubação com peroxidase de rábano conjugada com anticorpo secundário (peroxidase de cabra anti-coelho IgG+, Boehringer Mannheim GmbH, Alemanha, 1:1.000). A imunoreatividade foi visualizada usando o sistema de detecção ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido).

Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados obtidos foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste t-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste. Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA), os grupos experimentais foram comparados com o grupo veículo. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estresse oxidativo, representado por uma perda de equilíbrio nas reações de oxidação-redução, pode alterar drasticamente a função neuronal e tem sido relacionado com a ansiedade (NG et al., 2008). Os resultados obtidos para as alterações neuroquímicas observadas após a administração de um composto ansiolítico, 5TIO1, (SABINO, 2011) apoiam fortemente esta correlação.

A Tabela 1 e a Tabela 2 mostram os efeitos do 5TIO1 na peroxidação lipídica e no teor de nitrito, respectivamente, no hipocampo, corpo estriado, córtex frontal e cerebelo de camundongos adultos. As médias dos resultados indicaram uma redução superior a 87% na peroxidação lipídica e conteúdo de nitrito em todas as áreas do cérebro para todas as doses em comparação com grupo de controle ($p < 0,05$). Observa-se também que não houve efeito dose-dependente do 5TIO1 e que sua atividade scavenger (capacidade de neutralizar os radicais livres formando compostos menos reativos) foi, estatisticamente ($p < 0,05$), a mesma em todas as áreas de ambos os ensaios.

Como os níveis de TBARS estão intimamente associados com a peroxidação lipídica (MATSUNAMI et al., 2010), os resultados (Tabela 1) demonstraram que 5TIO1 diminuiu a peroxidação lipídica em todas as áreas do cérebro, indicando sua proteção antioxidante. O conteúdo de nitrito também é um biomarcador fundamental do estresse oxidativo, uma vez que níveis elevados de óxido nítrico e os seus derivados de oxidação, tal como peroxinitrito, podem ser tóxicos, desempenhando um papel importante em doenças neurodegenerativas (ANDERSEN et al., 2004). Os resultados (Tabela 2) mostraram uma diminuição na formação de nitrito após a administração 5TIO1, sugerindo que esta substância pode evitar a formação de ERNS.

Tabela 1. Determinação dos níveis de peroxidação lipídica no hipocampo, corpo estriado, cortex frontal e cerebelo de camundongos adultos tratados com 5TIO1 nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹.

Grupos	TBARS (mmol min ⁻¹ µg proteína ⁻¹)			
	Hipocampo	Corpo estriado	Córtex frontal	Cerebelo
Veículo	1,36 \pm 0,05	1,34 \pm 0,02	1,54 \pm 0,01	1,43 \pm 0,02
5TIO1 0,1	0,13 \pm 0,01 ^a	0,13 \pm 0,01 ^a	0,12 \pm 0,09 ^a	0,13 \pm 0,01 ^a
5TIO1 1,0	0,16 \pm 0,02 ^a	0,16 \pm 0,09 ^a	0,15 \pm 0,02 ^a	0,18 \pm 0,02 ^{a,b}
5TIO1 10,0	0,15 \pm 0,09 ^a	0,15 \pm 0,09 ^a	0,15 \pm 0,01 ^a	0,17 \pm 0,01 ^{a,b}

Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de animais utilizados nos experimentos (n=7 por grupo). ^a $p < 0,001$, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste t-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste); ^b $p < 0,001$, quando comparados ao grupo 5TIO1 0,1 (ANOVA e teste t-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste).

Tabela 2. Determinação do conteúdo de nitrito no hipocampo, corpo estriado, cortex frontal e cerebelo de camundongos adultos tratados com 5TIO1 nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹.

Grupos	Nitrito (µM)			
	Hipocampo	Corpo estriado	Córtex frontal	Cerebelo
Veículo	95,86 \pm 2,89	94,71 \pm 1,27	76,57 \pm 0,65	82,43 \pm 0,75
5TIO1 0,1	5,11 \pm 0,44 ^a	6,00 \pm 0,69 ^a	6,49 \pm 0,75 ^a	6,93 \pm 0,85 ^a
5TIO1 1,0	6,36 \pm 1,03 ^a	4,98 \pm 0,57 ^a	6,19 \pm 1,23 ^a	4,81 \pm 0,54 ^a
5TIO1 10,0	7,14 \pm 0,99 ^a	9,04 \pm 2,47 ^a	8,50 \pm 1,26 ^a	9,04 \pm 1,8 ^a

^a $p < 0,001$, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste t-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste).

Tabela 3. Atividade da enzima catalase no hipocampo, corpo estriado, córtex frontal e cerebelo de camundongos adultos tratados com 5TIO1 nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹.

Grupos	Catalase (U µg de proteína ⁻¹)			
	Hipocampo	Corpo estriado	Córtex frontal	Cerebelo
Veículo	14,22 \pm 0,58	19,35 \pm 0,17	22,51 \pm 0,14	24,61 \pm 0,16
5TIO1 0,1	33,62 \pm 0,95 ^a	20,39 \pm 1,06	15,41 \pm 0,93 ^a	33,62 \pm 0,95 ^a
5TIO1 1,0	35,94 \pm 0,97 ^a	26,36 \pm 1,87	29,91 \pm 2,09 ^{a,b}	35,94 \pm 0,97 ^a
5TIO1 10,0	34,98 \pm 1,22 ^a	30,52 \pm 2,69 ^{a,b}	34,03 \pm 1,25 ^{a,b,c}	34,98 \pm 1,22 ^a

^a $p < 0,001$, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste t-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste); ^b $p < 0,001$, quando comparados ao grupo 5TIO1 0,1 (ANOVA e teste t-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste). ^c $p < 0,001$, quando comparados ao grupo 5TIO1 1,0 (ANOVA e teste t-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste).

Os resultados (Tabela 3) sugerem que pode haver um aumento da atividade da catalase no cerebelo, córtex frontal, estriado e hipocampo, em ordem decrescente, indicando que esta enzima pode exercer, mais especificamente, um papel protetor nas duas primeiras regiões em relação as outras áreas investigadas em animais tratados apenas com veículo. Tratando-se da atividade da superóxido dismutase (Tabela 4), esta foi maior no cerebelo e no corpo estriado, indicando uma melhor atividade dessa enzimas nestas áreas. Portanto, a atividade mais elevada de ambas as enzimas foi observada no cerebelo em animais tratados apenas com veículo.

Tabela 4. Atividade da enzima superóxido dismutase no hipocampo, corpo estriado, córtex frontal e cerebelo de camundongos adultos tratados

com 5TIO1 nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹.

Grupos	Superóxido dismutase (U µg de proteína ⁻¹)			
	Hipocampo	Corpo estriado	Córtex frontal	Cerebelo
Veículo	2,24 ± 0,15	2,64 ± 0,19	2,20 ± 0,03	3,23 ± 0,13
5TIO1 0,1	3,56 ± 0,62 ^a	2,86 ± 0,11 ^a	2,52 ± 0,09 ^a	3,95 ± 0,70 ^a
5TIO1 1,0	3,14 ± 0,16 ^a	2,54 ± 0,34	2,39 ± 0,17 ^a	2,81 ± 0,74
5TIO1 10,0	2,16 ± 0,03	2,42 ± 0,14	2,17 ± 0,13	2,70 ± 0,51

^ap<0,001, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste).

Analisando os grupos tratados com 5TIO1, a maior atividade da catalase (Tabela 3) foi no hipocampo e no cerebelo para a dose de 1 mg kg⁻¹; e no corpo estriado e no córtex frontal para a dose de 10 mg kg⁻¹. A atividade da superóxido dismutase (Tabela 4) foi modulada positivamente pelo 5TIO1 na dose de 0,1 mg kg⁻¹ em todas as áreas do cérebro, especialmente, no hipocampo e no cerebelo. No entanto, não houve alteração significativa para a dose de 10 mg kg⁻¹ quando comparado com veículo e as outras doses. Portanto, não se observou um processo dose-dependente, sugerindo que em doses mais elevadas de 5TIO1 pode haver uma saturação desta atividade enzimática. Além disso, deve-se notar que o 5TIO1 na dose de 1,0 mg kg⁻¹ aumentou a atividade da superóxido dismutase apenas no hipocampo e no córtex frontal, indicando que 5TIO1 exerce seu possível efeito antioxidante pela modulação da Mn-SOD nestas áreas. Como foi mencionado anteriormente, estes resultados inéditos contribuirão significativamente para preencher as lacunas sobre as causas e consequências do estresse oxidativo modulados por compostos derivados do tiofeno.

De modo a confirmar os resultados das atividades enzimáticas (Mn-SOD e CAT) também foi realizado o teste de Western blot. As atividades totais da catalase e da superóxido dismutase não se alteraram após o tratamento com 5TIO1. Portanto, os dados do teste de Western blot não demonstraram evidências para a upregulation dessas enzimas antioxidantes após a administração deste composto. Além disso, estes resultados reforçam a hipótese de que ocorreu apenas um aumento das atividades enzimáticas estudadas, uma vez que não houve alteração no conteúdo de proteína de Mn-SOD e CAT.

CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que 5TIO1 diminuiu os níveis de peroxidação lipídica e do conteúdo de nitrito, e aumentou as atividades das enzimas catalase e superóxido dismutase. Em nosso conhecimento, estes efeitos do 5TIO1 sobre o estresse oxidativo observado no cérebro de camundongos não foram relatados antes. Assim, estes achados podem ter implicações importantes para a compreensão do mecanismo de doenças neurodegenerativas, promovendo novos avanços no desenvolvimento de antiepiléticos, antidepressivos e ansiolíticos mais seletivos.

REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, J.K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature Reviews Neuroscience*, v. 5, S18-S25, 2004.
- MATSUNAMI, T.; SATO, Y.; YUKAWA, M. Antioxidant status and lipid peroxidation in diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. *Physiological Research*, v. 59, p. 97-104, 2010.
- MENDONÇA-JUNIOR, F.J.B. et al. Synthesis and evaluation of the antifungal activity of 2-(substituted-amino)-4,5-dialkyl-thiophene-3-carbonitrile derivatives. *Latin American Journal of Pharmacy*, v.30, p.1492-1499, 2011.
- MILITÃO, G.C.G.; FERREIRA, P.M.P.; FREITAS, R.M. Effects of lipoic acid on oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures. *Neurochemistry International*, v. 56, p. 16–20, 2010.
- NG, F. et al. Oxidative stress in psychiatric disorders evidence base and therapeutic implications. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 11, p. 851-876, 2008.
- NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 49, p. 503-515, 2010.
- SABINO, E. B. Desenvolvimento de sistema de vetorização a base de novo derivado tiofênico. 2011. 122f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.
- VAUZOUR, D. Dietary polyphenols as modulators of brain functions: biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2012, p 1-16, 2012.
- VOLLERT, C. et al. Exercise prevents sleep deprivation-associated anxiety-like behavior in rats: potential role of oxidative stress mechanisms. *Behavioural Brain Research*, v. 224, p. 233-240, 2011.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, à UFPI, ao Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental, Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos, ao Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas por viabilizar essa pesquisa.

OR02 - Compósitos de paligorsquita/quitosana, obtidos por spray dried para incorporação de mesalazina (5-ASA)

Luís Alberto de Sousa Rodrigues^{1*}(PG), Edson Cavalcanti da Silva Filho² (PQ), Lívio César Cunha Nunes²(PQ), Cleide Maria da Silva Leite²(PQ).

1. Universidade Federal do Piauí – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

2. Universidade Federal do Piauí – PIBIC/CNPq

* Autor principal

luisalbertofarma@gmail.com

Palavras-chave: Compósitos; 5-ASA; liberação de fármacos

RESUMO

O uso de biopolímeros e minerais de argila na formação de compósitos com objetivos de mudança no perfil ou local de liberação de drogas tem se apresentado como uma boa estratégia, pois apresentam as propriedades melhoradas em comparação com o uso isolado na preparação de sistemas de liberação modificada de fármacos. A mesalazina (5-Asa) tem sido o fármaco mais utilizado no tratamento padrão da Doença Inflamatória Intestinal (DII), uma variedade de sistemas de liberação do 5-ASA que estão disponíveis e em desenvolvimento, e que inclui formulações orais e retais, as quais têm por objetivo fornecer o fármaco ativo ao cólon e minimizar a absorção sistêmica como. Neste trabalho foi sintetizado um compósito a base de quitosana e atapulgita para promover o carreamento do 5-Asa. O qual foi preparado pela adsorção do fármaco (a concentração do fármaco utilizada foi duas vezes a capacidade de troca catiônica da argila), seguida de lavagens e centrifugação para a retirada da porção de fármaco não adsorvido, posteriormente foi seca por spray-dry e resuspendida em água e adicionada a uma solução de quitosana a 1% e seca por spray-dry. Os resultados obtidos por FT-IR e DSC demonstraram a formação do material compósito, com propriedades intermediárias as

dos constituintes individuais. A análise por DRX demonstrou que a estrutura da atapulgita não sofre mudança significativa quando materiais como a quitosana e o 5-ASA são intercalados na estrutura fibrosa desta argila.

INTRODUÇÃO

Doenças inflamatórias intestinais (DII) possuem sintomas característicos de inflamações crônica e descontrolada, podendo ser classificada como colite ulcerosa (UC) e doença Crohn. O tipo de tratamento padrão a ser usado neste tipo de doença depende da extensão e da gravidade da doença (SANDS, 2000; LAKATOS, FISCHER et al., 2006).

A substância mesalazina (5-ASA) é usada no tratamento padrão de primeira linha para a colite ulcerativa classificada de grau leve a moderada (COHEN, 2006), sendo que pacientes com doença de Crohn podem se beneficiar quando a terapia é utilizada em longo prazo (DURICOVA, PEDERSEN et al., 2010).

Uma variedade de sistemas de liberação do 5-ASA que estão disponíveis e em desenvolvimento, e que inclui formulações orais e retais, têm por objetivo fornecer o fármaco ativo ao cólon enquanto minimiza a absorção sistêmica já que estes são os principais problemas a serem minimizados por tais formulações. O quadro resume as principais abordagens (COHEN, 2006; SANDBORN, 2008; AGUZZI, CAPRA et al., 2010).

Tipos de formulações contendo 5 - ASA cólon-específica

- ✓ Pró-fármacos;
- ✓ Tempo-dependente baseadas no tempo de trânsito gastrointestinal (TGI);
- ✓ pH-dependentes baseadas nas alterações no pH ao longo do TGI;
- ✓ pH e tempo-dependente sistemas, que dependem tanto do pH quanto do tempo;
- ✓ Sistemas dependentes de pressão presentes nas fortes ondas peristálticas no cólon;
- ✓ Polímeros biodegradáveis, que exploram o metabolismo pela microflora do cólon para liberar o fármaco.

Tanto biopolímeros quanto argilas são materiais comumente usados com produtos farmacêuticos, e quando se trata de liberação modificada, às vezes somente um deles não cumpre todos os requisitos requeridos, sendo necessária a preparação de materiais compósitos, os quais apresentam propriedades híbridas entre as propriedades dos constituintes isolados (VISERAS, AGUZZI et al., 2008).

Trabalhos recentes têm mostrado que a síntese de compósitos e nanocompósitos formados a partir de alguns biopolímeros (polissacarídeos) e argilominerais mostraram melhora nas propriedades de liberação controlada (LIU, LIU et al., 2008; WANG, DU et al., 2008; HUA, YANG et al., 2010; KEVADIYA, JOSHI et al., 2011; COJOCARIU, PROFIRE et al., 2012) e de biocompatibilidade e bioadesão (SALCEDO, AGUZZI et al., 2012), além da obtenção de formulações pH-sensíveis (WANG, ZHANG et al., 2009).

Com base nessas premissas é que propomos a obtenção de um compósito de quitosana e paligorkita (PLG) carreando o fármaco Mesalazina (5-ASA). Os compósitos foram caracterizados. Pelas técnicas DRX, DSC.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais

O fármaco 5-ASA foi adquirido com o nome comercial Mesalazina anidra, da Pharmanostra, lote 11114168D. A Quitosana (QUIT) foi cedida pela empresa Polymar, situada em Fortaleza-CE. Na forma de pó e com grau de desacetilação de 90%. A argila utilizada nesse trabalho trata-se da paligorsquita, conhecida comercialmente como atapulgita (PLG) e que foi cedida gentilmente pela empresa Mineração Coimbra Ltda, extraída de uma jazida localizada no município de Guadalupe-PI (BRASIL). Reagentes de grau analítico (acético glacial, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico e água deionizada).

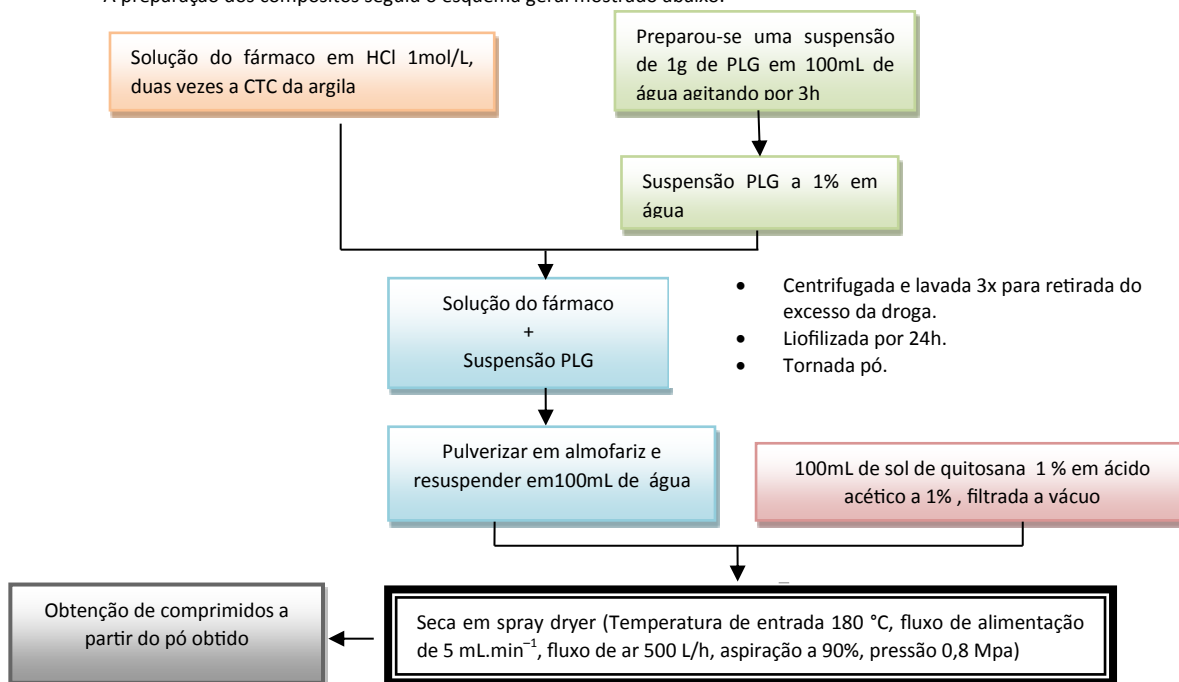
Métodos

Capacidade de troca iônica (CTC)

A CTC da ATPG foi calculada por Silva, M. L. G (2011), e estabelecida como sendo 20 meq/100g..

Preparação do compósito- Esquema geral

A preparação dos compósitos seguiu o esquema geral mostrado abaixo.



Difração de raios X (DRX)

Os difratogramas foram obtidos em difratômetro SIEMENS D-5000, pertencente ao Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV) - UFPI. O equipamento usando ânodo de cobre, efetuou varredura de 2θ variando de 2° a 60° a uma velocidade de digitalização de $0,02^\circ 2\theta/s$.

Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Curvas DSC (2920 TA Instruments) foram obtidas no equipamento da TA Instruments DSC 2920, LAPETRO-UFPI. Os experimentos foram conduzidos em atmosfera de nitrogênio, sob fluxo de 100 mL / min, usando porta-amostra de alumínio hermeticamente fechado, com a massa variando entre 5 e 10 mg. A varredura foi efetuada de 30 a 600°C, em razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A figura 2 mostra as curvas DSC dos compósitos e dos componentes individuais, para fins de comparação. A ATPG mostra a ocorrência de um pico endotérmico próximo a 100 °C, que está associado a de liberação de moléculas de água inseridas na estrutura fibrosa da argila.

Na curva DSC da quitosana observa-se um amplo pico endotérmico, no intervalo de 60-150 °C, sugerindo a ocorrência de desidratação deste biopolímero, seguido por um fenômeno exotérmico que ocorre a partir de 220 °C, sendo que nesta temperatura a cadeia polimérica inicia um processo de decomposição, ou seja, ocorre a queima da cadeia carbônica do polímero (KODAG,S.D 2011).

O 5-Asa apresenta na curva DSC um pico endotérmico estreito em 287 °C, sugerindo a fusão deste fármaco, sendo confirmado na literatura, com pequenas diferença (KODAG,S.D 2011).

A curva do composto PLG/5-Asa se sobrepõe a da PLG, mostrando o perfil majoritário da argila, fato que pode ter ocorrido pela quantidade de argila ser bem maior que a do fármaco.

O compósito Quit/5-Asa mostra no DSC um pico endotérmico próximo a 100 °C, proveniente da desidratação do biopolímero. Um pico endotérmico aparece em 235 °C, sugerindo um processo de fusão.

Observa-se que no compósito a fusão ocorre em temperatura inferior a do 5-ASA, sugerindo a interação entre os dois materiais. O aumento do fluxo de calor em torno de 220 °C mostra o início da decomposição da quitosana.

A formação do compósito Quit/PLG/5-Asa pode ser observada comparando-se o perfil térmico dos constituintes e do compósito. Neste caso a ausência do pico de decomposição, na faixa em que ocorre para o fármaco, ocorrendo em temperatura mais elevada, mostra a interação ocorrida entre os componentes do compósito.

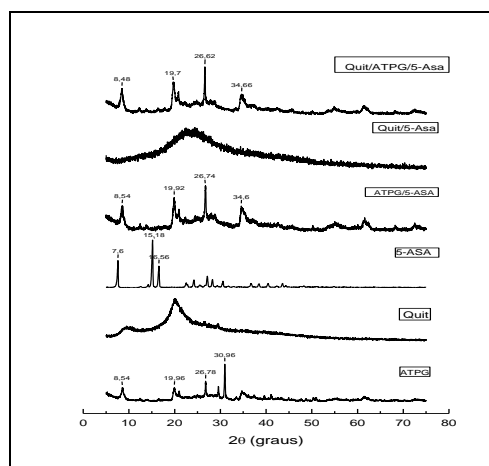
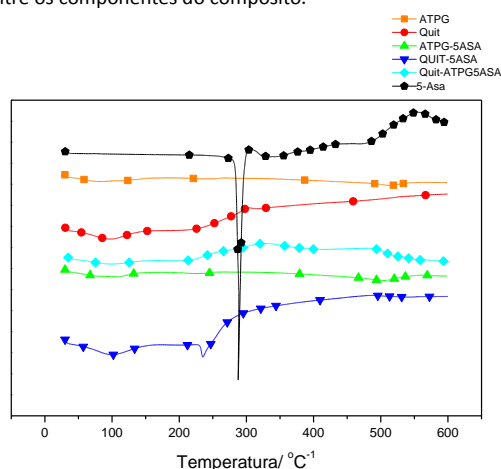


Figura 1- DSC do compósitos e materiais isolados

Figura 2-DRX compósitos e materiais isolados

Difração de Raio x (DRX)

O difratograma dos materiais isolados e dos compósitos estão apresentados na Figura 1. Para a PLG o pico de difração típico ocorre em $2\theta = 8,5^\circ$ (CHENG,H. et al., 2011). O DRX da quitosana em pó mostra picos de cristalitos característicos em torno de $2\theta = 10^\circ$ e 20° estão relacionados ao cristal (1) e ao cristal (2), respectivamente (SAMUELS, 1981; OGAWA K, YUI T et al., 1992). O 5-Asa apresenta picos característicos de cristais em $2\theta = 7,6; 15,18$ e $16,5$. Os compósitos que contém PLG mostram no DRX picos proeminentes na mesma região da Paligorskita natural. Pode-se observar que nestes compósitos ocorre pouca modificação no perfil do DRX, amostras PLG/5-Asa e QUIT/PLG, resultado que pode ser justificado pelo tipo de estrutura cristalina da atapulgita, que exhibe estrutura fibrosa, diferentemente de uma montmorilonita, por exemplo, que mostra estrutura lamelar. Este resultado sugere que a intercalação da quitosana e 5-ASA não alterarem a estrutura da PLG (DENG et al., 2012).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos por DSC demonstra a possível formação do material compósito, com propriedades intermediárias as dos constituintes individuais. A análise por DRX demonstrou que a estrutura da atapulgita não sofre mudança significativa quando materiais como a quitosana e o 5-ASA são intercalados na estrutura fibrosa desta argila.

REFERÊNCIAS

- AGUZZI, C. et al. Chitosan-silicate biocomposites to be used in modified drug release of 5-aminosalicylic acid (5-ASA). Applied Clay Science, v. 50, n. 1, p. 106-111, 2010.
- AGUZZI, C. et al. Use of clays as drug delivery systems: Possibilities and limitations. Applied Clay Science, v. 36, n. 1-3, p. 22-36, Apr 2007.
- CHENG, H. et al. Infrared transmission and emission spectroscopic study of selected Chinese palygorskites. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 83, n. 1, p. 518-524, 2011.
- COHEN, R. D. Review article: evolutionary advances in the delivery of aminosalicylates for the treatment of ulcerative colitis. Aliment Pharmacol Ther, v. 24, n. 3, p. 465-474, 2006.
- COJOCARIU, A. et al. In vitro drug release from chitosan/Cloisite 15A hydrogels. Applied Clay Science, n. 0, 2012.
- DURICOVA, D. et al. 5-Aminosalicylic acid dependency in Crohn's disease: A Danish Crohn Colitis Database study. Journal of Crohn's and Colitis, v. 4, n. 5, p. 575-581, 2010.
- HUA, S. et al. Controlled release of ofloxacin from chitosan-montmorillonite hydrogel. Applied Clay Science, v. 50, n. 1, p. 112-117, 2010.
- KEVADIYA, B. D. et al. Montmorillonite-Alginate Composites as a Drug Delivery System: Intercalation and In vitro Release of Diclofenac sodium. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 72, n. 6, p. 732-737, Nov-Dec 2011.
- KODAG, S. D. Development and Evaluation of Hydrogel Based Microgels for Colon Targeted Delivery of Mesalazine.(Master of Pharmacy). Department of Pharmaceutics, Rajiv Gandhi University of Health Sciences,Karnataka, Bangalore. 2011.

LAKATOS, P. L. et al. Current concept on the pathogenesis of inflammatory bowel disease-crosstalk between genetic and microbial factors: Pathogenic bacteria and altered bacterial sensing or changes in mucosal integrity take "tool"? World Journal of Gastroenterology, v. 12, n. 12, p. 1829-1841, 2006.

LIU, P. Polymer modified clay minerals: A review. Applied Clay Science, v. 38, n. 1-2, p. 64-76, 2007.

OGAWA K; YUI T; M., M. Biosci Biothechnol Biochem Materials Research Bulletin, v. 56, n. 0, p. 858, 1992.

SALCEDO, I. et al. In vitro biocompatibility and mucoadhesion of montmorillonite chitosan nanocomposite: A new drug delivery. Applied Clay Science, v. 55, n. 0, p. 131-137, 2012. ISSN 0169-1317.

SAMUELS, R. J. SOLID STATE CHARACTERIZATION OF THE STRUCTURE OF CHITOSAN FILMS. Journal of polymer science. Part A-2, Polymer physics, v. 19, n. 7, p. 1081-1105, 1981.

SANDBORN, W. J. Oral 5-ASA Therapy in Ulcerative Colitis: What are the Implications of the New Formulations? J Clin Gastroenterol, v. 42, n. 4, 2008. ISSN 0192-0790.

SANDS, B. E. Therapy of inflammatory bowel disease. Gastroenterology, v. 118, n. 2 SUPPL., p. S68-S82, 2000.

VISERAS, C. et al. Biopolymer-clay nanocomposites for controlled drug delivery. Materials Science and Technology, v. 24, n. 9, p. 1020-1026, Sep 2008.

WANG, Q.; ZHANG, J.; WANG, A. Preparation and characterization of a novel pH-sensitive chitosan-g-poly (acrylic acid)/attapulgitite/sodium alginate composite hydrogel bead for controlled release of diclofenac sodium. Carbohydrate Polymers, v. 78, n. 4, p. 731-737, 2009.

WANG, X.; DU, Y.; LUO, J. Biopolymer/montmorillonite nanocomposite: preparation, drug-controlled release property and cytotoxicity. Nanotechnology, v. 19, n. 6, p. 065707, Feb 13 2008.

OR03 - Desenvolvimento de formulação líquida do tipo spray a base de pilocarpina e avaliação da atividade silagoga

Giuliano André Silva Santos^{1*} (PG), Laísa Lis Fontinele de Sá¹ (PG), Lívio César Cunha Nunes¹ (PQ)

1. Universidade Federal do Piauí – Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

* Autor principal

santos.giu@gmail.com

Palavras-chave: Secura da boca. Síndrome de Sjögren. Agonistas colinérgicos. Câncer de Cabeça e Pescoço. Saliva.

RESUMO

A xerostomia tem diversas etiologias, dentre elas síndromes autoimunes, radioterapia e uso de fármacos anticolinérgicos, podendo ocasionar redução da qualidade de vida de muitos pacientes. A conhecida atividade agonista colinérgica da pilocarpina tem sido explorada de diversas formas ao longo dos anos e as pesquisas com o fármaco geraram patentes de produtos para uso no tratamento desse problema. Em busca pelos produtos patenteados com o princípio ativo pilocarpina foram encontradas treze diferentes formulações inovadoras patenteadas, que vão desde comprimidos a formulações líquidas. A forma comercializada no mercado pela Eisai Inc. foi aprovada pelo FDA em 1994 e trata-se da única forma disponível no mercado para uso em xerostomia. Outras formas de aplicação como bioadesivos, chicletes e soluções para gargarejo, embora tenham se mostrado promissoras, não estão disponíveis no mercado. A inexistência da apresentação do tipo Spray contendo a pilocarpina, nas buscas de patentes, além da necessidade de um tratamento de fácil adesão, aquisição e com redução de efeitos colaterais, nortearam o desenvolvimento do trabalho. Para tanto, foram realizados estudos de pré-formulação, desenvolvimento e controle de qualidade. A formulação desenvolvida foi avaliada quanto à capacidade de salivação em ratos adultos, com metodologia de sialometria descrita por Takakura e colaboradores (2009) modificada, resultando em aumento significativo ($p < 0,05$) na salivação comparado à solução oral. Dessa forma, conclui-se que a formulação desenvolvida constitui importante ferramenta para tratamento e auxílio de pacientes que sofrem de xerostomia.

INTRODUÇÃO

A xerostomia é definida como uma sensação subjetiva de secura na boca. Ela ocorre tanto por causa de uma redução na quantidade de saliva produzida quanto por uma mudança em sua composição (BAPTISTA NETO & SUGAYA, 2004; VISVANATHAN & NIX, 2010). Trata-se de um conjunto de sinais e sintomas decorrente de certas doenças ou estímulos diversos, incluindo o efeito secundário de alguns medicamentos (FEIO & SAPETA, 2005; COIMBRA, 2009). Xerostomia crônica compromete a mastigação, deglutição e fala e predispõe a cavidade oral a uma variedade de processos destrutivos que incluem redução, atrofia e ulceração da mucosa e infecções. Todos esses sintomas podem provocar deficiências nutricionais e dificuldades de comunicação e de sono, levando a um declínio geral na qualidade de vida (BERNARDI et al, 2002). As causas mais comuns incluem radioterapia de câncer da cabeça e pescoço, Síndrome de Sjögren e medicações sistêmicas com efeito anticolinérgico (FAVARO, FERREIRA & MARTINS, 2006; VISVANATHAN & NIX, 2010).

A saliva é composta de dois componentes que são secretados por mecanismos independentes: primeiro, um componente fluido que inclui íons, produzido principalmente pela estimulação parassimpática, e segundo, um componente protéico decorrente das vesículas secretoras em ácinos e liberado principalmente em resposta à estimulação simpática. A excitação de ambos os nervos simpáticos ou parassimpáticos para as glândulas salivares estimula a secreção salivar, mas os efeitos dos nervos parassimpáticos são mais fortes e duradouros (SCULLY, 2003; PORTER, SCULLY & HEGARTY, 2004).

Um fármaco parasimpaticomimético que apresenta potente propriedade estimulante muscarínica conhecida é o cloridrato de pilocarpina. Os efeitos farmacológicos deste agente são múltiplos e incluem: aumento do tônus da musculatura lisa e motilidade do trato gastrointestinal, urinário, vesícula biliar, ductos biliares e brônquios. Um aumento notável de saliva e secreção das glândulas sudoríparas é observado com o uso de pilocarpina e estas propriedades são conhecidas na medicina ocidental há mais de 100 anos (BERNARDI et al, 2002).

A pilocarpina é um alcalóide imidazólico exclusivamente encontrado em plantas do gênero *Pilocarpus*. O gênero inclui 17 espécies, das quais quatorze são distribuídas no território brasileiro. Entretanto, apenas duas espécies são cultivadas para produção das folhas de onde se extrai o alcalóide: *P. microphyllus* e *P. jaborandi* (SAWAYA et al, 2011).

Diversos trabalhos utilizando ratos têm demonstrado possíveis mecanismos de ação pelos quais a pilocarpina age sobre a salivação, tendo resultados positivos tanto na avaliação de atividade central (CECANHO et al., 1999; ALMEIDA et al., 2006; TAKAKURA et al., 2009) quanto da atividade local do fármaco, principalmente nas glândulas parótidas (MASUNAGA et al., 1997; OMORI et al., 2003; ASARI, MARUYAMA & KUSAMA, 2009).

Estudos utilizando pilocarpina como princípio ativo no combate a xerostomia têm demonstrado sua eficácia, mas o uso tópico, bucal, ainda não é bem explorado, de tal forma que não há produtos farmacêuticos para esta via disponíveis no mundo. O interesse por esta pesquisa parte da necessidade de se produzir um medicamento para xerostomia de fácil aplicação local contendo cloridrato de pilocarpina, que é um fármaco extraído das folhas de *jaborandi* no Piauí.

MATERIAL E MÉTODOS

Prospecção

Foi realizada tendo como base os pedidos de patente depositados nos bancos de dados do European Patent Office (ESPACENET), World Intellectual Property Organization (WIPO), United States Patent and Trademark Office (USPTO) e Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) do Brasil. Foram analisadas todas as patentes referentes à pilocarpina, dando enfoque, entretanto, ao uso desta em preparações farmacêuticas desenvolvidas para tratamento da xerostomia. O estudo foi feito utilizando as palavras chaves Pilocarpin*, Xerostom*, Saliv* e Mouth* (boca), efetuando a busca exclusivamente em títulos e resumos. Foram descartadas as patentes de mesmo título e autor, em que o número referente à mesma encontrava-se apenas diferenciado, considerando apenas o primeiro depósito.

Desenvolvimento da formulação spray

Foram escolhidos inicialmente os excipientes, determinando-se a capacidade destes em promover maior tempo de ação para o fármaco e melhorar a viscosidade, o sabor e aroma da formulação. O cloridrato de pilocarpina (princípio ativo) foi obtido da empresa Vegeflora Extrações do Nordeste Ltda. Foram avaliados os seguintes parâmetros: características organolépticas; pH (em equipamento da marca "Hanna Instruments", modelo PH21); densidade (segundo métodos gerais da Farmacopéia Brasileira, com auxílio de picnômetro com capacidade de 5 mL); volume de aspersão (50 pressionadas na válvula do frasco, direcionado para proveta graduada, com medição do volume correspondente); edoseamento (High-performance Liquid Chromatography (HPLC) ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, que envolve detector do tipo Ultravioleta (UV), comprimento de onda de 215 nm e coluna 125-4 LichroCART Superspher 100 RP-18 endcapped, 4 µm), segundo metodologia descrita pela Farmacopeia Americana (USP, 1999).

Sialometria

Ensaio pré-clínicos foram realizados utilizando ratos machos Wistar, provenientes do Biotério do Centro de Ciências Agrárias da UFPI, com três meses de idade e peso variando entre 270 e 290 g. Esses ensaios envolveram a metodologia de sialometria descrita por Takakura e colaboradores (2009), em que concentrações correspondentes às doses de 2, 4 e 14 µmol/kg da pilocarpina foi inserida em uma formulação em spray (teste) e numa formulação oral (padrão), mimetizando a comparação entre a formulação desenvolvida e a formulação atualmente disponível no mercado (Salagen®). Foram utilizados 56 ratos, divididos em oito grupos. Em dois grupos administraram-se placebo com apenas os veículos das formulações padrão (água) e teste (spray base sem pilocarpina), respectivamente. Em três grupos administraram-se a formulação de solução oral padrão e, em outros três, a formulação de spray teste, em que, para cada tipo de formulação, foram adaptadas as concentrações de pilocarpina para aplicação de doses equivalentes a 2, 4 e 14 µmol/Kg.

O rato foi anestesiado com pentobarbital sódico (40 mg/Kg) i. p. As formulações foram administradas via bucal e após trinta minutos da administração da solução oral padrão ou após dez minutos da administração do spray, introduziu-se na cavidade oral do rato bolas de algodão previamente taradas. As bolas de algodão foram removidas 7 minutos depois e pesadas novamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Prospecção

As patentes encontradas na busca pelo termo pilocarpina referiam-se à ação agonista colinérgica da pilocarpina e seus sais, cloridrato e nitrato, para tratamento de fibromialgias, xerostomia, xerofthalmia, glaucoma, faringite, dentre outros distúrbios fisiológicos. Referiam-se ainda às metodologias de obtenção deste alcalóide a partir de plantas do gênero *Pilocarpus*. Treze patentes tinham por objetivo a aplicação de pilocarpina em pacientes com xerostomia e foram classificadas quanto a forma farmacêutica demonstrando que o principal foco dos pesquisadores foram os comprimidos, dentre os quais os de liberação imediata, de liberação controlada, dispersíveis e bioadesivos.

Mikhail (1980), na primeira patente publicada e de número US4209505-A, patenteou um enxagatário bucal contendo cloridrato de pilocarpina diluído com o objetivo de produzir alívio da secura na boca por período prolongado sem o inconveniente dos efeitos colaterais sistêmicos, pois não havia absorção suficiente do fármaco. Uma formulação de pilocarpina a base de chicletes aromatizados e adoçados com concentração de 0,13 a 0,20% do ativo, patente KR9606319-B1, proporciona melhoria do odor bucal de pacientes que sofrem com xerostomia, além de melhoria na fala decorrente do estímulo da salivagem (LEE et al., 1996), mas não existem formulações comerciais do produto patenteado.

A administração sistêmica de cloridrato de pilocarpina deu origem aos comprimidos, cuja referência no mercado é a marca Salagen® aprovada pela Food And Drug Administration (FDA) para tratamento da xerostomia em 1994 (ROCHA et al., 2006; BRAGA et al., 2009). A dosagem recomendada, entretanto, é de 5 mg repetidas de 3 a 4 vezes no dia, uma tentativa de reduzir os efeitos colaterais percebidos com o uso (LOCKHART et al., 1996).

A formulação de solução de pilocarpina para aplicação através de aspersão, spray, não fora patenteada e partiu-se para seu desenvolvimento.

Desenvolvimento da formulação spray

O melhor veículo obtido para esta apresentação, por suas características organolépticas, foi a mistura de mel (viscosificante e edulcorante), metilparabeno (conservante), propilparabeno (conservante), glicerina (edulcorante e viscosificante), sacarina (edulcorante), ciclamato de sódio (edulcorante), mentol (aromatizante), hidroxipropilcelulose (agente mucoadesivo) e água purificada. Com principal destaque para o agente mucoadesivo. A hidroxipropilcelulose é um polímero bioadesivo que pode ser utilizado como matriz para liberação controlada de fármacos. Dessa forma, sua propriedade mucoadesiva chamou a atenção para os benefícios da formação de um filme na mucosa oral, prolongando os efeitos locais do fármaco sobre as glândulas salivares (ROWE, SHESKEY & QUINN, 2009).

O pH da formulação foi de $3,45 \pm 0,12$, abaixo do pH normal da mucosa oral. O resultado do edoseamento das formulações de 2, 4 e 14 µmol/Kg, realizado por método de HPLC, demonstrou que não houve diferença entre concentração teórica e a obtida experimentalmente e, portanto, não houve interações entre o ativo e os excipientes, tornando a formulação adequada para o fármaco em uso.

Sialometria

A análise estatística demonstrou que entre os placebos da solução oral padrão e do spray teste houve um aumento significativo ($p < 0,05$) da salivagem com o spray em relação a solução de pilocarpina com água, justificável pelas vantagens dadas pelos excipientes da formulação desenvolvida, que funcionam como coadjuvantes no estímulo salivar. Esses excipientes são representados, principalmente, pelo mel e pelo mentol, além de que, o conjunto de todos eles conferem pH adequado para o estímulo salivar reflexo.

A melhor resposta obtida foi para a dose de 4 µmol de pilocarpina por quilograma, e não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as doses de 4 e de 14 µmol/Kg.

CONCLUSÃO

A formulação spray de cloridrato de pilocarpina 4 µmol/Kg apresentou resultados promissores como indutor de salivagem em estudos pré-clínicos, constituindo-se como uma forma farmacêutica mais eficaz em pacientes que sofrem de xerostomia. Um pedido de depósito de patente foi feito junto ao INPI. Estudos clínicos serão realizados para garantir essa aplicação.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. L.; DE LUCA JR, L. A.; COLOMBARI, D. S. A.; MENANI, J. V.; RENZI, A. Damage of the medial preoptic area impairs peripheral pilocarpine-induced salivary secretion. *Brain Research*, v. 1085, p. 144-8, 2006.

ASARI, T.; MARUYAMA, K.; KUSAMA, H. Salivation triggered by pilocarpine involves aquaporin-5 in normal rats but not in irradiated rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 36, p. 531-8, 2009.

BAPTISTA NETO, C.; SUGAYA, N. N. Tratamento da xerostomia em pacientes irradiados na região da cabeça e do pescoço. *Revista Biociências (Taubaté)*, v. 10, n. 3, p. 147-51, 2004.

BERNARDI, R.; PERIN, C.; BECKER, F. Z.; RAMOS, G. Z.; LOPES, L. R.; PIRES, M. Effect of pilocarpine mouthwash on salivary flow. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 35, p. 105-10, 2002.

BRAGA, M. A.; TARZIA, O.; BERGAMASCHI, C. C.; SANTOS, F. A.; ANDRADE, E. D.; GROppo, F. C. Comparison of the effects of pilocarpine and cevimeline on salivary flow. *International Journal of Dental Hygiene*, v. 7, p. 126-130, 2009.

CECANHO, R.; ANAYA, M.; RENZI, A.; MENANI, J. V.; DE LUCA JR, L. A. Sympathetic mediation of salivation induced by intracerebroventricular pilocarpine in rats. *Journal of the Autonomic Nervous System*, v. 76, p. 9-14, 1999.

COIMBRA, F. Xerostomia: etiologia e tratamento. *Revista Portuguesa de Estomatologia e Cirurgia Maxilo-Facial*. v. 50, p. 159-164, 2009.

FÁVARO, R. A. A.; FERREIRA, T. N. R.; MARTINS, W. D.; Xerostomia: etiologia, diagnóstico e tratamento. *Clínica e Pesquisa em Odontologia*, v. 2, n. 4, p. 303-317, 2006.

FEIO, M.; SAPETA, P.; Xerostomia em cuidados paliativos. *Acta Médica Portuguesa*, v. 18, p. 459-466, 2005.

LEE, S.; RYU, H. Chewing gums contg., pilocarpine - can improve salivation, digestion and speaking ability, esp. in old people. *US n. 5571528*, 30 jun. 1994, 05 nov 1996.

LOCKHART, P. B.; FOX, P. C.; GENTRY, A. C.; ACHARYA, R.; NORTON, H. J. Pilot study of controlled-release pilocarpine in normal subjects. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, v. 82, n. 5, p. 517-524, 1996.

MASUNAGA, H.; OGAWA, H.; UEMATSU, Y.; TOMIZUKA, T.; YASUDA, H.; TAKESHITA, Y. Long-lasting salivation induced by a novel muscarinic receptor agonist SNI-2011 in rats and dogs. *European Journal of Pharmacology*, v. 339, p. 1-9, 1997.

MIKHAIL, A. R. Relief of dry mouth conditions - with mouth-wash contg. pilocarpine or its nitrate or hydrochloride. *US n. 4209505*, 03 abr. 1979, 24 jun 1980.

OMORI, Y.; ASARI, T.; MARUYAMA, K.; KUSAMA, H.; KOJIMA, M.; SHIBATA, N. Effects of pilocarpine hydrochloride and cevimeline on submandibular/sublingual salivation in rat xerostomia model produced by X-ray irradiation. *Arzneimittelforschung*, v. 53, n. 5, p. 342-50, 2003.

PORTER, S. R.; SCULLY, C.; HEGARTY, A. M. An update of the etiology and management of xerostomia. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, v. 97, p. 28-46, 2004.

ROCHA, G. M.; ROCHA, M. E. N. Popular use of medicinal plants. *Saúde & Ambiente em Revista*, v. 1, n. 2, p. 76-85, 2006.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 6a ed. London: Royal Pharm. Society of Great Britain, 2009.

SAWAYA, A. C. H. F.; VAZ, B. G.; EBERLIN, M. N.; MAZZAFERA, P. Screening species of *Pilocarpus* (Rutaceae) as sources of pilocarpine and other imidazole alkaloids. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v. 58, p. 471-80, 2011.

SCULLY, C. B. E. Drug effects on salivary glands: dry mouth. *Oral Diseases*, v. 9, p. 165-76, 2003.

TAKAKURA, A. C. T.; MOREIRA, T. S.; COLOMBARI, D. S. A.; DE LUCA JR, L. A.; MENANI, J. V. Activation of α_2 -adrenoceptors in the lateral hypothalamus reduces pilocarpine-induced salivation in rats. *Neuroscience Letters*, v. 450, p. 225-8, 2009.

VISVANATHAN, V.; NIX, P. Managing the patient presenting with xerostomia: a review. *International Journal of Clinical Practice*, v. 64, n. 3, p. 404-7, 2010.

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos as equipes do GEUM e LAPNEX da Universidade Federal do Piauí que nos auxiliaram durante os ensaios.

OR04 - Ensaio pré-clínico de um produto natural para avaliação de seu possível efeito anticonvulsivante: mecanismo de ação

Talita Mendes de Oliveira*¹(PG), Paula Benvindo Ferreira²(IC), Rivelilson Mendes de Freitas¹(PQ), Sidney Gonçalo de Lima¹(PQ).

1. Universidade Federal do Piauí – PPGCF
2. Universidade Federal do Piauí – PIBIC/CNPq

* Autor principal

talita_tmo@hotmail.com

Palavras-chave: Anticonvulsivante. Camundongo. Monoterpeno. p-Cimeno

RESUMO

O efeito anticonvulsivante do p-cimeno, um monoterpeno monocíclico, foi investigado em modelo de epilepsia induzido por pilocarpina. O p-cimeno nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg, foi eficiente em aumentar a latência para primeira crise epilética em 17.83 ± 0.27 , 25.80 ± 0.83 e 31.33 ± 1.89 , respectivamente. p-Cimeno promoveu proteção significativa contra a mortalidade induzida pelo processo convulsivo nas doses de 50 (33,3%), 100 (50%) e 150 (66,7%), respectivamente. Atropina, uma droga de referência de (25 mg/kg) também produziu uma proteção significativa de 100%. Esse monoterpeno também foi capaz de produzir um aumento latência para instalação do estado de mal epilético induzido por pilocarpina nas doses testadas. Atropina, uma droga de referência de (25 mg/kg) também produziu uma proteção significativa de 100%. Esse monoterpeno também foi capaz de produzir um aumento latência para instalação do estado de mal epilético induzido por pilocarpina nas doses testadas. Além disso, nenhum efeito do p-cimeno no modelo de pilocarpina foi bloqueado pelo pré-tratamento com atropina, um antagonista dos receptores muscarínicos. É sugerido que o p-cimeno apresente atividade anticonvulsivante indicando que este monoterpeno possa ter aplicação clínica no tratamento da epilepsia humana, porém precisa ser melhor investigado a modulação de sua atividade anticonvulsivante.

INTRODUÇÃO

Epilepsia é o distúrbio mais comum após o acidente vascular cerebral, com prevalência de 0,5% (BROWNE; HOLMES, 2001). Epilepsias são complexos distúrbios neurológicos e comportamentais resultantes de um aumento da excitabilidade de neurônios colinérgicos em várias regiões do cérebro que podem ser difundidas para vários neurotransmissores (RAUCA et al., 2004). O estado de mal epilético (SE) é uma situação de emergência com menos apreciada e com morbidade e mortalidade substancial que requer tratamento imediato e eficaz. Tradicionalmente, o estado de mal epilético é definido como uma crise epilética única que durando mais de 30 minutos ou crises epiléticas repetidas ao longo de um período de mais de 30 minutos sem intervir na recuperação da consciência (KNAKE; HAMER; ROSENOW et al., 2009).

O modelo experimental largamente utilizado para estudar a fisiopatologia das crises epiléticas e a identificação dos potenciais agentes terapêuticos para o tratamento da epilepsia é uma administração aguda de uma dose elevada de pilocarpina em roedores. Os sistemas de neurotransmissão envolvidos no modelo experimental de epilepsia induzido pela pilocarpina, ainda não estão completamente definidos. Os

diferentes modelos de convulsão em animais são bastante utilizados para estudar a fisiopatologia do processo convulsivo, uma vez que reproduz alterações comportamentais, eletroencefalográficas e neuroquímicas que são semelhantes à epilepsia do lobo temporal em humanos (FREITAS, 2011).

Por outro lado, aproximadamente 70% dos pacientes com epilepsia são bem controlados por monoterapia com drogas antiepilépticas disponíveis no momento. Outras 5-10% dos pacientes são estabilizados pela adição de outra droga antiepiléptica, mas permanece mais de 20% dos pacientes cuja crise epiléptica não é controlada. Portanto, fitomedicamentos podem potencialmente desempenhar um papel importante no desenvolvimento de novas drogas antiepilépticas aos pacientes farmacoresistentes (QUINTANS-JUNIOR et al., 2008). Desta forma estudos anteriores utilizando alguns monoterpenos como citrionelol (DE SOUSA et al., 2006), α , β -epóxi-carvona (DE SOUSA et al., 2007a), α -terpineol (DE SOUSA; QUINTANS; ALMEIDA et al., 2007b), e isopulegol (SILVA et al., 2009), presente em alguns óleos essenciais, possuem atividade anticonvulsivante em estudos realizados em animais. O p-cimeno definido como 1-isopropil-4-metilbenzeno é um monoterpeno aromático biosintético de fórmula molecular C₁₀H₁₄, precursor do cravacol e largamente presente entre os óleos essenciais, sendo o constituinte majoritário em várias espécies vegetais como 83,75% em *Origanum saccatum*, 53,07% em *Origanum solymicum* e 44,13% em *Thymus vulgaris* (POULOSE; CROTEAU, 1978; ADAMS, 2007). Além disso, o p-cimeno vem sendo alvo de estudos em outros trabalhos como atividade antinociceptiva (SANTANA et al., 2011), antibacteriana (BAGAMBOULA; UYTENDAELE; DEBEVERE et al., 2004), antifúngica, herbicida (KODALI et al., 2008), antileishmania (DE MEDEIROS et al, 2011) e ação na anticolinesterase (ÖZTÜRK, 2012).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anticonvulsivante do p-cimeno em modelo de convulsão em camundongos induzido por pilocarpina.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, adultos com 2 meses de idade, com peso variando de 25-30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Durante todos os experimentos, os animais foram mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo de 12h claro/escuro) e temperatura (25 ± 2 °C), recebendo ração padrão do tipo Purina e água ad libitum. Os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados e uso de animais de laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (EUA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI (nº 038/2009).

Drogas Administradas

As drogas utilizadas nesse trabalho, hidrocloreto de pilocarpina, p-cimeno, atropina e monooleato de polioxietileno-sorbitan (Tween 80) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. St. Louis., (USA). Todos foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) dissolvidas em Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% em um volume final de 0,1 mL para cada 10g de peso do animal.

Método

Os animais com peso variando entre 25–30g foram divididos em cinco grupos (n=12 por grupo). O primeiro grupo foi usado como controle e recebeu o veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em uma solução salina de 0,9%), o segundo grupo foi tratado com cloridrato de pilocarpina 400 mg/kg (P400) via intraperitoneal, os demais foram tratados com p-cimeno (CIM) nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg, trinta minutos após administração das drogas os camundongos foram tratados com pilocarpina 400 mg/kg (i.p) e observados quanto comportamento como os movimentos estereotipados, movimentos tônico e clônico, crise epiléptica tônico-clônico, o período de latência para primeira crise convulsiva, latência para desenvolvimento de mal epiléptico e a taxa de sobrevivência dos animais (FREITAS, 2009).

Em outro momento, 30 minutos após a administração do veículo, p-cimeno 150 mg/kg e atropina 25 mg/kg, os animais receberam dose de pilocarpina 400 mg/kg (i.p.) e foi observado durante 1 hora para detectar a latência de instalação da crise epiléptica (LCP), latência de estado de mal epiléptico (LEP), ocorrência de crise epiléptica e o número de animais sobreviventes após a administração de pilocarpina. Atropina 25 mg/kg, p-cimeno 150 mg/kg e atropina 25 mg/kg + p-cimeno 150 mg/kg foram usados como drogas de referência.

Em outro grupo com 12 camundongos foram tratados com atropina e após 15 minutos administrado com p-cimeno 150 mg/kg e depois de 30 minutos a pilocarpina foi administrada em cada animal. Os animais foram observados novamente em relação aos parâmetros de LCP, LEP e o número de animais que apresentaram crises epilépticas e os sobreviventes.

Análises Estatísticas

Os dados foram avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste t-Student-Neuman-Keuls como post hoc teste ($p < 0,05$). O número de animais que apresentaram crises convulsivas e o número de sobreviventes foi calculado como porcentagens (porcentagem de crises epilépticas, porcentagem de estado de mal epiléptico e a taxa porcentagem de sobrevivência, respectivamente) e comparados com um teste não paramétrico (χ^2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As crises epilépticas decorrente do tratamento com pilocarpina, em doses convulsivas, parecem depender da ativação dos receptores muscarínicos, podendo envolver o metabolismo dos fosfoinositídeos e é capaz de produzir lesões cerebrais e alterações comportamentais. A pilocarpina também altera os níveis do neurotransmissor colinérgico e pode produzir alterações em outros sistemas de neurotransmissores [noradrenalina (NA), dopamina (DA), serotonina (5-HT), glutamato e ácido γ -amino-butírico (GABA)], embora pouco se saiba sobre essas alterações (FREITAS, 2011). A injeção subcutânea de pilocarpina (400 mg/kg) produz uma sequência de alterações comportamentais incluindo sinais colinérgicos periféricos, tremores, staring spell, automatismo facial, crises epilépticas límbicas, que se desenvolvem progressivamente dentro de 1-2h em estado de epilepsia (TURKI et al., 1983; FREITAS et al., 2003).

No presente trabalho, os efeitos anticonvulsivantes do p-cimeno foram estudados. O pré-tratamento com p-cimeno, em doses de 50, 100 ou 150 mg/kg não foi capaz de reverter os sinais colinérgicos periféricos, tremores e movimentos estereotipados. Entretanto o composto provocou um aumento dose-dependente na taxa de sobrevivência.

Drogas que atuam sobre o sistema nervoso central podem demonstrar a capacidade de modular as crises epilépticas atenuando e/ou potencializando o estado epiléptico induzido pela pilocarpina. (Freitas, 2011). Estes resultados dos efeitos anticonvulsivantes do p-cimeno demonstraram um indicativo de efeito neuroprotetor ao ser verificado um aumento progressivo no tempo de latência das crises epilépticas e para o desenvolvimento do estado de mal epiléptico induzidas por pilocarpina nos animais. E em relação à taxa de sobrevivência com as drogas atropina e diazepam utilizadas como droga de referência.

No presente trabalho foi verificado que a pilocarpina induziu a primeira crise epiléptica em $7,83 \pm 0,23$ min. Durante os primeiros 3 a 5 minutos após administração de pilocarpina foi observado alterações de comportamento, como sinais periféricos colinérgicos (miose, piloereção, cromodacriorréia, diarreia e movimentos orofaríngeos), movimentos estereotipados (sniffing, grooming e rearing) seguidos de crises epilépticas tônico-clônico e desenvolvimento progressivo dentro de minutos em um estado de mal epiléptico em 100% dos animais estudados ($p < 0,001$) (Tabela 1). Com os animais pré-tratados com p-cimeno em doses de 50, 100 e 150 mg/kg resultaram em alterações comportamentais como sinais colinérgicos periféricos, tremores, cromodacriorréia, automatismo faciais, wet dog shakes e rearing em 100% dos camundongos.

Os efeitos anticonvulsivantes do p-cimeno demonstraram um indicativo de efeito neuroprotetor ao ser verificado um aumento progressivo no tempo de latência das crises epiléticas induzidas por pilocarpina nas doses de 50 (17,83 ± 0,27), 100 (25,80 ± 0,83) e 150 mg/kg (31,33 ± 1,89) em comparação com o grupo P400 (7,83 ± 0,27). Além disso, com o pré-tratamento se observou o aumento em relação no tempo de latência para o desenvolvimento do estado de mal epilético nos animais após as doses de 50 (25,50 ± 0,42), 100 (31,33 ± 1,24) e 150 (35,92 ± 1,81) em comparação com o P400 (15,00 ± 0,42). O efeito de neuroproteção também foi observado em relação à taxa de sobrevivência com as drogas atropina (25 mg/kg) utilizadas como droga de referência.

Foi observado que com a utilização de atropina nos animais com crise epilética induzida por pilocarpina não houve nenhuma alteração no comportamento, nem mesmo quando concomitante ao p-cimeno, entretanto o composto provocou um aumento dose-dependente na taxa de sobrevivência com as doses de 50 (66,67%), 100 (50%) e 150 mg/kg (33,33%) (Tabela 1).

Atropina é um antagonista do receptor muscarínico. As crises epiléticas induzidas pela pilocarpina podem ser bloqueadas por tratamento prévio com atropina, demonstrando o envolvimento do sistema colinérgico em crises epiléticas e estado de mal epilético (BARAK; DUDAI, 1979). Sendo utilizada para avaliar o possível mecanismo de ação anticonvulsivante do p-cimeno. A não alteração do comportamento na crise epilética mesmo concomitante ao p-cimeno, serve como indicativo da ausência de efeito anticonvulsivante pelos receptores colinérgicos muscarínicos.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que o p-cimeno aumentou o tempo de latência para primeira crise epilética e estado de mal epilético, e a taxa de sobrevivência nos animais, confirmando seu efeito antiepilético e neuroprotetor durante as crises epiléticas induzidas por pilocarpina, provavelmente pelo sistema GABAérgico. Além disso, pode ser importante para novas buscas e desenvolvimento de novos agentes antiepiléticos.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P.; Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing. p.141, 2007.
- BAGAMBOULA, C.F.; UYTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. Food Microbiology. v. 21, p. 33–42, 2004.
- BROWNE, T.R.; HOLMES, G.L. Epilepsy. The New England Journal of Medicine. v. 344, n. 15, p. 1145-1451, 2001.
- DE SOUSA, D.P.; NOBREGA, F.F.F.; CLAUDINO, F.S.; DE ALMEIDA, R.N.; LEITE, J.R.; MATTEI, R. Pharmacological effects of the monoterpene α - β -epoxy-carvone in mice. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 17, p. 170-175, 2007a.
- DE MEDEIROS, M.G.F.; DA SILVA, A.C.; CITO, A.M.G.L.; BORGES, A.R.; DE LIMA, S.G.; LOPES, J.A.D. ; FIQUEIREDO, R.C.B.Q. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. Parasitology. v. 60, p. 237-41, 2011.
- DE SOUSA, D.P.; QUINTANS, J.L.; ALMEIDA, R.N. Evaluation of the Anticonvulsant Activity of α -Terpineol. Pharmaceutical Biology, v. 45, p. 69-70, 2007b
- FREITAS, R.M. The evaluation of effects of lipoic acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures. Neuroscience Letters, v. 455, p. 140-144, 2009.
- FREITAS, R.M. Sistemas de Neurotransmissão Envolvidos no Modelo de Epilepsia: Uma revisão de Literatura. Revista Neurociência. v. 19, p.128-138, 2011.
- KNAKE, S.; HAMER, H.M.; ROSENOW, F. Status epilepticus: A critical review. Epilepsy & Behavior. v. 15, p. 10-14, 2009.
- KORDALI, S.; CAKIR, A.; OZER, H.; CAKMAKCI, R.; KESDEK, M.; METE, E.; Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. Bioresource Technology. v. 99, p. 8788–8795, 2008.
- OZTÜRK, M. Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil. Food Chemistry. v. 134, p. 48–54, 2012.
- POULOUSE, A.J.; CROTEAU, R. Biosynthesis of Aromatic Monoterpenes Conversion of λ -Terpinene to p-Cymene and Thymol in *Thymus vulgaris* L. Archives of Biochemistry and Biophysics. v.187, n.2 p.307-314, 1978.
- QUINTANS-JUNIOR, L.J.; ALMEIDA, J.R.G.S.; LIMA, J.T.; NUNES, X.P.; SIQUEIRA, J.S.; OLIVEIRA, L.E.G.; ALMEIDA, R.N.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Plants with anticonvulsant properties – a review. Revista Brasileira de Farmacognosia. v. 18, p. 798-819, 2008.
- RAUCA, C.; WISWEDEL, J.; ZERBER, R.; KEILHOFF, G.; KRUG, M. The role of superoxide dismutase and α -tocopherol in the development of seizures and kindling induced by pentylentetrazol - influence of the radical scavenger α -phenyl-N-tert-butyl nitron. Brain Research. v. 1009, p. 203–212, 2004.
- SANTANA, M.F.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; CAVALCANTI, S.C.H.; OLIVEIRA, M.G.B.; GUMIRÃES, A.G.; CUNHA, E.S.; MELO, M.S. SANTOS, M.R.V.; ARAÚJO, A.A.S.; BONJARDIM, L.R. P-cymene redices orofacial nociceptive response in mice. Revista Brasileira de Farmacognosia. v.8, p. 1138-1143, 2011.
- TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; SCHWARZ, M.; CZUCZWAR, S.J.; KLEINRONK, Z.; TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. Behavioural Brain Research, v. 9, p. 315–336, 1983.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos órgãos de financiamento FAPEPI e CNPq.

OR05 - Ensaio pré-clínico de um produto natural para avaliação de seu possível efeito anticonvulsivante: avaliação do efeito antioxidante

Talita Mendes de Oliveira^{1*}(PG), Rusbene Bruno Fonseca Carvalho²(IC), Maria dos Remédios Mendes de Brito²(IC), Rivelilson Mendes de Freitas³(PQ), Sidney Gonçalo de Lima¹(PQ).

1. Universidade Federal do Piauí – PPGCF
2. Universidade Federal do Piauí – PIBIT/CNPq
3. Universidade Federal do Piauí – Curso de Graduação em Química

* Autor principal

talita_tmo@hotmail.com

Palavras-chave: p-Cimeno. Nitrito. Peroxidase Lipídica.

RESUMO

O p-cimeno (1-metil-4-isopropil-benzeno; CIM) é um monoterpene cíclico, de fórmula molecular C₁₀H₁₄.

Neste trabalho foi realizada a avaliação do potencial antioxidante do p-cimeno em hipocampo de camundongos adultos por meio da determinação dos níveis de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) e conteúdo de nitrito. Camundongos Swiss foram tratados com Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (veículo; i.p., grupo controle), ácido ascórbico 250 mg/kg (i.p., grupo controle positivo, AA 250) e com p-cimeno nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg, (i.p., grupos CIM 50, 100 e 150), respectivamente. Após os tratamentos todos os grupos foram observados durante 24 h. Após esse período os grupos foram eutanasiados com pertobarbital sódico (50mg/kg; i.p) para remoção do encéfalo e dissecação do hipocampo. O tratamento com p-cimeno reduziu significativamente o nível de peroxidação lipídica e conteúdo de nitrito, sugerindo um papel antioxidante in vivo uma vez que foi capaz de reduzir a formação de espécies reativas derivadas do oxigênio e nitrogênio. Portanto, os resultados do presente estudo demonstram que o p-cimeno, apresenta potencial antioxidante in vivo e pode atuar como um agente neuroprotetor cerebral. Esse composto pode constituir uma nova estratégia no desenvolvimento de tratamentos para diversas patologias nas quais o estresse oxidativo desempenha um papel importante em sua fisiopatologia.

INTRODUÇÃO

Existem diversos estudos com substâncias naturais derivadas de plantas para o tratamento de inúmeras patologias (CAMPELO, 2011; ALMEIDA, 2012). Dentre essas patologias merece atenção especial a investigação do potencial antioxidante in vitro (COSTA JÚNIOR et al, 2011; MARQUES; MELO; FREITAS, 2012) e in vivo (COSTA, 2012), uma vez que o estresse oxidativo pode responder pela fisiopatologia de diversas doenças (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010).

Nesse contexto, durante o processo celular de obtenção de energia pode ser gerados compostos chamados espécies reativas derivadas de oxigênio (EROS) que, em demasia, podem causar danos celulares, culminado em um processo denominado de estresse oxidativo. Tal processo resulta no desequilíbrio no estado de óxido-redução a favor da oxidação. Agentes antioxidantes podem diminuir ou prevenir os danos oxidativos nos tecidos humanos produzidos por EROS e Espécies reativas de nitrogênio (ERNS). Dessa forma, pode ser definido como um grupo diverso de moléculas naturais, que podem estar presentes em baixas concentrações, comparativamente às biomoléculas com ação antioxidante (HALLIWELL, 1991).

Entre os monoterpenos, podemos destacar o p-cimeno (1-metil-4-isopropil-benzeno), monoterpeno precursor biológico de carvacrol e um dos principais constituintes do óleo essencial a partir de espécies de *Protium*, com mais de 80% das espécies encontradas na região Amazônica (SIANI, 1999; SANTANA, 2011). Estudos recentes demonstraram que espécies rica em p-cimeno, como *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand, *P. kleinii* Cuatrec., Burseraceae, *Hyptis pectinata* (L.) Poit., Lamiaceae and *Zataria multiflora* Boiss., Lamiaceae, mostram atividade antinociceptiva em roedores (SANTANA, 2011)

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antioxidante do p-cimeno em hipocampo de camundongos adultos tratados de forma aguda por meio da determinação dos níveis de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) e conteúdo de nitrito.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, adultos com 2 meses de idade, com peso entre 25-30g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. As unidades experimentais receberam água e ração padrão tipo Purina ad libitum e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura (25 ± 2 °C). Todos os experimentos foram realizados de acordo com o Manual sobre Cuidados e Uso de Animais de Laboratório, do Departamento dos EUA de Saúde e Serviços Humanos, Washington DC, 1985. Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí (nº 013/2011 CEEA/UFPI).

Tratamento dos grupos experimentais

O p-cimeno foi emulsionado com Tween 80 0,05% (Sigma-EUA) e dissolvido em solução salina 0,9% (veículo). Os 35 animais foram divididos em cinco grupos experimentais. O primeiro grupo foi tratado com veículo 0,01 ml/g (Tween 80 0,05% com salina 0,9%, i.p., grupo controle negativo; n=7). O segundo grupo recebeu ácido ascórbico na dose de 250 mg/kg (controle positivo, i.p., grupo AA 250; n=7). E os outros três grupos foram tratados com p-cimeno (50 e 100, 150 mg/kg, i.p.; grupos CIM 50, CIM 100 e CIM 150, respectivamente; n=7).

Os animais tratados e controles foram divididos em gaiolas contendo no máximo 6 animais e colocados em ambiente reservado, com observação direta durante 24 horas para visualização e registro de possíveis sinais de toxicidade do composto. Após a avaliação dos parâmetros relacionados à toxicidade aguda durante o período de observação, os animais foram submetidos à eutanásia pela administração de pentobarbital sódico (500mg/kg; i.p) para remoção do cérebro e dissecação do hipocampo de ambos os lados para os estudos neuroquímicos: determinação dos níveis de TBARS e conteúdo de nitrito.

Métodos para determinação dos conteúdos de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O grau de peroxidação lipídica foi mensurado por meio da determinação dos níveis de TBARS, método previamente descrito (DRAPER; HADLEY, 1990). Foi preparado o homogenato a 10% (w/v) em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4 com as áreas hipocampais de todos os grupos, veículo (n=7), AA 250 (n=7) e CIM 50, 100 e 150 (n=7). Os resultados foram expressos em nmol de MDA/g de tecido.

Método da determinação do conteúdo de nitrito.

O conteúdo de nitrito nos grupos experimentais, veículo (n=7), AA 250 (n=7) e CIM 50, 100 e 150 (n=7), foram determinados com base na reação de Griess (GREEN; TANNENBAUM; GOLDMAN, 1981). Os resultados foram expressos em mM.

Análises Estatísticas

Todos os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados obtidos foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste t-Student-Neuman-Keuls como post hoc teste. Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA), os grupos experimentais foram comparados com o grupo veículo e com o controle positivo (ácido ascórbico). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A oxidação é um processo metabólico que conduz à produção de energia necessária para atividades essenciais das células. Porém, o metabolismo do oxigênio nas células vivas também conduz à produção de radicais (STIEVEN; MOREIRA; FERRAZ, 2009). Antioxidantes que possam sequestrar esses radicais livres apresentam elevado potencial terapêutico em doenças associadas. Antioxidantes são substâncias capazes de prevenir os efeitos deletérios da oxidação, inibindo o início da lipoperoxidação, sequestrando radicais livres e/ou quelando íons metálicos (SILVA, 2006).

O cérebro produz continuamente EROS, na ausência de um mecanismo de defesa eficiente, estes EROS causam a peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana (CAMPÊLO, 2011). O cérebro é particularmente suscetível à peroxidação devido à presença simultânea de altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados e de ferro (CAMPÊLO, 2011; CASTAGNE, 1999), que é o alvo de danos dos radicais livres.

Diversos métodos são descritos na literatura para avaliação da peroxidação lipídica, como a determinação de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), que é usado para quantificar a peroxidação lipídica que corresponde a um dano na membrana celular

causado pelo estresse oxidativo. Estudos relatam que doenças degenerativas crônicas tais como: doença de Alzheimer, doença de Parkinson, aterosclerose, complicações da Diabetes mellitus, o envelhecimento precoce e outras estejam relacionadas com o estresse oxidativo (SONG, 2007; VICENTINO;MENEZES, 2007). No grupo AA (0,39 ± 0,28) foi verificado uma diminuição significativa de 50,77% na peroxidação lipídica em relação ao veículo (1,24 ± 0,03) no hipocampo de camundongos adultos. Por sua vez, o tratamento com p-cimeno na dose de 50 mg/kg (0,42 ± 0,03), produziu uma redução significativa de 65,54% na peroxidação lipídica quando comparado ao grupo controle.

No entanto, não foi verificada nenhuma alteração significativa em relação ao grupo tratado com AA 250. Também foi detectada uma redução significativa no grupo tratado p-cimeno na dose de 100 mg/kg (0,33 ± 0,01) em comparação aos valores do grupo veículo (73,29%), AA 250 (16,57%) e CIM 50 (22,49%). No grupo que recebeu a dose de 150 mg/kg (0,12 ± 0,01) foi observado uma diminuição significativa em relação ao grupo veículo (89,83%), AC 250 (68,26%), CIM 50 (70,5%) e CIM 100 (61,95%), respectivamente.

O estudo demonstrou que o p-cimeno inibiu de forma proeminente a quantidade de TBARS formado. Dessa forma, esse monoterpeno foi capaz de reduzir os níveis de peroxidação lipídica em todas as doses testadas, indicando uma proteção antioxidante. Vale ressaltar que as doses de CIM 100 e 150 indicou uma proteção antioxidante mais significativa que a produzida pelo ácido ascórbico, composto utilizado como padrão.

Os resultados dos efeitos do p-cimeno no conteúdo de nitrito no hipocampo de camundongos adultos. No grupo AA 250 (53,2 ± 1,88) foi verificado uma diminuição significativa de 32,73% no conteúdo de nitrito em relação ao grupo veículo (79,1 ± 1,88) no hipocampo de camundongos adultos.

Por sua vez, o tratamento com p-cimeno na dose de 50 mg/kg (22,79 ± 1,29), produziu uma redução significativa de 71,21% quando comparado ao grupo veículo e 57,20% ao grupo AA 250. Também foi detectada uma redução significativa no grupo tratado p-cimeno na dose de 100 mg/kg (25,01 ± 1,04) em comparação aos valores do grupo veículo (68,61%) e AA 250 (53,03%). No grupo que recebeu a dose de 150 mg/kg (26,12 ± 1,22) foi observado uma diminuição significativa em relação ao grupo veículo (67%) e AA 250 (50,94%).

No sistema nervoso o NO participa de diversos processos de sinalização e na defesa do tecido contra os agentes patogênicos, mas é também um agente nocivo em excesso, sofre reações oxidativas/reductoras, produzindo (FEITAS, 2009; SUEISHI, 2011). No que se refere ao conteúdo de nitrito os resultados demonstram uma diminuição significativa deste íon em todas as doses testadas, sendo mais significativa que a produzida pelo ácido ascórbico, indicando que o p-cimeno pode ser altamente eficaz contra a formação de espécies reativas derivadas de nitrogênio culminando em um papel neuroprotetor.

CONCLUSÃO

O tratamento com p-cimeno reduziu significativamente o nível de peroxidação lipídica e conteúdo de nitrito, sugerindo um papel antioxidante in vivo uma vez que foi capaz de reduzir a formação de espécies reativas derivadas do oxigênio e nitrogênio. Portanto, os resultados do presente estudo demonstram que o p-cimeno apresenta potencial antioxidante pelos métodos in vivo utilizados. Esse composto pode constituir uma nova estratégia no desenvolvimento de tratamentos para diversas patologias em que o estresse oxidativo desempenha um papel inerente em sua fisiologia. No entanto, mais estudos devem ser realizados a fim de justificar o mecanismo responsável pela atividade antioxidante do p-cimeno.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.A.C.; COSTA, J.P.; CARVALHO, R.B.F.; SOUSA, D.P. ; FREITAS, R.M. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. *Brain research*. v.1448, p. 56-62, 2012.
- CAMPÊLO, L.M.L. Avaliação farmacológica do óleo essencial de Citrus limon (Burm) no Sistema Nervoso Central: Um estudo comportamental, histológico e neuroquímico. 151p. Dissertação de Metrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, 2011.
- CAMPÊLO, L.M.L.; SÁ, C.G.; ALMEIDA, A. A. C.; COSTA, J.P.; MARQUES, T.H.C.; FEITOSA, C. M.; SALDANHA, G.B.; FREITAS, R.M. Sedative, anxiolytic and antidepressant activities of Citrus limon (Burn) essential oil in mice. *Pharmazie*. v.66(8), p. 623-627, 2011.
- CASTAGNE, V.; GAUTSCHI, M.; LEFÈVRE, K.; POSADA, A.; CLARKE, P.G. Relationships between neuronal death and the cellular redox status. Focus on the developing nervous system. *Progress in Neurobiology*. v. 59(4), p.397-423, 1999.
- COSTA JÚNIOR, J.S.; FERRAZ, A.B.F.; FILHO, B.A.B.; FEITOSA, C.M.; CITÓ, A.M.G.L.; FREITAS, R.M.; SAFFI, J. Evaluation of antioxidant effects in vitro of Garcinielliptone FC (GFC) isolated from *Platonia insignis* Mart. *Journal of Medicinal Plants Research*. v. 5(2), p. 293-299, 2011.
- COSTA, D.A. Estudo pré-clínico dos efeitos bioquímicos e farmacológicos da ciano-carvona em camundongos:subsídio para o desenvolvimento de fitomedicamentos.119p. Dissertação de Metrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, 2012.
- DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. v.186, p. 421-431, 1990.
- FREITAS, R.M. The evaluation of effects of lipoic acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures. *Neuroscience Letters*. v.455(2), p.140-144, 2009.
- FREITAS, R.M.; SOUSA, F. C. F.; Vasconcelos, S. M. M.; Viana, G. S. B.; Fonteles, M. M. F. Oxidative stress in the hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus in Wistar rats. *FEBS Journal*. v.272(6), p. 1307-1312, 2005.
- GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S.R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science*. v. 212(4490), p. 56-58, 1981.
- GUTTERIDGE, J.M.C.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v.393(4),p. 561-564, 2010.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *American Journal of Medicine*. v.91(3C), 14S-22S, 1991.
- MARQUES, T.H.C.; MELO, C.H.S.; FREITAS, R.M. In vitro evaluation of antioxidant, anxiolytic and antidepressant-like effect of the *Bellis perennis* extract. *Revista Brasileira Farmacognosia*. v.22(5), p. 1044-1052, 2012.
- SANTANA, M.F.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; CAVALCANTI, S.C.H.; OLIVEIRA, M.G. B.; GUIMARÃES, A.G.; CUNHA, E.S.; MELO, M.S.; SANTOS, M.R.V.; ARAÚJO, A.A.S.; BONJARDIM, L.R. p-Cymene reduces orofacial nociceptive response in mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 21(6), p. 1138-1143, 2011.
- SANTOS, P.S.; COSTA, J.P.; TOMÉ, A.R.; SALDANHA, G.B.; SOUZA, G.F.; FENG, D.; FREITAS, R.M. Oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures is diminished by alpha-tocopherol. *European Journal of Pharmacology*. v.668(1-2), p.65-71, 2011.
- SILVA, D. A.; SILVA, T.M.S.; LINS, A. C.S.; COSTA, D. A.; CAVALCANTE, J. M. S.; MATIAS, W.N.; SOUZA, M.F., Chemical constituents and antioxidant activity of *Sida galheirensis* Ulbr. (Malvaceae). *Química Nova*. v.29(6), p.1250-1254, 2006.
- SIANI A.C.; GARRIDO, I.S.; CARVALHO, E.S.; RAMOS, M.F.S.; Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *Journal of Ethnopharmacology*. v.66(1), p.57-69, 1999.
- SOUZA, W.M.; BREHMER, F.; NAKAO, L.S.; STINGHEN, A.E.M.; SANTOS, C.A.M. Ação da uleína sobre a produção de óxido nítrico em células RAEC e B16F10. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.17(2), p.191-196, 2007.
- STIEVEN, A.C.; MOREIRA, J.J.S.; FERRAZ, C. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. *Eclética Química*.v.34(3),p. 7-16, 2009.

SUEISHI, Y.; HORI, M.; KITA, M.; KOTAKE, Y. Nitric oxide (NO) scavenging capacity of natural antioxidants. Food Chemistry. v.129(3), p.866–870, 2011.

VICENTINO, A.R.R.; MENEZES, F.S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. Revista Brasileira de Farmacognosia. v.17(13), p.384-387, 2007

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos órgãos de financiamento FAPEPI e CNPq.

OR06 - Ensaios pré-clínicos com epóxi-limoneno: perspectivas de um novo fitomedicamento

Antonia Amanda Cardoso de Almeida^{1*}(PG).

1. Universidade Federal do Piauí – PPGCF

* Autor principal

amanda_wxz@hotmail.com

Palavras-chave: Epóxi-limoneno. Fitomedicamento. Pré-clínico.

RESUMO

O uso de plantas medicinais tem sido associado ao fato de ser uma importante fonte para obtenção de moléculas com potencial farmacológico. A pesquisa pré-clínica, tem sido utilizada principalmente com objetivo de: iniciar a avaliação da segurança, tolerabilidade e possível eficácia de novas drogas; estudar o mecanismo de ação de psicofármacos; auxiliar na elucidação dos mecanismos neurobiológicos dos transtornos mentais. Os estudos com modelos animais apesar de suas limitações permitem o estudo da contribuição de um fator em determinado transtorno mental, controlando-se as outras variáveis. Permite também estudar a interação entre as múltiplas variáveis. Considerando-se a característica multifatorial dos transtornos mentais, esta abordagem torna-se extremamente valiosa.

OR7 - Estabilidade de fitocosméticos: ensaios físico-químicos aplicados

Mayara Ladeira Coêlho^{1*}(PG).

1. Universidade Federal do Piauí – PPGCF

* Autor principal

mayaralcoelho@hotmail.com

Palavras-chave: Fitocosméticos. Estabilidade. Ensaios físico-químicos.

RESUMO

A crescente demanda por produtos cosméticos estáveis, seguros e eficazes tem exigido da comunidade científica estudos e utilização de técnicas mais eficientes para determinação da estabilidade dos produtos. O uso de ativos da biodiversidade brasileira levou ao desenvolvimento de inúmeros produtos, nas mais diferentes formas cosméticas, o que dificulta, ainda mais, a padronização de protocolos experimentais para atestar a estabilidade das preparações cosméticas. Embora não exista no Brasil um protocolo que padronize os ensaios a serem realizados para se determinar a estabilidade dos produtos, vários estudos realizados na UFPI e nos meios acadêmicos para determinação da estabilidade de produtos derivados de plantas serão abordados. Dentre eles abordar-se-á ensaios organolépticos, ensaios físico-químicos (pH, viscosidade, densidade, determinação de resíduos secos, teste de centrifuga), ensaios analíticos (identificação e doseamento de ativos) e testes de estabilidade (estabilidade preliminar, acelerada e longo prazo) em produtos fitocosméticos.

OR08 - Estudo do potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo* do extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* spp *punctatum* Cass. (Asteraceae)

Daniella Fernandes de Carvalho^{1*}(PQ), George Laylson da Silva Oliveira²(IC), Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante³(PQ), Roseli Farias Melo de Barros⁴(PQ).

1. Universidade Federal do Piauí – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

2. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí.

3. Universidade Federal do Piauí – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

4. Universidade Federal do Piauí – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

* Autor principal

Email: daniella.fecarvalho@gmail.com

Palavras-chave: *Centratherum punctatum*. Fitoquímica. Toxicidade. Atividade antioxidante. Plantas medicinais.

RESUMO

Centratherum punctatum spp *punctatum* Cass (Asteraceae), popularmente conhecida como perpétua-roxa, é utilizada na medicina tradicional como antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa. Este artigo descreve a investigação fitoquímica, a avaliação da toxicidade e atividade antioxidante no extrato aquoso das folhas de *C. punctatum*. A análise da prospecção fitoquímica do extrato indicou a presença de importantes metabólitos secundários como flavonóides e taninos. A concentração letal média (CL50) do extrato aquoso de *C. punctatum* foi de 3697,57µg/mL quando utilizado o sistema ensaio *Artemia salina*. A atividade antioxidante do extrato foi avaliada utilizando o 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) como sistema de ensaio e evidenciou a capacidade do extrato em reduzir o radical DPPH especialmente na concentração de 1000 µg/mL comparável a rutina.

INTRODUÇÃO

Centratherum punctatum spp *punctatum* Cass (Asteraceae), popularmente conhecida como perpétua-roxa, é utilizada na medicina tradicional como antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa. Recentemente, do óleo essencial das folhas dessa planta foram isolados 59 diferentes compostos, incluindo *centratherina*, uma lactona sesquiterpênica que tem sido apontada como a responsável pelas propriedades farmacológicas citadas (BEVELLE et al., 1981; NISHA et al., 2007; ANI et al., 2008).

Atualmente existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes por serem substâncias que em pequenas quantidades podem prevenir e apresentar alto potencial terapêutico de doenças causadas por radicais livres (NOGUCHI & NIKI, 2000). Os radicais livres de oxigênio são produtos do metabolismo normal das células e estão associados a processos como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídeos de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (HUSSAIN et al., 1987).

Apesar dos relatos acerca das propriedades farmacológicas de *Centrathrum punctatum*, ainda existe a necessidade de mais estudos para averiguar suas atividades biológicas, bem como estudos que relatem suas análises fitoquímicas, bioquímicas, microbiológicas, e especialmente antioxidantes em sistemas *in vitro* e *in vivo*. Diante do exposto, neste trabalho realizou-se a investigação fitoquímica, as possíveis atividades tóxicas de *C. punctatum* em *Artemia salina* e avaliação da atividade antioxidante *in vitro* através do teste do radical livre DPPH.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedimentos experimentais gerais

Todos os solventes e reagentes usados eram analiticamente puros. O reagente Folin-Ciocalteu e a rutina foram adquiridos da Merck, o radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) da Sigma-Aldrich, o ácido gálico da Vetec. As medidas de absorção foram feitas usando espectrofotômetro UVVis Hytachi U-3000.

Material vegetal

Centrathrum punctatum spp *punctatum* Cass. foi coletada e herborizada seguindo-se metodologia proposta por Mori et al. (1989) em Teresina/PI, em junho de 2012. A identificação botânica da espécie vegetal foi realizada pela Profa. Dra. Roseli Farias Melo de Barros e exsiccatas foram depositadas no Herbário Graziela Barroso (TEPB) da Universidade Federal do Piauí.

Preparação dos extratos

Para a preparação do extrato aquoso bruto (EAB), folhas de *C. punctatum* Cass. (71,6 g) foram secas a temperatura ambiente e depois reduzidas a pó. O pó foi exaustivamente extraído por infusão a 80°C por 30 minutos com 500 mL de água destilada. A água foi evaporada até à secagem sob pressão reduzida em evaporador rotativo até obtenção de 14,36 g do EAB (20,06%).

Investigação Fitoquímica

Para a avaliação dos principais grupos fitoquímicos presentes no extrato, foram realizados testes para a detecção de flavonóides, alcalóides, saponinas, taninos (hidrolisáveis e condensados), esteróides/triterpenóides, cumarinas e derivados antraquinônicos, de acordo com a metodologia de Barbosa (2004) e Matos (2009).

Avaliação da toxicidade em *Artemia salina*

A toxicidade sobre *A. salina* foi realizada através da adaptação da metodologia de Meyer et al. (1982), preparando-se uma solução com sal marinho na concentração de 35 g/L. O pH foi ajustado entre 8,0 e 9,0, por meio de solução 0,1 mol/L de NaOH. Esta solução foi utilizada para eclosão dos ovos de *A. salina* e no preparo das demais diluições. Os ovos foram colocados para eclodir na solução salina por 48 horas, com aeração constante a 25 °C. Cerca de dez larvas de *A. salina* foram transferidas para tubos de ensaio contendo a solução salina e amostras a serem testadas, nas seguintes concentrações do extrato aquoso: 50, 100, 150, 250, 500 e 1000 µg/mL. Uma solução de solução salina foi usada para controle negativo. O ensaio foi realizado em triplicata de amostras, sendo a contagem dos animais mortos e vivos realizada após 24 horas com o auxílio de lupas microscópicas. O número de células mortas foi avaliado de acordo com a equação segundo Abbott (1925), sendo a CL50 determinada por análise probística, através do software SPSS 17 com 95 % de índice de confiança.

Atividade antioxidante pelo método do radical DPPH

Foi utilizada a metodologia descrita por Silva et al. (2005) com algumas modificações. Preparou-se uma solução inicial do extrato aquoso das folhas de *C. punctatum* (1000 µg/mL) e dos padrões utilizados (quercetina, rutina e ácido gálico) e realizadas diluições para obtenção de concentrações finais de 1000, 500, 250, 150, 100 e 50 µg/mL. As medidas das absorbâncias das misturas reacionais (0,3 mL da solução da amostra ou do controle positivo e 2,7 mL da solução estoque de DPPH• na concentração de 40 µg/mL), foram realizadas em triplicatas a 517 nm (nanômetros) para o extrato e controles no tempo 30 minutos. Uma mistura de etanol (2,7 mL) e extrato (0,3 mL) foi utilizada como branco (OLIVEIRA et al, 2011).

Os valores de absorbância nas concentrações de 1000, 500, 250, 150, 100 e 50 µg/mL, no tempo de 30 minutos foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA%), determinados pela seguinte equação proposta por Huang et al. (2003) e Tepe e Sokmen (2007):

$$\%AA = \frac{[\text{Abscontrole} - (\text{Absamostra} - \text{Absbranco})] \times 100}{\text{Abscontrole}}$$

onde, Abscontrole é a absorbância inicial da solução etanólica de DPPH e Absamostra é a absorbância da mistura reacional (DPPH + amostra). A concentração eficiente (CE50) do extrato necessária para reduzir o radical DPPH• em 50%, foi determinada por regressão Probit (LOCATELLI et al., 2009).

Os resultados foram analisados estatisticamente, utilizando-se o programa Graphpad Prism 5.0, com análise de variância (ANOVA) e aplicação do teste de Tukey's de múltiplas comparações com significância para valores de significância *** (P<0,001), ** (P<0,01) e * (P<0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo Farnsworth (1966), a triagem fitoquímica é capaz de fornecer a melhor opção de escolha do material a ser estudado e nos dá a possibilidade de adaptar as técnicas de fracionamento de extratos, isolamento e caracterização de substâncias puras, de acordo com os constituintes anteriormente detectados por testes qualitativos. A triagem fitoquímica das amostras das folhas de *C. punctatum* revelou a presença de flavonóides, polifenóis e taninos através dos testes qualitativos, corroborando com os dados apresentados por Arumugam e Pawar (2011), que citaram a presença de flavonóides, taninos e glicosídeos cardiotônicos.

Para Ferguson (2001), compostos polifenólicos, como fenóis e flavonóides são componentes importantes de plantas com significativa atividade antioxidante e uma grande variedade de atividades biológicas, incluindo antibacteriana, anti-inflamatória, analgésica e antialérgica. Estes compostos têm sido indicados em vários estudos como varredores de radicais livres contra íons superóxido e hidroxilas e assim importantes na prevenção de doenças associadas com o dano oxidativo de membranas, proteínas e DNA (OYEDEMI et al., 2010).

Os testes de toxicidade devem ser considerados como uma análise indispensável no biomonitoramento de extratos de plantas. Os valores de CL50 utilizados como referência de trabalhos realizados por Meyer et al., (1982) consideram como tóxicas, substâncias que apresentam valores de CL50 abaixo de 1.000 µg/mL, utilizando o organismo teste *A. salina*. A CL50 do extrato aquoso testado frente à mortalidade de *A. salina* foi estipulada para 3967,57 µg/mL, logo o extrato não apresenta toxicidade frente ao teste realizado.

Segundo Arumugam e Pawar (2011), os flavonóides detectados na triagem fitoquímica das folhas de *C. punctatum* conseguiram inibir o crescimento de bactérias patogênicas e não patogênicas, até mesmo o crescimento de bactérias multi resistentes a diversas drogas como *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus*. Essa atividade de inibição do crescimento e excelente atividade antibacteriana foram atribuídas à presença dos flavonóides e à sua capacidade de complexação com proteínas extracelulares dos microorganismos, muitas vezes levando a inativação das proteínas e sua perda funcional.

Semelhante ao encontrado em experimentos anteriores realizados por Arumugam e Pawar (2011), o extrato aquoso das folhas de *C. punctatum* foi capaz de reduzir o radical DPPH•, através do decréscimo dos valores da absorbância. Na concentração de 1000 µg/mL, o extrato de *C. punctatum* apresentou atividade comparável a rutina, porém não apresentou atividade significativa quando comparado aos controles quercetina e ácido gálico. Os valores da CE₅₀ do extrato aquoso de *C. punctatum*, rutina, quercetina e ácido gálico estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso das folhas de *Centrathium punctatum* ssp *punctatum* Cass. coletados na cidade de Teresina/PI pelo método de redução do radical DPPH•

Amostras	Redução do DPPH [•] (%)						
	Concentração (ug/ml)						
	50	100	150	250	500	1000	CE50
Extrato aquoso	12,53±1,20 b***c***	14,29±0,70 a***b*** c***	16,12±1,29 a***b*** c***	27,14±4,22 a***b***c***	52,16±5,30 a*** b*** c***	83,42±2,18 b*** c***	414,86
Rutina	19,51±4,93	35,37±2,35	51,57±1,72	74,54±3,16	85,04±0,51	87,73±0,51	143,93
Quercetina	63,31±3,00	90,05±0,54	91,43±0,95	91,15±0,24	91,67±0,29	92,22±0,18	7,33
Acido Gálico	90,77±0,83	92,95±0,10	93,19±0,06	93,71±0,15	93,95±0,47	93,78±2,33	0,001

Foi utilizado ANOVA com teste de Tukey para valores de significância *** (P<0,001), ** (P<0,01) e * (P<0,05). Sendo “a” a significância em relação a rutina, “b” em relação a quercetina e “c” em relação ao ácido gálico.

Os compostos fenólicos são eficientes protetores não enzimáticos contra o estresse oxidativo, podendo agir impedindo que os íons de metais de transição iniciem a oxidação, ou inibindo enzimas pró-oxidantes (STASIUK; KOZUBEK, 2010). Em concordância com os achados durante a investigação fitoquímica, o extrato aquoso de *C. punctatum* exibe entre seus principais metabólitos secundários a presença de compostos fenólicos que podem lhe conferir essa atividade protetora contra o estresse oxidativo e possível atividade antioxidante.

CONCLUSÃO

O presente estudo revelou que o extrato aquoso das folhas de *Centrathium punctatum* ssp *punctatum* Cass. coletadas na cidade de Teresina/PI, não apresentou toxicidade frente a *Artemia salina* e evidenciou atividade antioxidante in vitro através de técnicas espectrofotométricas como DPPH na concentração de 1000 µg/mL quando comparado a rutina. A investigação fitoquímica revelou a presença de taninos e compostos polifenólicos, sendo os últimos importantes achados na atividade antioxidante apresentada. Os resultados descritos neste trabalho estimulam a continuidade dos estudos para avaliação da atividade antioxidante de substâncias isoladas de *C. punctatum* e elucidação dos mecanismos de ação das atividades biológicas, subsidiando a segurança da sua utilização etnomedicinal.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, v.18, p.265-267, 1925.
- ANI,V.;NAIDU,A.K. Antihyperglycemic activity of polyphenolic components of black/bitter cummin *Centrathium anthelminticum* (L.) Kuntze seeds. *European Food Research Technology*, v.226, p-897-903, 2008.
- ARUMUGAM, N.; PAWAR, N.K.; Leaf extract of *Centrathium punctatum* exhibits antimicrobial, antioxidant and anti-proliferative properties. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, v. 4, p.71-76, 2011.
- BARBOSA, W.L.R. Manual para Análise Fitoquímica e Cromatografia de Extratos Vegetais. *Revista Científica da UFPA*, v.4, n.5, p. 1-19, 2004.
- BEVELLE, C.A.; HANDY, G.A.; SEGAL, R.A.; CORDELL, G.; FARNSWORTH, N. R. Isocentratherin, a cytotoxic germacrolide from *Centrathium punctatum* (Compositae). *Phytochemistry*, v.20, n. 7, p.1605 – 1607, 1981.
- FARNSWORTH, N.R. Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.55, p. 225-276, 1966.
- FERGUSON, L.R. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, v.475, p.89–111, 2001.
- HUANG,D.J.;OU,B.X.;PRIOR,R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, n.6, p.1841–1856, 2005.
- HUSSAIN,S.R.;CILLAR,J.; CILLARD, P.. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, v. 26, p. 2489-2491, 1987.
- LOCATELLI, M. et al. Study of the DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chemistry*, v. 114, n. 3, p. 889-897, 2009.
- MATOS, F.J.A. Introdução a fitoquímica experimental. 3.ed. Fortaleza: UFC, 2009. 148p.
- MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; McLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, v. 45, n. 15, p. 31-34, 1982.
- MORI, S.A.; SILVA, L.A.M.; LISBOA, G.; CORADIN, L. Manual de manejo do herbário fanerogâmico. Ilhéus, Centro de Pesquisa do Cacau, 1989.
- NISHA, K. M.; PAILY, K.P.; ABIDHA; VANAMAIL, P.; BALARAMAN, K. In vitro screening of medicinal plant extracts for macrofilaricidal activity. *Parasitology Research*, v.100, p 575-579, 2007.
- NOGUCHI, N.; NIKI, E. Forum: Therapeutic Applications of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Human Disease. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 28, p. 1538–1546, 2000.
- OLIVEIRA, G.L.S et al. Evaluation of antioxidant and cytotoxic potential of guabiraba plant extract *Campomanesia lineatifolia* (Myrtaceae). Trabalho apresentado no CIFARP – 8th International Congress of Pharmaceutical Sciences. Anais...Ribeirão Preto-SP, 2011.
- OYEDEMI, S.O.; AFOLAYAN, A.J. Antibacterial and antioxidant activities of hydroalcoholic stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 4, p. 952–958, 2011.
- SILVA, C. G. et al. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. *Pharmacological Research*, v. 52, n. 3, p. 229-233, 2005.
- STASIUK, M.; KOZUBEK, A. Biological activity of phenolic lipids. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.67, p.841–860, 2010.
- TEPE, B.; SOKMEN, A. Screening of the antioxidative properties and total phenolic contents of three endemic *Tanacetum* subspecies from Turkish flora. *Bioresource Technology*, v. 98, p.3076-3079, 2007.

AGRADECIMENTOS

Ao órgão financiador (CAPES) pelo apoio financeiro e pelas bolsas concedidas.

OR09 - Estudo fitoquímico de *Platonia insignis* (bacuri) direcionados para o tratamento do Mal de Alzheimer

Patrícia Régia Pereira dos Santos^{1*} (PG), Antonia Amanda Cardoso de Almeida¹ (PG), Chistiane Mendes Feitosa¹ (PQ), Rivelilson Mendes de Freitas¹ (PQ)

1. Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí.

Patrícia.rpsantos@hotmail.com

Palavras-chave: 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol. Memória. Mal de Alzheimer

RESUMO

Nos países desenvolvidos, a Doença de Alzheimer está em terceiro lugar no pódio das doenças que mais causam morte, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares e para o câncer. Presente estudo teve como objetivo verificar a influência do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) sobre a memória por meio do teste esQUIVA passiva e labirinto aquático de Morris. Os resultados mostram que a administração de TG1 30mg/kg (i.p) influência na aprendizagem e na retenção da memória, aumentando o tempo de latência para descida da plataforma no teste da esQUIVA passiva e diminuindo a latência para encontrar a plataforma no labirinto aquático de Morris. Sugerindo assim o uso do TG1 para o tratamento e/ou prevenção do Mal de Alzheimer.

INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é um processo patológico neurodegenerativo crônico, que ocorre preferencialmente na idade adulta, sendo caracterizada por um início insidioso com deterioração lenta na cognição, perda da memória, capacidade funcional, comportamento e humor (DEL BO et al, 2009; ITO et al, 2010). Alguns estudos mostraram que o hipocampo é essencial para estruturar a memória curta que é reduzida dramaticamente em indivíduos afetados pela doença de Alzheimer (DA). O tratamento mais promissor para a DA é obtido pelo aumento do nível circulante de acetilcolina no cérebro usando inibidores da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) (SERENIKI; VITAL, 2008).

A falta de fármacos empregados para o tratamento e a prevenção da DA, que associem uma alta eficácia e baixos efeitos colaterais, tem estimulado a pesquisa por novos agentes que possam representar uma nova alternativa terapêutica. Portanto, a redução do estresse oxidativo tem sido comprovada como uma estratégia terapêutica para atenuar os eventos neurodegenerativos e a morte neuronal na DA (MOORE e O'BANION, 2002). Visto tudo isso, o presente estudo objetivou verificar a influência do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) sobre a memória em modelos animais específicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados nos ensaios pré-clínicos ratos Wistar, machos, de dois meses de idade, pesando entre 250 - 300 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Os animais receberam água e dieta (Labina®) ad libitum e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (com ciclo claro/escuro de 12 h) e temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí (nº 004/2012).

EsQUIVA Passiva (Passive Avoidance Test)

A esQUIVA inibitória consiste em um aparelho confeccionado em alumínio de 2 mm, com pintura epóxi de alto impacto, chão em barras de aço inoxidável com espaçamento de 12,5 mm, área interna de fuga com 200 mm x 75 mm, porta e frente em acrílico transparente, bandeja coletora de dejetos e urina. O rato é colocado sobre a plataforma no interior de uma caixa com o soaLho metálico conectado a um estimulador elétrico. O rato, como um animal exploratório vai procurar explorar o restante da caixa.

Para o teste de sessão única, os animais foram inicialmente submetidos a uma sessão de treino individual, na qual foram gentilmente colocados sobre a plataforma fixa na lateral esquerda da caixa de esQUIVA inibitória e permitidos explorar toda a caixa. Após alguns segundos, no instante em que o animal desce da plataforma com as quatro patas na grade de barras de bronze eletrificáveis para explorar o resto da caixa, recebe um choque elétrico de 0.4 a 0.5 mA por 2 a 3 segundos. O animal é então retirado da caixa de teste e recolocado na sua caixa residência.

Para avaliar a memória formada durante a sessão treino os animais foram submetidos a sessões de teste, 15 minutos e 24 horas após o treino (para memória de curta e longa duração, respectivamente), quando foram novamente recolocados sobre a plataforma da caixa de esQUIVA. Na sessão de teste foi verificada a latência de descida da plataforma. Quanto mais o animal reter a memória formada durante o treino, maior será a latência de descida da plataforma no momento do teste.

Labirinto Aquático de Morris (Water Maze)

Este teste é usado para se avaliar a memória espacial (Morris, 1984). O labirinto aquático consiste de um tanque de plástico circular (132 cm de diâmetro) e paredes de 40 cm de altura, cheio (até 10 cm da borda) com água (25°C) acrescida de amido de milho (para deixar a água opaca). O aparelho possui uma plataforma de acrílico (15 X 15 X 19) colocada no quadrante noroeste 2 cm abaixo da superfície da água.

Vinte e quatro horas após o término do tratamento com TG-1 e Tween 80 0,05% em salina 0,9%, os animais iniciaram o treinamento. Foram feitos 6 treinos em dois dias consecutivos (aprendizagem) e após 48 horas os animais foram testados para avaliação da memória espacial (retenção). Durante o treino o animal foi colocado em 6 locais diferentes do tanque e teve 54 segundos para achar a plataforma ao final deste tempo, era colocado manualmente na mesma durante 10 segundos e retirado do tanque por 30 segundos. Ao final do segundo dia cada animal recebeu 12 treinos para a aquisição da memória. No quarto dia (48 h após), a plataforma foi removida e os animais colocados no tanque, na posição sudeste (em relação à posição da plataforma). Os animais permaneceram até 60 segundos e o tempo de latência para alcançar o local da plataforma original foi registrado.

Análise estatística

Após a coleta dos dados, os mesmos foram tabulados em planilhas e em seguida analisados estatisticamente, utilizando-se o "Software" GraphPad Prisma 5.0 A comparação entre os grupos experimentais, foi realizada por meio do teste one-way ANOVA, seguida pelo teste t-Student-Newman-Keuls como post hoc teste e com o nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

EsQUIVA Passiva (Passive Avoidance Test)

No teste da esQUIVA passiva os animais aprendem a evitar o choque (treino), quando avaliados 15 minutos após o choque (memória recente) ou 24 horas após o choque (memória tardia). A Ilustração 1 mostra que os animais do grupo veículo (Tween 80 0,05%) apresentaram uma boa retenção de memória, na fase imediata (memória recente) ($T_0 = 102,6 \pm 33,95$; $T_{15} = 164,5 \pm 51,28$; $T_{24} = 94,00 \pm 33,79$), já nos grupos tratados com controle positivo (Neostigmina 30 mg/kg) apresentaram uma melhor retenção na fase de consolidação (memória tardia), ($T_0 = 33,50 \pm 6,11$; $T_{15} = 20,13 \pm 4,84$; $T_{24} = 203,1 \pm 47,50$) ($p < 0,05$). Nos grupos tratados com TG1 30 mg/kg apresentaram um aumento significativo no tempo de latência para descida da plataforma quando comparado com o treino, significando um aprimoramento na aprendizagem e memória ($T_0 = 33,50 \pm 6,118$; $T_{15} = 20,13 \pm 4,846$; $T_{24} = 203,1 \pm 47,50$).

Comparando os grupos tratados, observa-se uma redução de 68,57% no tempo de latência de descida da plataforma, nos ratos tratados com TG1 (30 mg/kg) quando avaliados no treino comparado com o veículo, quanto na memória recente foi observado uma diminuição de 18,3% no grupo tratado com TG1 em relação ao veículo e um aumento de 85% em relação ao controle positivo, já quando avaliados na memória tardia houve um aumento significativo no tempo de latência para descida da barra no grupo tratado com TG1 30 mg/kg, apresentando melhor atividade que o fármaco de referência.

Labirinto Aquático de Morris (Water Maze)

O parâmetro observado foi a latência para encontrar a plataforma no labirinto aquático de Morris no dia teste. Observa-se uma diminuição significativa de 63,59% e 38,71% no tempo de latência do grupo tratado com TG1 (30 mg/kg, v.o) ($15,25 \pm 5,371$), quando comparados com o grupo veículo ($41,88 \pm 2,248$) e controle (Neostigmina 0,5 mg/kg) ($24,88 \pm 3,425$) respectivamente.

CONCLUSÃO

Os resultados mostram que a administração de TG1 30mg/kg (i.p) influência na aprendizagem e na retenção da memória comprovados pelo teste de esquiwa passiva, aumentando o tempo de latência para descida da plataforma e teste do labirinto aquático de Morris diminuindo a latência para encontrar a plataforma. Sugerindo assim o uso do TG1 para o tratamento e/ou prevenção do Mal de Alzheimer.

REFERÊNCIAS

DEL BO, R.; GHEZZI, S.; SCARPINI, E.; BRESOLIN, N.; COMI, G.P. VEGF genetic variability is associated with increased risk of developing Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences* v. 283, p. 66-68, 2009.

ITO, K.; AHADIEH, S.; CORRIGAN, B.; FRENCH, J.; FULLERTON, T.; TENSFELDT, T. Disease progression meta-analysis model in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* v. 6, p. 39-53, 2010.

MOORE, A.H.; O'BANION, K. Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease. *Advanced Drug Delivery Reviews* v. 54, p. 1627-1656, 2002.

SERENIKI A.; VITAL, M.A.B.F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. *Revista Psiquiatria*. v 30, n. S, p. 0-0, 2008

AGRADECIMENTOS

À UFPI, ao PPGCF, à Capes e ao LAPNEX.

OR10 - Estudos de pré-formulação do fármaco dapsona: avaliação da estabilidade e desenvolvimentos de métodos

Mayara Ladeira Coêlho^{1*} (PG), Larissa Araújo Rolim² (PQ), Pedro José Rolim Neto² (PQ), José Lamartine Soares Sobrinho¹ (PQ).

1. Universidade Federal do Piauí – Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas-PPGCF
2. Universidade Federal do Pernambuco

* Autor principal

mayaralcoelho@hotmail.com

Palavras-chave: Dapsona. Estudo de pré-formulação. Método indicativo de estabilidade.

RESUMO

A dapsona (DDS), juntamente com a clofazimina e a rifampicina, faz parte do esquema poliquimioterápico estipulado pela Organização Mundial de Saúde e Ministério da Saúde para tratamento da hanseníase, que se trata de uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*. O Brasil continua sendo o segundo país em número de casos no mundo, após a Índia. Neste sentido, inicialmente foi desenvolvida e validada uma nova alternativa analítica para quantificação da dapsona por espectrofotometria UV. O método farmacopeico atual utiliza metanol como solvente, sendo este tóxico. Desse modo, os solventes selecionados para o método foram etanol e água purificada. Posteriormente, a fim de alcançar a qualidade e aumento no perfil de segurança no processo de pré-formulação farmacêutica, o fármaco teve suas características físico-químicas abordadas por meio de técnicas específicas através de perfis térmicos, difratométricos, químicos e morfológicos. Posteriormente, a estabilidade da DDS em misturas binárias com excipientes foi avaliada por meio de calorimetria exploratória diferencial como critério de exclusão. Para o delineamento da estabilidade deste ativo foi realizado o estudo de estabilidade forçada da DDS utilizando condições de estresse hidrolítico básico (NaOH 0,1 N) ácido (HCl 0,1 N), neutro (H₂O), oxidativo (H₂O₂ 3%) e fotolítico, as quais foram avaliadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O método indicativo de estabilidade para detecção e quantificação da DDS e seus produtos de degradação foi desenvolvido e validado, possibilitando a avaliação do teor de DDS nas amostras degradadas além de serem identificados, por espectrometria de massa, dois de seus produtos de degradação.

INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica provocada pelo *Mycobacterium leprae*. O Brasil continua sendo o segundo país em número de casos de hanseníase no mundo, após a Índia (ARAÚJO, 2003). Em 1981 a OMS definiu novos esquemas terapêuticos, utilizando a associação da Dapsona (DDS), rifampicina e clofazimina para o tratamento da hanseníase. (RICHARDUS & HABBEMA, 2007). A dapsona (DDS; 4, 4'- Diamino-Difenil-Sulfona) encontra-se no centro de toda terapêutica anti-hansênica (MIZIARA et al; 1992). Ela apresenta alta permeabilidade nas membranas biológicas e baixa solubilidade em água, desta forma, está categorizada como fármaco de Classe Biofarmacêutica IV (CAO et al., 2006), o que torna difícil e ainda mais problemática sua formulação.

Atualmente, moléculas com limitada solubilidade em água estão se tornando o principal alvo de pesquisa nas indústrias farmacêuticas, uma vez que elas podem ocasionar uma série de desafios no desenvolvimento de fármacos e ainda promover uma lenta dissolução do mesmo em fluidos biológicos, comprometendo sua eficácia e acarretando problemas de toxicidade (BLAGDEN et al., 2007). Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver um estudo de pré-formulação, bem como estudar a estabilidade forçada da DDS, a partir de diferentes métodos, além de avaliar as cinéticas degradativas para os casos em que o fármaco foi considerado instável com alterações substanciais. Para isso, desenvolveu-se um método indicativo de estabilidade, que foi validado segundo ICH e ANVISA, sendo posteriormente, utilizado para o monitoramento do estudo de estabilidade acelerada na proposição de uma nova formulação racional para hanseníase.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenvolvimento do método analítico de doseamento por UV

Inicialmente, a solubilidade do fármaco foi analisada a temperatura ambiente com os diferentes solventes: água, etanol, metanol e ácido clorídrico 0,1 M, e mistura destes solventes (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; ALVES et al., 2010). Depois da escolha do sistema solvente, por meio de um espectrofotômetro, uma varredura foi realizada na faixa de 180 nm a 500 nm a fim de se determinar qual comprimento de onda apresenta maiores valores de absorvância. Os critérios de preparo da amostra avaliados foram: tempo de agitação da amostra por ultrassonificação (9, 10 e 11 minutos), estabilidade química da dapsona no sistema solvente (0, 24, 48 horas) e influência da radiação emitida por luz artificial durante o preparo da amostra (presença e ausência de luz). As amostras foram preparadas, preparadas em triplicata e quantificadas por um espectrofotômetro UV no comprimento de onda de 295 nm, utilizando a água como branco. Posteriormente, procedeu-se a validação do método através da análise dos parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. A absorvidade molar foi determinada através da lei de Lambert-Beer.

Estudos de pré-formulação

Os estudos de pré-formulação se deram através da caracterização da DDS a nível molecular, de partículas e de aglomerados. No primeiro nível, o fármaco foi analisado por Espectrofotometria na região do Infravermelho e UV. O espectro de infravermelho foi obtido utilizando o equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de seleneto de zinco. As micrografias foram obtidas de 650 a 4000 cm⁻¹ na resolução de 4 cm⁻¹. Para a obtenção da varredura por espectrofotometria na região UV utilizou-se espectrofotômetro da marca SHIMADZU UV-2401 PC equipado com detector ultravioleta e cubetas de quartzo de seção transversal de 1 cm². Para análise a nível particular a DDS foi submetida a ensaios de Difração de raios-X (DRX) e Termogravimetria (TG), além de terem sido estudadas as

cinéticas de termodecomposição da DDS, primeiramente a investigação cinética de degradação não-isotérmica da DDS foi obtida a partir dos dados de TG pela aplicação do método de Ozawa. Foram utilizadas razões de aquecimento 2,5, 5,0, 10, 20 e 40 °C.min⁻¹. Já para o estudo cinético isotérmico, as curvas TG foram obtidas a partir do aquecimento das amostras até as temperaturas de 260, 270, 280, 290 e 300 °C. A nível de aglomerados, a avaliação da morfologia dos cristais da DDS foi realizada através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizando-se um microscópio Jeol® JSM-5900. Além disso, realizou-se os ensaios de área superficial e tamanho de poros, para a realização deste ensaio, foi utilizado um Analisador de Área Superficial e Tamanho de Poros-ASAP 2420 Micromeritics®, munido de software próprio para determinar a área superficial (SBET) e porosidade (tamanho de poro e volume total de poros) pelo método Barret-Joyner-Halenda (BJH).

Estudos de degradação

Os estudos fotolíticos foram realizados em estado sólido por espalhamento de uma fina camada do fármaco em uma placa de Petri, a 25 °C e expondo-o diretamente a uma combinação de luz UV e fluorescente em uma câmara de fotoestabilidade Nova Ética® (modelo C242), com uma combinação de lâmpadas de UV e fluorescentes com a emissão de 30.000 lux e 13,33 Wm⁻² por hora, com coletas em tempos determinados (0, 5, 10, 24 e 48 h), em triplicata, com a determinação por CLAE - DAD e um conjunto paralelo foi mantido no escuro sob condições semelhantes (KUHN et al., 2004; ICH, 1996).

Os estudos de stress foram realizados sob as condições de hidrólise, oxidação e fotólise, como preconizado pelo ICH. Para a degradação em meio ácido utilizou-se HCl 0,1 M e solução do fármaco na concentração de 50 µg.mL⁻¹. Os estudos também foram realizados em ácido 1M e estas soluções foram aquecidas a 60 °C durante 0, 24, 48, 72 e 96 h. Os estudos em condições alcalinas foram realizados de forma semelhante a uma concentração de droga de 50 µg.mL⁻¹ em NaOH 0,1 N e estas soluções foram também expostas a temperaturas de 80 °C durante 0, 24, 48, 72 e 96 h. Os estudos de stress oxidativo foram conduzidos com a solução concentrada do fármaco de 50 µg.mL⁻¹ em 3% de H₂O₂. A solução foi armazenada à temperatura ambiente 0, 24, 48, 72 e 96 h.

As amostras obtidas a partir de estudos de degradação foram individualmente submetidas à análise por CLAE - DAD para o desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade. Os parâmetros utilizados para selecionar o melhor método foram a intensidade do pico principal (DDS), o fator de separação ativa entre a DDS e seus produtos de degradação mais representativos, e o número de pratos teóricos dos seus produtos de degradação (BRASIL, 2003). A identificação dos produtos de degradação foi determinada por solução de DDS degradada por oxidação (H₂O₂ a 3%) como uma amostra representativa de degradações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desenvolvimento do método de doseamento da DDS por UV

Tabela 1. Teste de solubilidade em solventes diferentes de acordo com a Farmacopeia Brasileira.

Solvente	Volume necessário para solubilizar	Classificação	Termo descritivo
HCl 0.1M	Mais que 100 mL	Muito pouco solúvel	1.000 a 10.000 partes
Água destilada	Mais que 100 mL	Muito pouco solúvel	1.000 a 10.000 partes
Etanol	Cerca de 20 mL	Muito pouco solúvel	1.000 a 10.000 partes
Metanol	Cerca de 10 mL	Ligeiramente solúvel	100 a 1.000 partes

O método desenvolvido mostrou-se específico, linear, preciso, exato, robusto. Na concentração teórica do fármaco de 100% do método, 50g/mL, as absorvâncias das soluções preparadas com etanol e água purificada foram de 0,464 e 0,498, respectivamente. Para o cálculo da molaridade, utiliza-se a equação da molaridade. Sabendo que a massa molar da dapsona é de 248,3 g/mol, e que a concentração utilizada nas absorvâncias foi de 5 µg/mL, conclui-se que a molaridade das soluções correspondentes foi de $2,1 \times 10^{-5}$ mol/L. Aplicando-se a equação da molaridade, pode ser estimada a absorvidades molares da dapsona em água purificada e álcool etílico foram de $24776,12 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $23084,57 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Estudos de pré-formulação

O espectro de IV-TF da dapsona (figura 2) mostra como bandas características os picos em 1143 cm⁻¹ relacionados a absorção da sulfona - estiramento assimétrico; em 1098 cm⁻¹ relacionada ao estiramento simétrico, características de S=O. Outra importante banda no espectro da DDS é a banda de absorção de NH que ocorrem entre 3452 e 3391 cm⁻¹ (BUGAY, 2001). O difratograma da DDS mostra a presença de inúmeros picos ao longo do difratograma (figura 3), ordenamento estrutural típico de um sólido cristalino, principalmente a 2θ em torno de 19,3°, sendo o pico mais intenso, podendo ser considerado pico característico da DDS. Além desse, apresenta outros importantes picos secundários em 16,92°, 22,36° e 29,02°.

Figura 2. Espectro de IV da DDS

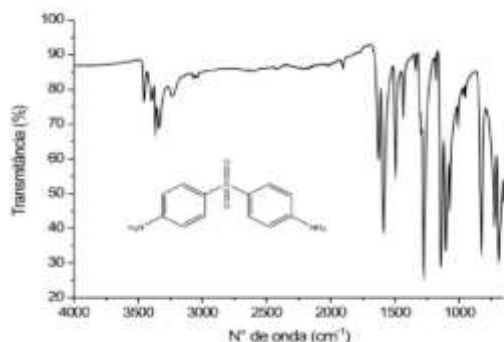
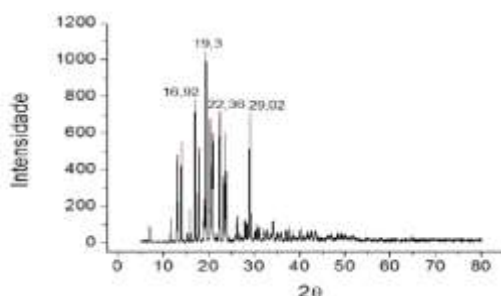


Figura 3. Difratograma da DDS



Na análise termogravimétrica, observou-se que a faixa de temperatura de degradação do fármaco ficou entre 360,26 °C e 390,80 °C, tendo um perfil degradativo de fase única e perda de massa de 97,71%. Com relação ao estudo da cinética de degradação, as cinco curvas TG indicam que a perda de massa entre 250°C e 430°C, ocorreu em uma única etapa, o que corrobora com a ordem de reação assumida de primeira ordem, ou seja, há apenas uma reação significativa ocorrendo e não é afetado por processos concorrentes (HOWELL; RAY., 2006). Mostram

também que as curvas de TG são deslocadas para maiores temperaturas, quando as razão de aquecimento aumentam. Através do método isotérmico, calculou-se a estabilidade (em dias) com base na equação de Arrhenius, utilizando 25 °C como padrão de temperatura ambiente. O resultado foi um tempo estimado de estabilidade térmica de 677 dias, ou seja, aproximadamente 22 meses para um decaimento de 5 % de massa.

Tabela 2 - Resultados de área superficial e porosidade da DDS

Amostra	Área superficial		Diâmetro médio de poro (BET)	
	BET	Langmuir	Unidade (Å)	Unidade (nm)
DDS	44,0520 m ² /g	560,0899 m ² /g	36,6157	3,66157

A DDS apresentou diâmetro médio do poro de 36,6157 Å, o equivalente a 3,66157 nm o que pode ser indicativo da presença de microporos mais largos e principalmente de mesoporos/macroporos, o que facilita a entrada e saída do gás, sem aprisionamento, corroborando com o tipo da isoterma de adsorção/dessorção obtida.

Estudos de degradação

O método foi capaz de detectar e quantificar três produtos de degradação de DDS nas situações de estresses mencionadas acima, também foi possível observar que a DDS mostrou-se estável à degradação hidrolítica neutra, uma vez que com o tempo total de análise (96 h) foi possível observar o decaimento de apenas 3,98%.

A hidrólise foi catalisada por íons de hidrogênio (meio ácido de HCl 0,1 M) ou íons de hidroxila (meio básico de NaOH 0,1 M), após 24 horas, foi observada uma degradação suficiente para a análise dos seus produtos de degradação, sendo o decaimento da média DBH: 11,68% e 15,01%, respectivamente. Estes resultados sugerem que a reatividade hidrolítica é catalisada por ambos íons hidrogênio, e hidroxila, produzindo o mesmo produto de degradação, chamado PD-1, sendo ligeiramente mais susceptível à hidrólise básica. As amostras submetidas a fotólise e oxidação por peróxido de hidrogênio 3% tinham dois dos produtos de degradação DDS, o primeiro era semelhante ao produto obtido por hidrólise (DP-1) e o segundo (DP-2), mostrou degradação ótima após 72 horas de H₂O₂ (19,11%) e 10 horas a fotólise (10,44%). Para a oxidação com H₂O₂ utilizou-se amostras com 72 h visto que é o nível mais alto de produtos de degradação (NETO et al., 2010). Os ensaios realizados mostraram três produtos de degradação de DDS. Estes produtos de degradação são diferentes dos encontrados no método desenvolvido por Lime Cheung (1977), que eram de 2,4'-sulfonilbis(benzenamine), 4- (fenilsul-fonil)benzenamina, e 4-(4'-clorofenilsulfonil) benzenamina.

CONCLUSÃO

Um novo método de doseamento foi desenvolvido de acordo com as necessidades de propiciar uma alternativa segura ao ambiente, através da formação de resíduos químicos com impacto ambiental reduzido sem sacrificar a segurança do analista. Além de confiável, ficou demonstrado também ser um método seguro, rápido e de custo baixo.

Com relação aos estudos de pré-formulação, as técnicas analíticas utilizadas permitiram um conhecimento mais aprofundado sobre a natureza físico-química do anti hanseniano dapsona, que ajudarão a fornecer subsídios para o estabelecimento de um perfil de qualidade detalhado a ser adotado no controle de qualidade de rotina para este fármaco e para formulações que o utilizem.

Foi possível, neste estudo, desenvolver um método indicativo de estabilidade para submeter a dapsona a condições de stress recomendadas pelo ICH. O fármaco e os produtos de degradação foram bem separados um do outro por CLAE. Os estudos de stress e subseqüentes análises de CL-EM mostraram que a droga foi decomposta sob condições hidrolíticas, oxidativa e fotolíticas em três produtos de degradação, dos quais dois tiveram suas estruturas químicas propostas.

REFERÊNCIAS

- ALVES, L.D.S.; ROLIM, L.A.; FONTES, D.A.F.; ROLIM-NETO, P.J.; SOARES, M.F. R.; SOARES-SOBRINHO, J.L. Desenvolvimento de método analítico para quantificação do Efavirenz por espectrofotometria no UV-Vis. *Química Nova*, v. 33, p. 1967-1972, 2010.
- ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 36, p. 373-382, 2003.
- BLAGDEN, N.; MATAS, M.; GAVAN, P.T.; YORK, P. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Belgium, v. 59, p. 617-630, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RE nº 899, de 29 de maio de 2003, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília: Diário Oficial da União 2003.
- BUGAY, D.E. Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 48, p. 43-65, 2001
- CAO, X.; GIBBS, S. T.; FANG, L.; MILLER, H. A.; LANDOWSKI, C. P.; SHIN, H. C.; LENNERNAS, H.; ZHONG, Y.; AMIDON, G. L.; YU, L. X.; SUN, D. Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. *Pharmaceutical Research*, v.23, n.8, p.1675-86, 2006.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2010.
- HOWELL, B. A.; RAY, J. A. Comparison of isothermal and dynamic methods for the determination of activation energy by thermogravimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. v. 83, p. 63-66, 2006.
- ICH, Photostability Testing of New Drug Substances and Products Q1B, in: International Conference on Harmonization, IFPMA, Geneva, 1996.
- KUHN, H.J.; BRASLAVSKY, S.E.; SCHIMIDT, R. Chemical actinometry. *Pure and Applied Chemistry*, v. 76, p. 2105 - 2146, 2004.
- MIZIARA, I.D.; GONCLIM, M.; MINITI, A. Uso da dapsona no tratamento da estomatite aftóide recidivante. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 58, n.2, p. 96-8, 1992.
- NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Como fazer experimentos. 4ª.ed. Bookman: Porto Alegre, 2010.
- RICHARDUS, J.H.; HABBEMA, J.D. The impact of leprosy control on the transmission of M. leprae: is elimination being attained? *Leprosy Review*, v. 78, p. 330-7, 2007.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos, da Universidade Federal do Pernambuco. A CAPES pela bolsa.

OR11 - Incremento de solubilidade do fármaco rifampicina por complexo de inclusão e dispersão sólida

Lyghia Maria Araújo Meirelles^{1*} (PG), Jocélio Felipe Araújo de Sousa Cavalcante² (IC), Rhilder Borges Reis² (IC), Alexandre Araújo de Souza¹ (PQ).

1. Universidade Federal do Piauí – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

2. Universidade Federal do Piauí – Curso de Graduação em Farmácia

* Autor principal

lyghia@ymail.com

Palavras-chave: Rifampicina. Solubilidade. Polivinilpirrolidona. Ciclodextrinas.

RESUMO

A rifampicina (RIF) é um dos antibióticos que compõe o tratamento atual, de primeira linha, contra a tuberculose. E embora possua uma margem de cura elevada, algumas limitações biofarmacêuticas restringem a otimização do tratamento como, por exemplo, sua baixa solubilidade oral. A fim de obter um incremento no perfil de solubilidade da RIF um estudo foi realizado para obtenção de sistemas binários a partir de ciclodextrinas naturais. Foram realizados ensaios de solubilidade com as ciclodextrinas naturais, e a partir do diagrama de solubilidade pôde-se determinar sua eficiência de complexão (EC) e constante de estabilidade (Kc), com melhores resultados para β CD e γ CD. O ensaio de dissolução prosseguiu com ambas ciclodextrinas, a partir de seus respectivos complexos de inclusão, preparados por trituração, e misturas físicas, em proporção equimolar. Os complexos RIF: β -CD (85,38%) e RIF: γ -CD (77,75%), e a mistura física RIF: β -CD (78,38%) tiveram melhor desempenho que o fármaco puro, enquanto a mistura física RIF: γ -CD (71,03%) apresentou uma liberação semelhante à rifampicina (70,51%). Isto pode ter sido provocado pela forma como o fármaco interage com a ciclodextrina. Para tanto, se faz necessário aliar estas informações a análises espectroscópicas e térmicas, a fim de verificar quais interações ocorrem entre as ciclodextrina e a molécula hóspede.

INTRODUÇÃO

Por muitos anos a falta de um mercado rentável e de políticas públicas eficazes levou à estagnação dos tratamentos das doenças negligenciadas tropicais, tornando-os obsoletos (CHATELAIN; IOSET, 2011). A tuberculose, pertencente a este grupo, é causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* e caracteriza-se por sua infectividade crônica. Conforme indicadores de saúde, em 2010, 8,8 milhões de pessoas desenvolveram a doença e, no mesmo ano, 1,4 milhões de mortes foram associadas à tuberculose. Os maiores obstáculos para o controle global desta infecção consistem na detecção e cura de um número de casos representativos para interromper a transmissão (SOSNIK et al., 2010; VILLEMAGNE et al., 2012).

O esquema terapêutico inicial recomendado pela OMS desde 2009 consiste na administração combinada de isoniazida, rifampicina, pirazinamida, e etambutol durante os primeiros 2 meses, seguido pela combinação de isoniazida e rifampicina, pelos 4 meses seguintes. No entanto, algumas lacunas ainda precisam ser preenchidas, devido ao rápido desenvolvimento de resistência, complicações decorrentes da co-infecção tuberculose / HIV, e as limitações da associação dos fármacos de primeira linha (PANDIT; TIWARI, 2011; DUCATI et al., 2006).

A rifampicina (RIF) é um antibiótico semi-sintético derivado da rifamicina, que atua bloqueando a síntese de RNA mensageiro da micobactéria (ARISTOFF et al., 2010; BACCHI et al., 1998). O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) a enquadra na classe II, pela baixa solubilidade e alta permeabilidade (SOSNIK et al., 2010). Dessa forma a velocidade de dissolução torna-se a etapa limitante para sua absorção no trato gastrointestinal. Estratégias de formulação têm sido adotadas para otimizar a solubilidade do fármaco, reduzindo a dose, a frequência de administração, os efeitos colaterais e, conseqüentemente, o abandono do tratamento (AULTON, 2005).

Diversos adjuvantes, sistemas de liberação e vias de administração alternativas, surgiram nas últimas décadas para otimização da biodisponibilidade deste fármaco. Dentre as principais estratégias estão: secagem por atomização, redução do tamanho de partículas, amorfização, modificação do cristal, sistemas de liberação auto-emulsionantes ou formação de complexos de inclusão com ciclodextrina (KAWABATA et al., 2011; VAN DEN MOOTER, 2011).

Desta forma, preparou-se complexos de inclusão RIF: β CD e RIF: γ -CD a fim de avaliá-los perante o fármaco puro, como possíveis estratégias para incremento do seu perfil de dissolução.

MATERIAL E MÉTODOS

Rifampicina (RIF) foi cedida pelo Núcleo de Pesquisa em Alimentos e Medicamentos (NUPLAM) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. α -ciclodextrina (α -CD), β -ciclodextrina (β -CD) e γ -ciclodextrina (γ -CD) foram cedidas pelo Núcleo de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal do Piauí. As soluções foram preparadas utilizando reagentes de grau analítico, água destilada e membranas filtrantes de porosidade 28 μ m.

O estudo de solubilidade foi realizado conforme o método descrito por Higuchi e Connors (1965), em triplicata, adicionando-se excesso de RIF a tubos contendo soluções aquosas das ciclodextrinas naturais, α -, β - e γ -CD, em concentrações crescentes (0 – 10 mmol.L⁻¹). As amostras foram mantidas em banho-maria (Nova Ética 304D) a 37°C, sob agitação, por 2 dias, até obter-se o equilíbrio. Alíquotas foram retiradas, filtradas em papel filtro e adequadamente diluídas em água destilada. O conteúdo foi determinado em espectrofotômetro UV-Vis (Varian AA 50) no LIMAV, no comprimento de onda de 475 nm, a partir da equação da reta $y = 0,0198x + 0,0185$ ($R^2 = 0,9999$).

Os complexos de inclusão RIF:CD foram preparados empregando o método de trituração, na razão molar 1:1. Este método consiste em triturar a massa dos sistemas binários em gral de porcelana, com auxílio de pistilo, adicionando uma pequena quantidade de água para obter uma pasta. Em seguida, o gral contendo a mistura foi colocado sob 37°C em banho-maria, até secagem completa. O material resultante foi triturado, e acondicionado em frasco-ampola de vidro, hermeticamente fechado e armazenado em dessecador.

As misturas físicas de RIF:CD foram preparadas mediante pesagem de quantidade equimolar (1:1), seguida de trituração em gral de porcelana, com auxílio de pistilo, até homogeneização. O material resultante foi acondicionado em frasco-ampola de vidro, hermeticamente fechado e armazenado em dessecador.

A dissolução foi realizada em dissolutor (Nova Ética) e as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro UV/Vis (Varian AA 50). Foram realizados os perfis de dissolução do fármaco puro e dos complexos de inclusão e misturas físicas dos sistemas binários RIF: β -CD e RIF: γ -CD, a partir de método da Farmacopéia Brasileira V ed., conforme condições descritas abaixo:

Meio de dissolução	Aparato	Tempo (min)	Volume do meio de dissolução (mL)	Rotação (rpm)
HCl 0,1 N	Cesta	75	900	100

Cada uma das amostras foi encapsulada, contendo quantidade equivalente a 40 mg de rifampicina. Alíquotas de 10 mL do meio de dissolução foram coletadas de cada cuba, sem reposição, após 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 45 min, 60 min e 75 min do início do ensaio e filtradas. Realizou-se a leitura espectrofotométrica em $\lambda = 475$ nm. O experimento foi realizado em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para realizar a quantificação de rifampicina nos ensaios, realizou-se uma varredura de uma solução deste fármaco na concentração de 20 μ g.mL⁻¹ em água destilada, entre 200 – 700nm, a fim de determinar o melhor comprimento de onda para efetuar as leituras, selecionando-se o $\lambda = 475$ nm. Em seguida, construiu-se uma curva analítica em meio aquoso e em HCl 0,1N, após regressão linear, no intervalo de 8 – 20 μ g.mL⁻¹.

O diagrama de solubilidade obtido a partir das CDs naturais demonstrou um aumento linear da solubilidade da rifampicina, com um coeficiente angular (S_0) inferior a 1, o que evidencia uma estequiometria 1:1 (Figura 1). Os diagramas obtidos para cada ciclodextrina são do tipo A₁, ou seja, o aumento da solubilidade é proporcional ao incremento das concentrações do agente complexante (HIGUCHI; CONNORS, 1965).

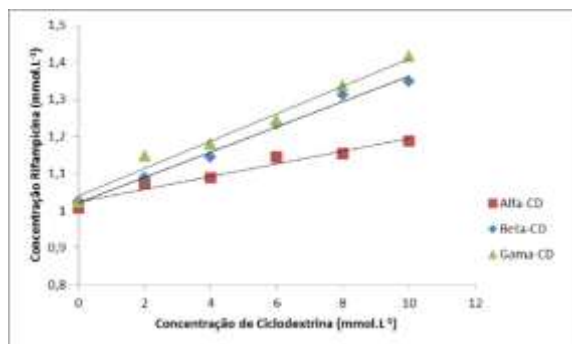


Figura 1. Diagrama de solubilidade aquosa de rifampicina em presença de α -CD, β -CD e γ -CD, sob 37°C.

A constante de estabilidade (Kc) e a eficiência de complexação (EC) de cada sistema RIF:CD foram calculadas a partir dos dados obtidos da porção linear das retas construídas. Estes parâmetros são de grande interesse para a caracterização da interação molecular entre os diversos componentes do complexo, sua estequiometria e viabilidade prática (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006).

Tabela 1. Valores da solubilidade intrínseca da rifampicina (S_0), coeficiente angular, coeficiente de correlação, constante de estabilidade (Kc) e eficiência de complexação (EC), obtidos a partir do diagrama de fases dos complexos de inclusão de rifampicina com α -CD, β -CD e γ -CD.

Ciclodextrina	S_0 (mol.L ⁻¹)	Coeficiente angular	Coeficiente de correlação	Kc (mol.L ⁻¹) ₁	EC
		-3			
α -CD	1,0235 x 10	0,0172	0,9565	17,098	1,750 x 10 ⁻²
		-3			
β -CD	1,0235 x 10	0,0339	0,9904	34,284	3,509 x 10 ⁻²
		-3			
γ -CD	1,0235 x 10	0,0371	0,9812	37,645	3,853 x 10 ⁻²

Quanto maior a Kc do complexo de inclusão, maior será a facilidade de formação do complexo. O maior valor de Kc foi encontrado para o sistema RIF: γ -CD. Segundo Loftsson e colaboradores (2005), se a EC for igual a 0,010, significa que apenas uma de cada cem moléculas de ciclodextrina tem a capacidade de complexar-se com a molécula hóspede. Ou seja, uma molécula de ciclodextrina dentre 58, 29 e 27 moléculas de α -CD, β -CD e γ -CD, respectivamente, complexa-se à rifampicina (Tabela 1).

Embora as Kc obtidas para as ciclodextrinas estejam abaixo dos valores expressos na literatura como ideais (100 – 1000 M⁻¹), deve-se buscar não apenas o melhor incremento de solubilidade, mas também a menor proporção de CD para solubilização do fármaco (LOFTSSON; HREINSDÓTTIR; MÁSSON, 2005).

A partir dos dados observados no diagrama de solubilidade, percebeu-se que os melhores complexos, com maior EC e incremento de solubilidade perante o fármaco puro, foram aqueles obtidos com β -CD e γ -CD. Então procedeu-se a avaliação do perfil de dissolução destes complexos de inclusão, confrontando-se os resultados com as respectivas misturas físicas e a rifampicina livre (Figura 2).

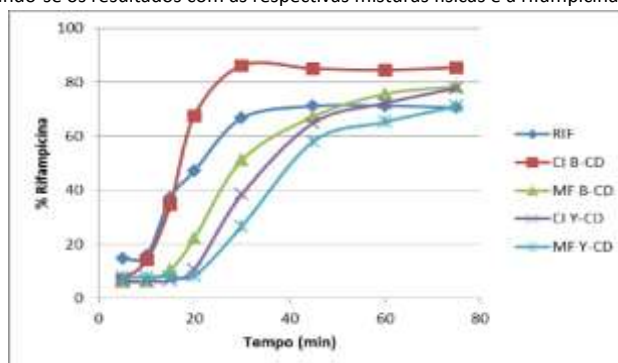


Figura 2. Perfil de dissolução de rifampicina (RIF), das misturas físicas de rifampicina com β -CD (MF RIF: β -CD) e γ -CD (MF RIF: γ -CD) e dos complexos de inclusão de rifampicina com β -CD (CI RIF: β -CD) e γ -CD (CI RIF: γ -CD).

Os complexos de inclusão tiveram maior eficiência que sua mistura física correspondente, quanto à porcentagem de rifampicina liberada no meio. Os complexos RIF: β -CD (85,38%) e RIF: γ -CD (77,75%), e a mistura física RIF: β -CD (78,38%) tiveram melhor desempenho que o fármaco puro, enquanto a mistura física RIF: γ -CD (71,03%) apresentou uma liberação semelhante à rifampicina (70,51%). Isto pode ter sido provocado pela forma como o fármaco interage com a ciclodextrina.

Os melhores resultados do diagrama para estas ciclodextrinas deve-se ao tamanho de suas cavidades que, embora não sejam capazes de encapsular a molécula hóspede por completo, tem diâmetros compatíveis com determinados grupamentos da rifampicina. Desta forma a eficiência de dissolução observada em torno de 45 minutos manteve-se praticamente constante, para todas as amostras avaliadas, na seguinte ordem: CI RIF: β -CD > MF RIF: β -CD > CI RIF: γ -CD > MF RIF: γ -CD > RIF. Porém, para confirmar a interação fármaco:CD é preciso realizar outras análises como espectroscopia no infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear, dentre outras.

CONCLUSÃO

O diagrama de solubilidade indicou que as ciclodextrinas β -CD e γ -CD conferiam aumento de solubilidade aquosa do fármaco rifampicina. O resultado foi confirmado pelo perfil de dissolução de ambas, no qual a β -CD teve resultados melhores que a γ -CD, e da mesma forma os complexos de inclusão foram mais efetivos que as misturas físicas correspondentes.

REFERÊNCIAS

- ARISTOFF, Paul et al. Rifamycins e Obstacles and opportunities. *Tuberculosis*, v. 90, p. 94-118. 2010.
- AULTON, Michael. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- BACCHI, Alessia; PELIZZI, Giancarlo. Comprehensive Study on Structure-Activity Relationships of Rifamycins: Discussion of Molecular and Crystal Structure and Spectroscopic and Thermochemical Properties of Rifamycin O. *Journal of Medicinal Chemistry*, n. 41, p. 2319-2332. 1998.
- CHATELAIN, Eric; IOSET, Jean-Robert. Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model. *Journal of Drug Design, Development and Therapy*, v. 5, p. 175-181. 2011.
- DUCATI, Rodrigo et al. The resumption of consumption - A review on tuberculosis. *Memorial do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 101, n. 7, p. 697-714, 2006.
- HIGUCHI, T.; CONNORS, KA. Phase solubility techniques. *Advanced Analytical Chemistry Instrumental*, v. 4, p. 207-212. 1965.
- KAWABATA, Yohei et al. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 420, n. 1, p. 1-10. 2011.
- LOFTSSON, Thorsteinn; HREINSDÓTTIR, Dagný; MÁSSON, Már. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 302, p. 18-28. 2005.
- PANDIT, Padmakar; TIWARI, Smita. Recent advances in the chemotherapy of tuberculosis. *Indian Journal of Rheumatology*, v. 6, n. 1, p. 95-98. 2011.
- SOSNIK, Alejandro et al. New old challenges in tuberculosis: Potentially effective nanotechnologies in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, n. 62, p. 547-559. 2010.
- VEIGA, Francisco; PECORELLI, Catarina; RIBEIRO, Laura. *As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica*. Coimbra: MinervaCoimbra, 2006.
- VAN DEN MOOTER, Guy. The use of amorphous solid dispersions: A formulation strategy to overcome poor solubility and dissolution rate. *Drug Discovery Today: Technology*, v. 9, n. 2, p. 79-85. 2012.
- VILLEMAGNE, Baptiste et al. Tuberculosis: The drug development pipeline at a glance. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 51, p.1-16. 2012.

OR12 - Métodos de investigação em genotoxicidade em ensaios pré-clínicos de novos fitomedicamentos

Antonio Luiz Gomes Júnior^{1*}(PG).

1. Universidade Federal do Piauí – PPGCF

* Autor principal

junior-gonzaga01@hotmail.com

Palavras-chave: Genotoxicidade. Fitomedicamentos.

RESUMO

O material genético está exposto a varias injurias as quais podem levar a danos, estes por sua vez podem ser reparados ou não dependendo da sua intensidade. Com o intuito de fornecer medicamentos mais seguros é importante conhecer os princípios e as técnicas (Teste cometa, Teste de micronúcleo e Teste Allium cepa) de avaliação genotóxica para o desenvolvimento de fitomedicamentos.

OR13 - Nanoencapsulação de um peptídeo isolado da secreção cutânea de rãs: citotoxicidade in vitro em células tumorais humanas

José Jauro Lopes Anchiêta Júnior^{1*} (IC), Handerson Rodrigues Silva Lima² (IC), Gardênia Carmen Gadelha Militão³ (PQ), Nereide Stela Santos Magalhães⁴ (PQ), Hercília Maria Lins Rolim Santos² (PQ)

1. Universidade Federal do Piauí – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

2. Universidade Federal do Piauí – Curso de Graduação em Farmácia

3. Universidade Federal de Pernambuco – Laboratório de Cancerologia Experimental

4. Universidade Federal de Pernambuco – Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami.

* Autor principal

handersonrsl@yahoo.com.br

Palavras-chave: peptídeos catiônicos. dermaseptina 01. lipossomas. câncer. citotoxicidade *in vitro*.

RESUMO

A terapia antineoplásica convencional atual apresenta algumas limitações que podem ser superadas através da utilização dos nanocarreadores de fármacos, como os lipossomas, que possibilitam o direcionamento específico de substâncias anticancerígenas e previnem efeitos secundários. Peptídeos catiônicos citotóxicos, secretados por rãs, possuem potencial atividade antitumoral, e no gênero *Phyllomedusa* destacam-se as dermaseptinas. Proteínas bioativas, por serem suscetíveis às proteases plasmáticas sanguíneas, necessitam de carreadores que prolonguem suas atividades biológicas *in vivo*. Objetivou-se neste trabalho encapsular a dermaseptina 01 (DS01) em lipossomas unilamelares pequenos e estudar a atividade citotóxica *in vitro* em células tumorais desses sistemas e do peptídeo livre. Os lipossomas foram preparados por hidratação do filme lipídico e sonicação, produzindo-se sistemas convencionais e furtivos, carregados positivamente, contendo DS01 e vazios e. A citotoxicidade das formulações foi analisada em células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) e carcinoma epidermóide de laringe humana (HEp-2), pelo ensaio de redução do tetrazólio (MTT). Os lipossomas apresentaram características físico-químicas satisfatórias. Todos os lipossomas (inclusive os vazios) promoveram uma inibição tumoral, para as duas linhas celulares, consideravelmente maior que a DS01 livre, que por sua vez apresentou IC50 (concentração inibitória do crescimento celular em 50%) de aproximadamente 4,55 µg/mL em ambas as linhagens. Esse teste demonstrou que a nanoencapsulação da DS01 não prejudicou seu potencial antitumoral *in vitro*. Outros estudos como atividade antitumoral *in vivo* e ensaio MTT com lipossomas neutros (sem carga) estão sendo realizados para distinguir o perfil citotóxico entre lipossomas vazios e contendo DS01.

INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença crônica, com uma importante causa de mortalidade em todo o mundo. O termo câncer é uma denominação genérica que se dá aos processos neoplásicos malignos, com morbidade e mortalidade elevadas e crescente prevalência. (BRUNHEROTTI, 2007). A maioria dos agentes antineoplásicos são fármacos antiproliferativos que interferem na mitose celular, visto que as células cancerosas multiplicam-se mais rapidamente do que a maioria das normais. Quando se administra um antineoplásico, comumente apenas uma pequena fração reage com os sítios de ação. O restante é distribuído aos órgãos sadios, provocando-lhes toxicidade (ROLIM-SANTOS et al., 2006).

A resistência a múltiplos fármacos é o maior obstáculo à uma quimioterapia bem-sucedida, e resulta em uma resposta terapêutica incompleta, recorrente e em metástases. Numerosos antineoplásicos exibem alta citotoxicidade não-seletiva e baixo índice terapêutico, o que têm impulsionado pesquisas não apenas para o desenvolvimento de novos fármacos mas também formas inovadoras de melhorar a utilização dos já existentes. Uma destas é a utilização de tecnologias de carreamento como os lipossomas, nanossistemas arquetípicos de liberação farmacológica que possibilitam o direcionamento específico de anticancerígenos à tumores, prevenindo os efeitos secundários em tecidos sadios e aumentando a captação celular destes fármacos (WANG et al., 2011; SLINGERLAND; GUCHELAAR; GELDERBLOM, 2012).

Peptídeos citolíticos são sintetizados em glândulas granulares presentes na pele de uma vasta gama de espécies de anuros (sapos e rãs) e constituem um importante componente do sistema imune inato destes animais. Estas substâncias são liberadas pela pele geralmente em altíssimas concentrações, em resposta à infecções ou condições de estresse. A sub-família Phyllomedusinae compreende 56 espécies e demonstra ser uma fonte rica de peptídeos com atividade citolítica que são agrupados, segundo suas semelhanças estruturais, nas seguintes famílias: dermaseptinas, dermatoxinas, filoxinas, filoseptinas e Gly-Leu-rich peptídeos (HANCOCK, 2001; VANHOYE et al., 2003; CONLON et al., 2007).

As dermaseptinas representam os principais componentes peptídicos antimicrobianos em anuros. São sintetizadas pelo gênero Phyllomedusa e formam uma grande família com cerca de 30 diferentes peptídeos já identificados. O provável mecanismo de ação das dermaseptinas ocorre pela formação de α -hélices anfipáticas que se associam com as bicamadas fosfolipídicas das membranas celulares ou ambientes mimetizadores, provocando permeabilização e ruptura (LA ROCCA; SHAI; SANSOM, 1999; THOMPSON et al., 2007). CONLON et al. (2007), ao estudar a atividade citolítica de diferentes peptídeos derivados da secreção da pele de seres da subfamília Phyllomedusinae, verificou que a dermaseptina L1 apresentou atividade citolítica seletiva contra células HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), provocando citotoxicidade em eritrócitos sadios humanos apenas em concentrações elevadíssimas.

A aplicação de proteínas bioativas como agentes terapêuticos é fortemente limitada por suas rápidas depurações após administração. Fármacos protéticos de baixo peso molecular possuem limitada estabilidade química e física, o que os tornam suscetíveis à proteólise, modificação química e desnaturação, além de geralmente possuírem meia-vida curta em fluidos biológicos. Isso faz com que sejam necessárias frequentes doses para atingir níveis terapêuticos, o que pode resultar em efeitos sistêmicos colaterais graves. Assim, a utilização sucedida destas macromoléculas na terapia médica depende do desenvolvimento de sistemas carreadores que possam superar esses problemas. Os lipossomas podem perfeitamente encapsular proteínas, protegendo-as contra a proteólise ou outros fatores desestabilizadores (MEYENBURG et al., 2000; VAN SLOOTEN et al., 2001).

Objetivou-se neste trabalho estudar a atividade citotóxica in vitro, em linhas celulares cancerígenas humanas, da DS01 encapsulada em sistemas lipossomais unilamelares pequenos, convencionais e furtivos, carregados positivamente, bem como do peptídeo livre (não-encapsulado).

MATERIAL E MÉTODOS

Os lipossomas foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de sonicação. A concentração peptídica encapsulada foi 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e a concentração lipídica total, 38 $\mu\text{mol}/\text{mL}$. Delineou-se quatro tipos de formulações, com as seguintes proporções:

- 1) Lipossomas convencionais carregados positivamente vazios (LCS): fosfatidilcolina de soja / colesterol / estearilamina (7 : 2 : 1);
- 2) Lipossomas furtivos carregados positivamente vazios (LFS): fosfatidilcolina de soja / DSPE-polietilenoglicol / colesterol / estearilamina (6,5 : 0,5 : 2 : 1);
- 3) Lipossomas convencionais carregados positivamente contendo DS01 (LCS01): fosfatidilcolina de soja / colesterol / estearilamina (7 : 2 : 1);
- 4) Lipossomas furtivos carregados positivamente contendo DS01 (LFS01): fosfatidilcolina de soja / DSPE-polietilenoglicol / colesterol / estearilamina (6,5 : 0,5 : 2 : 1).

Para a preparação dos lipossomas contendo DS01, os constituintes foram solubilizados em uma mistura de clorofórmio/metanol (3:1, v/v), sob agitação magnética em um balão volumétrico. A solução foi rotaevaporada por aproximadamente 60 minutos ($36 \pm 1^\circ\text{C}$, 80 rpm), formando-se um fino filme lipídico no balão. Hidratou-se este filme com 10 mL de solução de DS01 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Uma agitação leve favoreceu o despreendimento da camada lipídica a partir do balão, formando-se então as vesículas multilamelares grandes (MLVs). Colocou-se os lipossomas MLVs em um banho de gelo, para então submetê-los à sonicação por sonda ultrassônica (Vibra Cell, BRANSON, EUA a 200 W e 40 Hz por 600 segundos), obtendo-se as vesículas unilamelares pequenos (SUVs). Para os lipossomas vazios (sem o peptídeo), utilizou-se solução tampão fosfato (10 mL).

A citotoxicidade in vitro em células tumorais humanas da DS01 encapsulada em lipossomas e livre foi analisada em células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) e carcinoma epidermóide de laringe humana (HEp-2), cultivadas em MEM (Minimum Essential Medium) em uma concentração de 105 células/mL e volume de 200 μL , semeadas em placas de culturas de 96 poços. Realizou-se o ensaio de redução do sal tetrazólio (MTT), e o corante azul tripan foi utilizado para avaliar a viabilidade celular.

O estudo compreendeu a análise de 06 amostras diferentes: DS01 livre (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LCS01 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LFS01 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LCS, LFS e solução tampão-fosfato pH 7,4. Para cada amostra, utilizou-se uma alíquota de 20 μL , formando-se um volume final (amostra + células) de 220 μL para cada poço. A concentração final do fármaco livre e encapsulado (teórica) foi de aproximadamente 4,55 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta os parâmetros de caracterização físico-química para o tempo zero, isto é, após as primeiras 24 horas da preparação dos lipossomas contendo DS01.

Tabela 1 – Características iniciais (tempo zero) das formulações lipossomais contendo DS01.

Caracterização / Lipossomas	LCS01	LFS01
pH	7,5	7,5
TP (nm)	100,7 \pm 14,9	105,7 \pm 2,0
PDI	0,154 \pm 0,072	0,279 \pm 0,008
Microscopia	Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.
Macroscopia	Efeito Tyndall, sem precipitados.	Efeito Tyndall, sem precipitados.
pZ (mV)	+ 11,89 \pm 2,11	+ 10,29 \pm 1,08

Legenda: TP = Tamanho médio de partícula; PDI = Índice médio de polidispersão; pZ = potencial zeta; MLVs: vesículas multilamelares grandes; LCS01 = lipossomas convencionais carregados positivamente contendo DS01; LFS01 = lipossomas furtivos carregados positivamente contendo DS01.

Ao tempo zero, as formulações apresentaram características adequadas (tabela 1). Os lipossomas contendo DS01 mantiveram tamanho médio inferior à 150 nm, o que os caracteriza como unilamelares pequenos. Os índices de polidispersão também foram satisfatórios para as duas formulações.

O potencial zeta indica a estabilidade potencial de um sistema coloidal. Aumenta proporcionalmente às forças de repulsão entre as partículas, conduzindo a uma formulação mais estável pois as partículas tendem ao não agregamento (PAOLINO et al., 2006; MADY et al., 2011).

Segundo SILVA et al. (2006), a estearilamina confere uma carga global positiva às nanoformulações, isto é, a adição crescente deste lipídeo catiônico conduz a um aumento do potencial zeta. Conforme a tabela 1, os potenciais zeta dos lipossomas apresentaram cargas positivas, e os valores foram aproximadamente semelhantes.

A tabela 2 apresenta as porcentagens de inibição do crescimento das linhas celulares de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) e de carcinoma epidermóide de laringe humana (HEp-2) expostas às seis amostras apresentadas.

Tabela 2 – Inibição em porcentagem do crescimento das linhas celulares de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) e de carcinoma epidermóide de laringe humana (HEp-2) expostas às 6 amostras apresentadas.

Formulação / Linha celular	HT-29	HEp-2
	Inibição % ± DP	Inibição % ± DP
DS01 livre	50,10 ± 1,32	51,34 ± 3,52
LCS	82,26 ± 2,71	86,18 ± 4,36
LFS	96,32 ± 0,81	100 ± 0,83
LCS	76,69 ± 4,03	84,42 ± 2,18
LFS	100 ± 0,81	100 ± 0,52
Tampão fosfato pH 7,4	16,48 ± 3,88	0,00 ± 0,00

Legenda: LCS: lipossomas convencionais carregados positivamente contendo DS01; LFS: lipossomas furtivos carregados positivamente contendo DS01; LCS: lipossomas convencionais carregados positivamente vazios; LFS: lipossomas furtivos carregados positivamente vazios; DP: desvio padrão.

Na concentração de 4,55 µg/mL, a DS01 livre apresentou percentuais de inibição tumoral de aproximadamente 50% para as duas linhas celulares, indicando aproximadamente a IC₅₀. A realização da curva dose/resposta está em andamento.

Para as linhas celulares de HT-29, todas as formulações lipossomais (vazias e contendo DS01) apresentaram potente atividade citotóxica (tabela 2). Segundo WU et al. (2007); JUNG et al. (2009), lipossomas catiônicos promovem um aumento na captação celular bem como na citotoxicidade *in vitro*, devido às suas habilidades de interação eletrostática com as células, o que pode induzir a endocitose, facilitando a liberação do fármaco para o citosol. LAYTON et al. (1980) afirma que lipossomas vazios podem exibir alta toxicidade para determinados tipos celulares, especialmente os que apresentam estearilamina em sua composição. Tudo isso pode justificar os resultados expressivos apresentados pelos lipossomas vazios (teoricamente não esperados).

Para as linhas celulares de HEp-2, também é válida a mesma discussão anterior. Neste caso, destaca-se que ambas as formulações furtivas (vazias e contendo DS01) apresentaram inibição de 100%. Além disso, para todas as amostras, exceto tampão fosfato, a atividade inibitória foi maior ou igual nesta linhagem celular, ainda que não consideravelmente.

Para distinguir o perfil de inibição tumoral entre lipossomas vazios e contendo DS01, ensaios pré-clínicos *in vivo* e ensaios de citotoxicidade com lipossomas sem carga estão sendo realizados.

CONCLUSÃO

A encapsulação da dermaseptina 01 em lipossomas unilamelares pequenos carregados positivamente, convencionais e furtivos, apresentaram caracterização físico-química satisfatória. A DS01 não representou um fator desestabilizador para esses sistemas de carregamento. O ensaio de citotoxicidade do tetrázólio demonstrou que a DS01 livre possui IC₅₀ de aproximadamente 4,55 µg/mL para as linhagens tumorais HT-29 e HEp-2. A DS01 encapsulada apresentou atividade antitumoral *in vitro* consideravelmente maior que o peptídeo livre. Outros estudos de viabilidade celular estão sendo realizados para comprovação da atividade antitumoral. A nanoencapsulação da DS01 é considerável, pois além de não subtrair o efeito citotóxico do peptídeo, protege-o contra a ação lítica sanguínea na administração *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- BRUNHEROTTI, M.R. Intervenções no extravasamento de quimioterápicos vesicantes: revisão integrativa da literatura. 2007. 144 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Enfermagem Fundamental) – Universidade de São Paulo. Orientadora: Namie Okino Sawada.
- CONLON, J.M.; WOODHAMS, D.C.; RAZA, H.; COQUET, L.; LEPRINCE, J.; JOUENNE, T.; VAUDRY, H.; ROLLINS-SMITH, L.A. Peptides with differential cytolytic activity from skin secretions of the lemur leaf frog *Hylomantis lemur* (Hyllidae: Phyllomedusinae). *Toxicon*. v. 50, p. 498-506, 2007.
- HANCOCK, R.E. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infectious Diseases*. v. 1, p. 156-164, 2001.
- JUNG, S.H.; JUNG, S.H.; SEONG, H.; CHO, S.H.; JEONG, K.; SHIN, B.C. Polyethyleneglycol-complexed cationic liposomes for enhanced cellular uptake and anticancer activity. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 382, p. 254-261, 2009.
- LA ROCCA, P.; SHAI, Y.; SANSOM, M.S.P. Peptide-bilayer interactions: simulations of dermaseptin B, an antimicrobial peptide. *Biophysical Chemistry*. v. 76, p. 145-159, 1999.
- LAYTON, D.; LUCKENBACH, G.A.; ANDREESSEN, R.; MUNDER, P.G. The interaction of liposomes with cells: the relation of cell specific toxicity to lipid composition. *European Journal of Cancer*. v. 16, p. 1529-1538, 1980.
- MADY, M.M.; FATHY, M.M.; YOUSSEF, T.; KHALIL, W.M. Biophysical characterization of gold nanoparticles-loaded liposomes. *European Journal of Medical Physics*. v. xx, p. 1-8, 2011.
- MEYENBURG, S.; LILIE, H.; PANZNER, S.; RUDOLPH, R. Fibrin encapsulated liposomes as protein delivery system Studies on the *in vitro* release behavior. *Journal of Controlled Release*. v. 69, p. 159-168, 2000.
- PAOLINO, D.; FRESTA, M.; SINHA, P.; FERRARI, M. Drug delivery systems. *Encyclopedia of medical devices and instrumentation*. 2 ed., p. 427-495, 2006.
- ROLIM-SANTOS, H.M.L.; DE QUEIROZ, F.B.; MAIOR, R.M.S.; DO NASCIMENTO, S.C.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Cytotoxicity of doxorubicin-loaded Com A-liposomes. *Drug Development Research*. v. 67, p. 430-437, 2006.
- SILVA, C.; MARTIN, E.; TAVARES, G.; SILVEIRA, T.; DE OLIVEIRA, M.C.; TEIXEIRA, H. Caracterização físico-química de nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. v. 25, p. 17-21, 2006.
- SLINGERLAND, M.; GUCHELAAR, H.; GELDERBLUM, H. Liposomal drug formulations in cancer therapy: 15 years along the road. *Drug Discovery Today*. v. 17, p. 160-166, 2012.
- THOMPSON, A.H.; BJORSON, A.J.; ORR, D.F.; SHAW, C.; MCCLEAN, S. A combined mass spectrometric and cDNA sequencing approach to the isolation and characterization of novel antimicrobial peptides from the skin secretions of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*. *Peptides*. v. 28, p. 1331-1343, 2007.
- VAN SLOOTEN, M.L.; BOERMAN, O.; ROMOREN, K.; KEDAR, E.; CROMMELIN, D.J.A.; STORM, G. Liposomes as sustained release system for human interferon-γ: biopharmaceutical aspects. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1530, p. 134-145, 2001.

VANHOYE, D.; BRUSTON, F.; NICOLAS, P.; AMICHE, M. Antimicrobial peptides from hyloid and ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. *European Journal of Biochemistry*. v. 270, p. 2068-2081, 2003.

WANG, X.; LI, Y.; YAO, H.; JU, R.; ZHANG, Y.; LI, R.; YU, Y.; ZHANG, L.; LU, W. The use of mitochondrial targeting resveratrol liposomes modified with a dequalinium polyethylene glycol-distearoylphosphatidyl ethanolamine conjugate to induce apoptosis in resistant lung cancer cells. *Biomaterials*. v. 32, p. 5673-5687, 2011.

WU, J.; LEE, A.; LU, Y.; LEE, R.J. Vascular targeting of doxorubicin using cationic liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 337, p. 329-335, 2007.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

OR14 - Propriedades ansiolíticas do 5TIO1

Guilherme Antônio Lopes de Oliveira^{1*} (IC), Amanda Campos Fortes² (PG), Rivelilson Mendes de Freitas² (PQ), Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior (PQ)³, José Lamartine Soares Sobrinho⁴ (PQ) Monica Felts de La Roca Soares⁴ (PQ)

1. Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental, Universidade Federal do Piauí – PIBITI/CNPq

2. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Piauí

3. Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas – Universidade Estadual da Paraíba

4. Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos Correlatos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

* Autor principal

guilhermelopes@live.com

Palavras-chave: tiofeno, ansiedade, labirinto em cruz elevado, campo claro/escuro, camundongo.

RESUMO

2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta [b] tiofeno-3-carbonitrila, 5TIO1, é um novo derivado do 2-aminotiofeno com uma promissora atividade farmacológica. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial efeito ansiolítico do 5TIO1 em modelos animais. No teste do labirinto em cruz elevado (plus maze), o 5TIO1 (0,1; 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹, via intraperitoneal) aumentou o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos. Este efeito não foi dose dependente e a menor dose administrada de 5TIO1 (0,1 mg kg⁻¹) apresentou um melhor efeito ansiolítico quando comparado ao controle e às demais doses (1,0 e 10,0 mg kg⁻¹). No teste claro-escuro, o 5TIO1 na dose de 0,1 mg kg⁻¹ (via intraperitoneal) também mostrou efeito ansiolítico, indicado pelo aumento no tempo de permanência no campo claro, de forma similar ao diazepam (2,0 mg kg⁻¹, via intraperitoneal). Esses resultados sugerem, portanto, que o 5TIO1 possui atividade ansiolítica, e este efeito pode ser mediado por transmissão GABAérgica.

INTRODUÇÃO

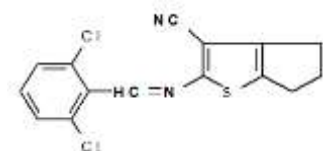
A ansiedade consiste em um estado de tensão provocado em antecipação a uma ameaça ou a uma potencial ameaça. As sensações de ansiedade são uma parte normal da experiência humana, mas a ansiedade excessiva ou inadequada pode se tornar uma doença (WU, KIM, ZHUO, 2008). De acordo com pesquisas, os transtornos de ansiedade são a classe mais prevalente das doenças mentais na população em geral, com prevalência de vida estimada para qualquer tipo de transtorno de ansiedade de 16% e prevalência de 12 meses estimada em 11% (KESSLER et al., 2009).

Um olhar retrospectivo dos últimos 50 anos de pesquisa sobre o estudo pré-clínico da ansiedade mostra que os anos de 60 e 80 podem ser considerados como as décadas do 'comportamento', período em que alguns dos mais importantes testes comportamentais para ansiedade foram concebidos. O teste claro-escuro e o teste do labirinto em cruz elevado, por exemplo, foram desenvolvidos separadamente em 1980, e tornaram-se a base de estudos pré-clínicos de ansiedade (FRASER et al., 2010).

Embora existam terapias empiricamente suportadas para esses transtornos, muitos pacientes que completam o tratamento são parcialmente responsivos ou mesmo não responsivos. Enquanto outros pacientes têm dificuldade para tolerar e/ou aderir ao tratamento, abandonando prematuramente a farmacoterapia (TAYLOR, ABRAMOWITZ, MACKAY, 2012). Dentre a classe de fármacos usados nesses tratamentos estão os benzodiazepínicos. Entretanto, sua eficácia terapêutica é limitada devido a problemas como: sedação, amnésia retrógrada, relaxamento muscular, tolerância e dependência física (RUDOLPH, KNOFLACH, 2011). Assim, justifica-se o desenvolvimento de pesquisas em busca de agentes mais seguros e eficazes para o tratamento da ansiedade.

Atualmente, derivados tiofênicos têm atraído o interesse da indústria farmacêutica devido ao seu amplo espectro farmacológico, em especial, como agentes ansiolíticos (AMR et al., 2010). Neste contexto, o 2-[(2,6-diclorobenzilideno) amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta [b] tiofeno-3-carbonitrila, também chamado de 5TIO1 (Figura 1), é um novo derivado do 2-aminotiofeno sintetizado por uma reação de duas etapas, partindo da reação de Gewald, seguida pela condensação com 2,6-diclorobenzaldeído (MENDONÇA-JÚNIOR et al., 2011). Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial efeito ansiolítico do 5TIO1 em modelos experimentais na tentativa de esclarecer o seu mecanismo de ação.

Figura 1. Estrutura molecular do 5TIO1.



MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss, albinos, machos, pesando entre 25 a 30 g, com dois meses de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí. Os animais receberam água e ração tipo pellets (Purina®) com livre acesso e foram mantidos com iluminação controlada (12h de ciclo claro/escuro) e temperatura (25 ± 2 °C). Os experimentos comportamentais foram realizados entre 8:00 e 12:00 em ambiente controlado. Os protocolos experimentais e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí (nº 031/12).

Tratamento com fármacos

O 5TIO1 foi fornecido pelo Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas da Universidade Federal da Paraíba, na forma de um cristal amarelo, com rendimento de 89%, ponto de fusão 159-160°C e Rf 0,54 (n-Hex./AcOEt. 8,5:1,5). Este foi emulsificado com o veículo – solução de Tween 80 0,05% (Sigma-EUA) e dissolvido em solução salina 0,9%. Os animais foram tratados com a substância experimental nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹, via intraperitoneal (i.p.), 30 minutos antes dos experimentos. O grupo controle recebeu veículo em um volume constante de 10 mL kg⁻¹.

1, administrado pela mesma via dos grupos tratados. Diazepam (DZP) 2,0 mg kg⁻¹ (União Química-Brasil) e flumazenil (FLU) 25,0 mg kg⁻¹ (Sigma-EUA), utilizados como padrões, foram administrados via intraperitoneal após a dissolução no veículo.

Teste do Labirinto em Cruz Elevado

O teste de labirinto em cruz elevado (LISTER, 1987) consistiu de dois braços abertos perpendicular (30 x 5 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 25 cm) também na posição perpendicular. Os braços abertos e fechados foram conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). Para este teste foram utilizados cinco grupos de 11 animais cada, todos tratados pela via intraperitoneal. O primeiro grupo foi tratado com veículo, o segundo grupo com DZP 2,0 mg kg⁻¹, e os outros grupos foram tratados com 5TIO1 em doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹. Trinta minutos após os tratamentos, o animal foi colocado no centro do labirinto com o nariz em direção a um dos braços fechados, e observados por 5 min. Os parâmetros observados foram: número de entradas nos braços abertos (NEBA), porcentagens de entradas para os braços abertos (PEBA), tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) e porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (PTBA).

Após este procedimento experimental, realizou-se a avaliação da possível participação do sítio benzodiazepínico dos receptores GABAA no efeito ansiolítico do 5TIO1. Para este fim, três grupos de 11 camundongos foram pré-tratados com FLU 25 mg kg⁻¹ (i.p.), um antagonista competitivo reconhecido do receptor central dos benzodiazepínicos, e após 15 minutos foram tratados, separadamente, com o veículo, 5TIO1 (0,1 mg kg⁻¹) e DZP 2,0 mg kg⁻¹ (i.p.). Após 30 minutos de tratamento os mesmos parâmetros descritos acima foram analisados.

Teste claro-escuro

Complementando a avaliação do efeito ansiolítico, foi realizado o teste claro-escuro. Foram utilizados três grupos com camundongos 11 por grupo, todos tratados pela via intraperitoneal. O primeiro grupo foi tratado com veículo, o segundo grupo com DZP 2,0 mg kg⁻¹, e o terceiro com 5TIO1 em doses de 0,1 mg kg⁻¹. Após 30 minutos dos tratamentos, os animais foram colocados, um por vez, no aparato do teste claro-escuro. O aparato utilizado é feito de acrílico dividido em 2 compartimentos (box claro e box escuro) que se comunicam por meio de uma pequena porta (CRAWLEY, 1981). O box escuro (acrílico preto, 27 x 18 x 29 cm) é pobremente iluminado. O box claro (acrílico transparente, 27 x 18 x 29 cm) é iluminado por uma fonte de luz de 60W (400 lx). Os animais foram observados por 5 minutos e depois de cada ensaio, o equipamento foi limpo com solução de etanol 70%. O parâmetro utilizado foi o tempo de permanência no box claro expresso em segundos.

Após este procedimento experimental, realizou-se a avaliação da possível participação do sítio benzodiazepínico dos receptores GABAA no efeito ansiolítico do 5TIO1. Para este fim, três grupos de 11 camundongos foram pré-tratados com FLU 25 mg kg⁻¹ (i.p.), e após 15 minutos foram tratados, separadamente, com o veículo, 5TIO1 (0,1 mg kg⁻¹) e DZP 2,0 mg kg⁻¹ (i.p.). Após 30 minutos de tratamento os mesmos parâmetros descritos acima foram analisados.

Análise estatística

Todos os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.). Os dados obtidos foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste t-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste. Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism (versão 5.0) e os grupos experimentais foram comparados com o grupo veículo. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,001$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo mostrou que uma nova entidade química, 5TIO1, tem potencial farmacológico para se tornar um novo medicamento ansiolítico. Dados estes que justificam a realização dos estudos de pré-formulação dessa molécula (GOPINATH, NAIDU, 2011). Dois diferentes ensaios comportamentais foram utilizados (labirinto em cruz elevado e claro-escuro) baseados, etologicamente, no desejo inato do animal para a exploração de ambientes desconhecidos versus a aversão aos ambientes expostos e bem iluminados (CRYAN, HOLMES, 2005). Em ambos os ensaios (Tabela 1 e Tabela 2), a dose mais baixa de 5TIO1 (0,1 mg kg⁻¹) aumentou significativamente ($p < 0,001$) o número de entradas e o tempo gasto pelos camundongos em cada um dos espaços de aversivos (braço aberto e *box* claro). Estes ensaios foram escolhidos por serem validados farmacologicamente, simples, baratos, rápidos, por não necessitarem de treinamento preliminar e por não causarem muito desconforto para os animais durante o manuseio (BORA, SHARMA, 2011).

Tabela 1. Efeitos do 5TIO1 em camundongos no teste do labirinto em cruz elevado.

Grupos	NEBA	PEBA	TPBA	PTBA
Veículo (controle)	7,09 ± 0,34	42,55 ± 1,1	75,36 ± 2,62	24,85 ± 0,87
DZP 2	13,00 ± 0,40 ^a	64,18 ± 0,82 ^a	110,5 ± 0,82 ^a	37,55 ± 0,87 ^a
5TIO1 0,1	14,91 ± 0,39 ^a	59,16 ± 1,88 ^a	142,7 ± 2,18 ^{a,b}	43,46 ± 2,18 ^a
5TIO1 1,0	11,55 ± 0,54 ^a	47,72 ± 1,21 ^b	127,0 ± 4,25 ^a	38,72 ± 2,40 ^a
5TIO1 10,0	11,64 ± 0,66 ^a	47,16 ± 1,19 ^b	123,5 ± 3,81 ^a	38,93 ± 1,92 ^a
FLU 25 + DZP 2	7,54 ± 0,25 ^b	39,64 ± 0,94 ^b	75,64 ± 1,91 ^b	25,03 ± 0,65 ^b
FLU 25	7,27 ± 0,36	40,73 ± 1,99	75,45 ± 2,43	25,09 ± 0,80
FLU 25 + 5TIO1 0,1	4,91 ± 0,31 ^c	36,91 ± 2,42 ^c	118,6 ± 9,16 ^c	39,18 ± 3,12

Legenda: Os valores representam a média ± E.P.M. de NEBA, número de entradas nos braços abertos; PEBA, porcentagem de entradas nos braços abertos; TPBA, tempo de permanência nos braços abertos; PTBA, porcentagem de tempo nos braços abertos, dos camundongos usados nos experimentos (n=11 por grupo) utilizados nos experimentos. ^a $p < 0,001$, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste t-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste), ^b $p < 0,001$ quando comparados ao grupo DZP (ANOVA e t-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste), ^c $p < 0,001$ quando comparados ao grupo 5TIO1 0,1 (ANOVA e t-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

O teste do labirinto em cruz elevado é amplamente utilizado para avaliar a eficácia das intervenções de agentes modificadores da ansiedade e para explorar as bases neurológicas da ansiedade (SIDOR, RILETT, FOSTER, 2010). A exposição aos braços abertos no *pluz maze* produz, significativamente, um comportamento relacionado à ansiedade do que a exposição aos braços fechados (ALCALAY et al., 2004). Isso significa que benzodiazepínicos e outros compostos ansiolíticos aumentam o tempo de permanência dos camundongos nos braços abertos, enquanto que os agentes ansiogênicos diminuem (CHACUR, 1999).

Os resultados dos possíveis efeitos ansiolíticos do 5TIO1 pelo teste de labirinto em cruz elevado em camundongos adultos são mostrados na Tabela 1. Os resultados mostraram que o NEBA aumentou, significativamente, 110,3; 62,9 e 64,2% nos grupos tratados com 5TIO1 0,1, 1,0 e 10,0 mg kg⁻¹, respectivamente, quando comparado com o controle ($p < 0,001$). Analogamente, o TPOA também aumentou 89,3; 68,5 e 63,9% ($p < 0,001$). Além disso, a menor dose de 5TIO1 foi 27 e 42,7% superior ao DZP para os parâmetros NEBA e TPBA, respectivamente. Observou-se também que o FLU reverteu os efeitos do DZP e do 5TIO1 em todas as doses, embora não tenha apresentado efeito sozinho.

Complementando o possível efeito ansiolítico do 5TIO1 no labirinto em cruz elevado, o teste claro-escuro também foi realizado (DHINGRA, CHILLAR, GUPTA, 2012). Este teste baseia-se na aversão natural dos roedores a ambientes iluminadas e no comportamento exploratório dos roedores em resposta a fatores de stress moderado (luz e ambiente desconhecido) (CRAWLEY, 1981; BOURIN, HASCOËT, 2003). Logo, quanto mais tempo gasto no ambiente iluminado, "menos ansiedade" tem o roedor (HUANG, LIN, 2010).

Tabela 2. Efeitos do 5TIO1 em camundongos no teste claro-escuro.

Grupos	Tempo de permanência no campo claro (s)
Veículo (controle)	78,64 ± 3,14
DZP 2	101,7 ± 1,21 ^a
5TIO1 0,1	97,09 ± 5,75 ^a
FLU 25 + DZP 2	76,00 ± 2,80 ^b
FLU 25	79,45 ± 3,788
FLU 25 5TIO1 0,1	37,00 ± 1,54 ^c

Legenda: Os valores são que a média ± S.E.M. do tempo de permanência no campo claro (s) dos camundongos usados nos experimentos (n=11). ^ap<0,001, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste t-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste), ^bp<0,001 quando comparados ao grupo DZP (ANOVA e t-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste), ^cp<0,001 quando comparados ao grupo 5TIO1 0,1 (ANOVA e t-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste).

Os resultados da atividade ansiolítica do 5TIO1 pelo teste claro-escuro em camundongos adultos são mostrados na Tabela 2. A administração de DZP e 5TIO1 0,1 aumentou, significativamente (p<0,001), o tempo de permanência dos camundongos no *box* iluminado em 29,3 e 23,5%, respectivamente, em comparação com o controle. Similarmente ao teste do labirinto em cruz elevado, o flumazenil também reverteu os efeitos do DZP e 5TIO1, embora não tenha apresentado efeito sozinho. Portanto, o 5TIO1 aumentou todos os parâmetros analisados (Tabela 1 e Tabela 2) em ambos os testes, indicando a sua atividade ansiolítica. Tal atividade não apresentou efeito dose dependente; e a menor dose (0,1 mg kg⁻¹) do 5TIO1, 20 vezes menor que o fármaco de referência (diazepam), apresentou o melhor efeito ansiolítico em relação ao controle.

Muitos estudos reportam que a neurotransmissão GABAérgica desempenha um papel importante na ansiedade (MOHLER et al., 1990). De fato, vários fármacos, como os benzodiazepínicos, são utilizados para essa patologia (ALMEIDA et al., 2012). As evidências de que os transtornos de ansiedade podem ser causados por anormalidades nos receptores GABAérgicos são provenientes de uma série de estudos utilizando um antagonista dos benzodiazepínicos, o flumazenil, tanto em testes desafios como em métodos de imagem (NUTT, MALIZIA, 2001). O flumazenil, portanto, não tem nenhum efeito quando administrado sozinho, mas pode antagonizar o efeito ansiolítico do diazepam (WIEROŃSKA et al., 2004). O efeito ansiolítico do 5TIO1 foi abolido pelo flumazenil no teste do labirinto em cruz elevado e no teste claro-escuro, sugerindo que o 5TIO1 pode agir no sítio benzodiazepínico do receptor GABAA no cérebro de camundongos.

CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou o efeito ansiolítico de uma nova entidade química, 5TIO1, a qual tem sua propriedade intelectual garantida por meio de depósito de patente; e dá suporte para a hipótese que esta molécula interaja com o receptor GABA, provavelmente nos subtipos de receptores que medeiam os efeitos dos benzodiazepínicos. Esses resultados impulsionam os estudos de pré-formulação desse novo composto, o qual é uma grande promessa para a indústria farmacêutica, que está enfrentando uma crise de inovação. Estudos adicionais, no entanto, são necessários para esclarecer totalmente o mecanismo do efeito ansiolítico do 5TIO1.

REFERÊNCIAS

- ALCALAY, R.N.; GILADI, E.; PICK, C.G.; GOZES, I. Intranasal administration of NAP, a neuroprotective peptide, decreases anxiety-like behavior in aging mice in the elevated plus maze. *Neuroscience Letters*, v. 361, p. 128-131, 2004.
- ALMEIDA, A.A.C.; COSTA, J.P.; CARVALHO, R.B.F.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. *Brain Research*, v. 1448, p. 56-62, 2012.
- AMR, A.E.-G.E.; SHERIF, M.H.; ASSY, M.G.; AL-OMAR, M.A.; RAGAB, I. Antiarrhythmic, serotonin antagonist and antianxiety activities of novel substituted thiophene derivatives synthesized from 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-N-phenylbenzo[b]thiophene-3-carboxamide. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.45, p. 5935-5942, 2010.
- BORA, K.S.; SHARMA, A. Bioactivity-directed separation of an anxiolytic fraction from *Medicago sativa* Linn. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, v. 8, n. 8, p. 1-4, 2011.
- BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. *European Journal Pharmacology*, v. 463, p. 55-65, 2003.
- CHACUR, C.; RAYMOND, R.; HIPÓLIDE, D.C.; GIUGLIANO, E.B.; LEITE, J.R.; NOBREGA, J.N. Immediate increase in benzodiazepine binding in rat brain after a single brief experience in the plus maze: a paradoxical effect. *Neuroscience Letters*, v. 269, p. 29-32, 1999.
- CRAWLEY, J.N. Neuropharmacologic specificity of a simple model for the behavioural actions of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, v. 15, p. 695-699, 1981.
- CRYAN, J.F.; HOLMES, A. The ascent of mouse: advances in modeling human depression and anxiety. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 4, p. 775-790, 2005.
- DHINGRA, D.; CHHILLAR, R.; GUPTA, A. Antianxiety-like activity of gallic acid in stressed and stressed mice: possible involvement of nitriergic system. *Neurochemical Research*, v. 37, p. 487-494, 2012.
- FRASER, L.M.; BROWN, R.E.; HUSSIN, A.; FONTANA, M.; WHITTAKER, A.; O'LEARY, T.P.; LERDELE, L.; HOLMES, A.; RAMOS, A. Measuring anxiety- and locomotion-related behaviours in mice: a new way of using old tests. *Psychopharmacology*, v. 211, p.99-112, 2010.
- GOPINATH, R.; NAIDU, R.A.S. Pharmaceutical preformulation studies – current review. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, v. 2, n. 5, p. 1391-1400, 2011.
- HUANG, T.-Y.; LIN C.-H. A comparison between chronic exercise training and desipramine as treatments for the depression-like behavior of early-life maternal deprivation rats. *Neuroscience Letters*, v. 480, p. 201-205, 2010.
- KESSLER, R.C.; AGUILAR-GAXIOLA, S.; ALONSO, J.; CHATTERJI, S.; LEE, S.; ORMEL, J.; ÜSTÜN, T.B.; WANG, P.S. The global burden of mental disorders: an update from the WHO World Mental Health (WMH) Surveys. *Epidemiologia e Psichiatria Sociale*, v. 18, n. 1, p. 23-33, 2009.
- LISTER, R.G. The use of a plus maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, v. 92, p. 180-185, 1987.
- MENDONÇA-JUNIOR, F.J.B.; LIMA-NETO, R.G.; OLIVEIRA, T.B.; LIMA, M.C.A.; PITTA, I.R.; GALDINO, S.L.; CRUZ, R.M.D.; ARAÚJO, R.S.A.; NEVES, R.P. Synthesis and evaluation of the antifungal activity of 2-(substituted-amino)-4,5-dialkyl-thiophene-3-carbonitrile derivatives. *Latin American Journal of Pharmacy*, v.30, p.1492-1499, 2011.
- MOHLER, H.; MALHERBE, P.; DRAGUHN, A.; RICHARDS, J.G. GABAA-receptors: structural requirement and sites of gene expression in mammalian brain. *Neurochemical Research*, v. 15, n. 15, p. 199-207, 1990.
- NUTT, D.J.; MALIZIA, A.L. New insights into the role of the GABAA-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. *The British Journal of Psychiatry*, v. 179, p. 390-396, 2001.
- RUDOLPH, U.; KNOFLACH, F. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 10, p. 685-697, 2011.
- SIDOR, M.M.; RILETT, K.; FOSTER, J.A. Validation of an automated system measuring anxiety-related behaviours in the elevated plus maze. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 188, p. 7-13, 2010.
- TAYLOR, S.; ABRAMOWITZ, J.S.; MACKAY, D. Non-adherence and non-response in the treatment of anxiety disorders. *Journal of Anxiety Disorders*, v. 26, p. 583-589, 2012.

WIEROŃSKA, J.M.; ŚMIAŁOWSKA, M.; BRAŃSKI, P.; GASPARINI, F.; KŁODZIŃSKA, A.; SZEWCZYK, B.; PAŁUCHA, A.; CHOJNACKA-WÓJCIK, E.; PILIC, A. In the amygdala anxiolytic action of mGlu5 receptors antagonist MPEP involves neuropeptide Y but not GABAA signaling. *Neuropsychopharmacology*, v. 29, p. 514-521, 2004.

WU, L-J; KIM, S.S.; ZHUO, M. Molecular targets of anxiety: from membrane to nucleus. *Neurochemical Research*, v. 33, p. 1925-1932, 2008.

AGRADECIMENTOS

Ao CAPES pela bolsa. Ao CNPq, LAPNEX, FAPEPI e UFPI.



I Workshop de Projetos e Dissertações

Apresentações em pôsteres

CN01 - Perfil fitoquímico e qualificação da atividade biológica de uma fração isolada de *Bellis perennis*

Cassio Herbert Santos de Melo*¹(IC), Katrícia Maria Feitosa Cardoso¹(IC), Thiago Henrique Costa Marques²(IC), Rivelilson Mendes de Freitas (PQ)³.

1. Universidade Federal do Piauí – PIBIT/CNPq

2. Universidade Federal do Piauí – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêutica.

3. Universidade Federal do Piauí – Curso de Graduação em Farmácia, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêutica.

* Autor principal

cassio_102@hotmail.com

Palavras-chave: Atividade antioxidante, *Bellis perennis*, flavonoide.

RESUMO

Descreveu-se o isolamento e identificação da Apigenina-7 β -O-glicopiranosídeo, flavonoide isolado das flores de *B. perennis* L., espécie com amplo espectro de atividades biológicas, além de avaliar a atividade antioxidante *in vitro* e a inibição da enzima Acetilcolinesterase (AChE). O flavonoide mostrou forte potencial antioxidante *in vitro*, por meio da capacidade de remoção dos radicais hidroxila e óxido nítrico, bem como impediu a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e inibição contra a AChE, sugerindo possível utilização no tratamento de doenças neurodegenerativas, investigações adicionais são necessárias para elucidar os possíveis mecanismos de ação da ApG.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana, tendo o conhecimento popular grande contribuição para divulgação das virtudes terapêuticas obtidas a partir do uso destas plantas (LUBIAN, 2010). Assim, dentre as várias famílias botânicas, pode ser destacado várias plantas com potencial biológico, como a família Asteraceae, que compreende, aproximadamente, 1500 gêneros e 2300 espécies, (JUDD et al., 2009), incluindo o gênero *Bellis* e a espécie *Bellis perennis* conhecida como margarida comum ou margarida inglesa. Dessa forma pode ser sugerido que as flores de *B. perennis* podem possuir um papel modulador no tratamento de doenças neurodegenerativas, devido à presença de seus compostos fenólicos, uma vez que estes podem interromper processos oxidativos celulares no sistema nervoso central (SNC) e inibidores da acetilcolinesterase (AChE) em extratos e compostos isolados de plantas.

No presente trabalho foi descrito o isolamento e identificação de um flavonóide glicosado a Apigenina-7 β -O-glicopiranosídeo (ApG), das flores de *B. perennis*, além da avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e anticolinesterásica da substância isolada. A estrutura química da substância isolada foi definida com base na análise de dados espectroscópicos de RMN ¹H e ultravioleta e a comparação dos dados obtidos com os registrados na literatura, bem como foram investigados os efeitos do potencial oxidante de ApG sobre a atividades de enzimas antioxidantes *in vitro* em nível de peroxidação lipídica, conteúdo de nitrito (NO₂⁻) e espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), além da avaliação AChE *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Material vegetal

A espécie estudada, *B. perennis*, foram coletadas no mês de outubro pela manhã (07:00) na fazenda Sítio São José, município de Pacoti na região de Baturité, Ceará. A exsiccata de número 27.276 encontra-se depositada no Herbário Graziela Barroso da UFPI.

2.2 Procedimentos para obtenção dos extratos e isolamento do constituinte químico

Flores (310,0 g) foram separadas, secas, maceradas estaticamente e submetidos à extração com etanol a temperatura ambiente. O extrato etanólico obtido permaneceu sete dias em repouso, agitando-se duas vezes ao dia, sendo, em seguida concentrado usando-se evaporador rotatório sob pressão reduzida, para obtenção dos extratos etanólico: EEF *B. perennis* (38,0 g)

O EEF (38 g) foi adsorvido em gel sílica e submetido a fracionamento cromatográfico com eluentes hexano, clorofórmio, acetato de etila puros e água em ordem crescente de polaridade, obtendo-se as respectivas frações (7,4g; 11,5g; 0,92g e 4,12g) após destilação a pressão reduzida. A fração acetato de etila foi submetida a uma coluna cromatográfica em gel de sílica, usando-se eluentes puros e misturas binárias de hexano/clorofórmio, clorofórmio/diclorometano, diclorometano/acetato de etila e acetato de etila/metanol (0-100%, v/v), utilizou-se as frações 10/12 em acetato de etila/metanol (5/5) que após análise em CCD em acetato/metanol (9/1) apresentou característica de substância pura, na qual se constatou por RMN ¹H, espectros de absorção na região IV e UV, tratar-se de uma substância identificada como Apigenina 7-O-glicopiranosídeo (12 mg).

2.3 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

A determinação do conteúdo de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico foi realizada para quantificar o nível de peroxidação lipídica da ApG (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991). A produção do radical hidroxila (OH[•]) foi quantificado por meio da reação de Fenton, onde este radical livre foi produzido pela degradação oxidativa da 2-desoxirribose (LOPES et al., 1999). O óxido nítrico (NO) foi gerado a partir da decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio (NPS) em tampão fosfato 20nM (pH 7,4) (BASU; HAZRA, 2006).

2.4 Determinação *in vitro* da atividade da enzima Acetilcolinesterase.

O efeito inibitório da substância isolada sobre atividade da enzima Acetilcolinesterase *in vitro* foi avaliada da mesma forma como descrito por Ellman e colaboradores (1961).

2.5 Análise Estatística

Os resultados obtidos neste estudo foram expressos como média \pm E.P.M. Para avaliar a significância das diferenças entre as médias, foi utilizada a ANOVA One-way seguido do *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os valores da concentração inibitória média (CI₅₀) foram obtidos por intermédio de plotagem Log-Probit.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento dos constituintes químicos da EEF *B. perennis*

Os constituintes de *B. perennis* encontrados na literatura apresentam saponinas, triterpeno, várias antocianinas, flavonóides e poliacetilenos (YOSHIKAWA, et al. 2008). No fracionamento das folhas foram obtidos os rendimentos: Hexano (57%), Clorofórmio (19%), Acetato de Etila (0,3%) e Água (10,85%), da fração de acetato de etila: metanol/água (F-10/12) na proporção de 9:1 permitiu após liofilizado a obtenção de 12 mg ($r = 3,5\%$) de um líquido amarelo que apresentou característica de substância pura em CCD.

Caracterização e identificação da substância estrutural do flavonoide isolado de *B. perennis*.

Análise dos dados obtidos nos espectros no IV, de RMN de ¹H, RMN de C-13, DEPT 135 e do espectro no UV, com adição de reagentes de deslocamento, permitiram concluir que a fração é formada por uma flavona glicosilada identificada como apigenina-7 β -O-glicopiranosídeo (1).

(1) Apigenina -7 β -O -glicopiranosídeo (C₂₁H₂₀O₁₀) - Apigenina isolada foi obtida na forma de um sólido amarelo de cor amarela, solúvel em acetato/metanol com fator de retenção R_f = 0,5 (aceratao/metanol 1/1) e ponto de fusão de 238 °C; Peso Molecular: 432,38; Ultra-Violeta: I_{max} (MeOH) nm: 268, 334; + NaOMe: 267; 390; + AlCl₃ : 276; 299; 344; 384; ¹H e ¹³C RMN de acordo com a literatura²⁶.

Determinação da atividade antioxidante *in vitro*.

A atividade antioxidante da ApG foi investigada, visto que várias evidências indicam que em situações estressantes ocorre a diminuição no metabolismo cerebral de radicais livres. Assim, o cérebro possui uma via específica para metabolizar radicais livres (GATE, et al. 1999; MANDELKER et al., 2008) com influência no processo de peroxidação lipídica (BASU S, HAZRA B. 2006), no conteúdo de nitrito (OLIVEIRA, et al., 2007; FERREIRA et al; 2007) e na produção de TBARS (SERAFINI et al., 2011).

Os resultados obtidos demonstraram que na maioria das concentrações testadas (0,9 – 1,8 – 3,6 – 5,4 – 7,2 µg/mL) a ApG, foi capaz de prevenir a peroxidação lipídica induzida por AAPH com inibição significativa quando comparado ao sistema reacional. O Trolox (droga padrão) também reduziu o parâmetro observado, apresentando 55,8% [p>0,001] de inibição, neste método a ApG apresentou Cl_{50} igual a 1,62 µg/mL, variando de 1,13 a 2,35 µg/mL ($r^2 = 0,94$) inibindo a quantidade de TBARS formado. Dessa forma foi constatado que a ApG pode exercer potencial antioxidante com efeito protetor para as biomoléculas lipídicas.

Produziu também a remoção do radical hidroxila 68,2; 73,5; 76,45; 77,11 e 77,68%, respectivamente quando comparado ao sistema reacional nas concentrações, com a concentração inibitória 50% igual a 0,43 µg/mL, variando de 0,27 a 0,66 µg/mL ($r^2 = 0,97$). Da mesma forma, o Trolox usado como controle positivo na concentração de 0,45 mM inibiu a produção do radical hidroxila em 70,51% (p<0,05), quando comparado ao meio reacional. a concentração inibitória 50% (Cl_{50}), que correspondeu a 1,91 µM, valor obtido pela divisão da concentração inibitória pelo peso molecular da ApG, variando de 0,53 a 3,42 µM com intervalo de confiança de 95% ($r^2 = 0,8332$), sugerindo uma possível ação antioxidante desse flavonóide. Na avaliação de produção de óxido nítrico as médias indicaram uma redução significativa de 46 e 34% no conteúdo de nitrito *in vitro* nas concentrações 0,9 e 1,8 µL (p<0,01), quando comparado ao NPS e 53, 59 e 72% nas concentrações 3,6, 5,4 e 7,2 µL, respectivamente. O trolox produziu uma diminuição significativa de 66,35% (p<0,001), com Cl_{50} a 6,97 µg/mL, variando de 4,1 a 10,9 µg/mL ($r^2 = 0,81$) a ApG diminuiu significativamente a produção de nitrito, demonstrando novamente sua propriedade antioxidante contra danos causados pelos radicais livres a ApG demonstrou uma diminuição significativa desse composto, apontando para um potencial protetor *in vitro* das biomoléculas, como lipídios das membranas celulares.

Determinação *in vitro* da atividade anticolinesterásica do composto isolado.

Nos estudos *in vitro*, foi verificado uma inibição da atividade da AChE de 92,02% quando usado a Neostigmina (Exelon®) como controle positivo em concentração de 0,1%. A substância isolada ApG, nas concentrações de 0,1, 0,05, 0,0125 e 0,00625%, mostrou inibição de 76,86 - 54,78- 49,46- e 47,87 % na atividade da AChE, respectivamente. Também foi determinada, a concentração inibitória 50% (Cl_{50}), que correspondeu a 1,91 µM, variando de 0,53 a 3,42 µM com intervalo de confiança de 95% ($r = 0,3832$).

Em ensaio com as diversas substâncias, os valores foram avaliados para concentração inibitória de 50% (Cl_{50}) de dois flavonoides puros referidos na bibliografia como inibidores da AChE, como a quercetina (Orhana, et al. 2007; KHAN, et al. 2009) e a macluraxanthone (KHAN, et al. 2009) que inibiu a enzimas, com IC_{50} com valores de 353,86 e 8,47 µM apresentando um efeito inibitório de 76,2 % contra a AChE.

A ApG apresentou um valor de Cl_{50} de 1,91 µM, valor este que se encontra próximo do intervalo de valores de Cl_{50} encontrado na literatura para a galantamina (0,39 a 1,5 µM) uma substância de origem natural utilizada para o tratamento da doença de Alzheimer.

Vários estudos feitos demonstram uma possível a ação dos flavonóides como agentes antioxidantes e está assente que o mecanismo de ação tem por base a modulação de sinal das vias intracelulares importantes para a função celular. Além disso, Fan e colaboradores (2008) afirmam que uma porção de glicídica na molécula é necessária para uma inibição de AChE. A sua baixa toxicidade e elevada acessibilidade tem demonstrado ser o caminho mais favorável na obtenção de compostos biologicamente ativos para prevenir e tratar danos causados pelo estresse oxidativo (GOMES et al., 2008).

CONCLUSÃO

Diante dos resultados o presente trabalho contribuirá para investigações futuras por meio da pesquisa com uma molécula bioativa originada de um composto natural, que já mostram resultados promissores nos testes antioxidantes *in vitro*, além que mais estudos são necessários para elucidar os possíveis mecanismos de ação antioxidante, foi constatado que apigenina 7-β-O-glicopiranosídeo poderá ser utilizada, após mais estudos, em formulação de produto(s) farmacêutico(s) para a prevenção e/ou tratamento da Doença de Alzheimer, patologia associada à redução de neurotransmissores cerebrais.

REFERÊNCIAS

- BASU, S.; HAZRA, B. Evaluation of nitric oxide scavenging activity, *in vitro* and *ex vivo*, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. *Phytotherapy Research*. 2006. v. 20, n. 10, p. 896-900.
- ELLMAN, G. L., Courtney, D. K., Andres, V. Jr., Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, p 88-95, 1961.
- ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R.J.; ZOLLNER, H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Bio Med.* v.11, n. 1, p. 81-128.
- FERREIRA PMP, MILITÃO GCG, FREITAS RM. 2009. Lipoic acid effects on lipid peroxidation level, superoxide dismutase activity and monoamines concentration in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 464: 131-134.
- FAN P., AE HAY, A. MARSTON, K. HOSTETTMANN. Atividade inibidora da acetilcolinesterase de linarin de *Buddleja davidii*, relações estrutura-atividade de flavonóides relacionados, e químicos de investigação *Buddleja* nítida. *Pharm. Biol.*, 46 (2008), pp 596-601.
- GATÉ, L.; PAUL, J.; NGUYEN, B.A.; TEW, K.D.; TAPIERO, H. 1999. Oxidative stress induced in pathologies: the role of oxidants. *Biomed. & Pharmacother.* v. 53, p. 169-180.
- GUIMARÃES, A.G.; OLIVEIRA, G.F.; MELO, M.S.; CAVALCANTI, S.C.; ANTONIOLLI, A.R.; BONJARDIM, L.R.; SILVA, F.A.; SANTOS, J.P.A.; ROCHA, R.F.; MOREIRA, J.C.F.; ARAÚJO, A.A.; GELAINN, D.P.; QUINTANS-JÚNIOR L.J. 2010. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* v. 107, p. 949-957.
- JUDD, L.L. Mood disorders in the general population represent an important and world wide public health problem. *Int. Clin. Psychopharmacol.*, v. 10, n. 4, p. 5-10, 1995.
- KHAN, M.T.H., ORHAN I., ŞENOL F.S., KARTAL M., ŞENER B., DVORSKÁ M., ŠMEJKAL K., ŠLAPETOVÁ T. Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chemico-Biological Interactions*, 181(3), 383 - 389, 2009.
- LOPES, G.K.; SCHULMAN, H.M.; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* v. 1472, n. 1-2, p. 142-152, 1999.
- LUBIAN, C.T et al. Atividade antifúngica do extrato aquoso de *Arctium minus* (Hill) Bernh. (Asteraceae) sobre espécies orais de *Candida*. *Rev. bras. plantas med.*, vol.12, n.2, pp. 157-162, 2010.
- MANDELKER L., Cellular effects of comom antioxidants. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 38:199-211, 2008.
- OLIVEIRA AA, ALMEIDA JPC, FREITAS RM, NASCIMENTO VS, AGUIAR LMV, JÚNIOR HVN, FONSECA FN, VIANA GSB, SOUSA FCF, FONTELES MMF. 2007. Effects of levetiracetam in lipid peroxidation level, nitrite-nitrate formation and antioxidant enzymatic activity in mice brain after pilocarpine-induced seizures. *Cell Mol Neurobiol.* 27: 395-406.
- ORHANA I., KARTALB M., TOSUNA F., SENER B. Z. Screening of Various Phenolic Acids and Flavonoid Derivatives for their Anticholinesterase. *Potential Naturforsch*, 62, 829, 2007.

MOYO M, NDHLALA AR, FINNIE JF, VAN STADEN J. Phenolic composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Sclerocarya birrea* and *Harpephyllum caffrum* (Anacardiaceae) extracts. **Food Chemistry** 123: 69-76, 2010.

YOSHIKAWA, MASAYUKI; LI, XUEZHENG; NISHIDA, ERIKO; NAKAMURA, SEIKOU; MATSUDA, HISASHI; MURAOKA, OSAMU; MORIKAWA, TOSHIO. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin** (2008), 56(4), 559-568

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e a FAPEPI pelo apoio financeiro.

CN02 - Atividade antioxidante *in vitro* da fração rica em casearinas extraída das folhas de *Casearia sylvestris* Sw

Éverton José Ferreira de Araújo^{1*} (IC), Oskar Almeida Silva¹, Paulo Michel Pinheiro Ferreira^{1,2} (PQ), Rivelilson Mendes de Freitas¹

1. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental, Universidade Federal do Piauí (NTF/LAPNEX/UFPI), 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

2. Departamento de Ciências Biológicas, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, Universidade Federal do Piauí (CSHNB-UFPI), 64.600-000, Picos, Piauí, Brasil.

*Autor principal

Email: everton_araujo@ufpi.edu.br

Palavras-chave: Antioxidante, *Casearia sylvestris*, casearinas, nitrito, radical hidroxila.

RESUMO

Atualmente a busca por antioxidantes derivados de frutas e vegetais vem aumentando consideravelmente devido ao fato do estresse oxidativo participar diretamente na gênese e evolução de várias patologias como o câncer e distúrbios neurológicos. A *Casearia sylvestris* Swartz, espécie pertencente à família Salicaceae popularmente conhecida como guaçatonga, possui vasta aplicação na medicina folclórica brasileira indicada, por exemplo, no tratamento de ferimentos e envenenamentos ofídicos. Investigações fitoquímicas revelam a presença de diterpenos clerodânicos conhecidos como casearinas, sobretudo nas folhas da planta, aos quais são atribuídos as propriedades farmacológicas da espécie. O presente estudo visa caracterizar a atividade antioxidante *in vitro* da fração rica em casearinas obtida das folhas da *C. sylvestris*, por meio de reações químicas que avaliam o potencial dos diterpenóides em reduzir a formação dos radicais livres nitrito e hidroxila baseado nas reações de Griess e de Fenton, respectivamente. As casearinas reduziram significativamente os níveis de nitrito, sobretudo na concentração de 7,2 µg/mL, onde obtivemos 50% de redução, enquanto a CI50 foi de 3,737 µg/mL. Houve também maior diminuição na produção dos radicais hidroxila com a maior concentração da FC, porém neste caso com uma porcentagem superior (61,61%) e com um valor de CI50 de 6,454 µg/mL. Os resultados sugerem que a guaçatonga é dotada de ação antioxidante *in vitro* perante os radicais nitrito e hidroxila, porém exige-se a constatação desta característica em sistemas orgânicos, pois a FC não demonstrou ser capaz de reduzir o dano oxidativo de modo superior ao Trolox.

INTRODUÇÃO

A oxidação quimicamente é definida como a transferência de elétrons entre átomos. Trata-se de um fenômeno naturalmente presente nos processos metabólicos das células humanas que, entretanto, pode ser exacerbado por substâncias pró-oxidantes ou originar radicais livres reativos causadores de danos oxidativos. Os radicais livres são produzidos majoritariamente nas organelas citoplasmáticas e estão envolvidos em reações bioquímicas, na produção de energia, sinalização intracelular e fagocitose, porém em excesso causam efeitos deletérios em nível de DNA, proteínas, lipídios e membranas celulares ocasionando distúrbio degenerativo conhecido como estresse oxidativo (ALVES et al., 2010).

Atualmente a busca por moléculas antioxidantes, principalmente derivadas de frutas e vegetais, vem aumentando consideravelmente devido ao fato do estresse oxidativo participar diretamente na gênese e evolução de várias patologias como, por exemplo, o câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, enfermidades neurológicas e no processo de envelhecimento precoce. Além disso, o aumento da expectativa de vida da população torna crucial o desenvolvimento de novas estratégias e terapias de combate às doenças crônicas (ALAM et al., 2012).

A *Casearia sylvestris* Swartz, espécie pertencente à família Salicaceae, é encontrada na América do Sul e possui vasta aplicação na medicina folclórica brasileira. Trata-se de uma planta medicinal, popularmente conhecida como guaçatonga, indicada no tratamento de ferimentos, úlceras gástricas e envenenamentos ofídicos, dotada de propriedades anti-inflamatórias e antitumorais. Investigações fitoquímicas revelam a presença significativa de diterpenos clerodânicos conhecidos como casearinas (Ilustração 1), sobretudo nas folhas da planta, aos quais são atribuídos as propriedades farmacológicas da *C. sylvestris* (FERREIRA et al., 2011; SANTOS et al., 2007).

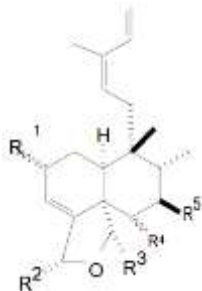


Ilustração 1. Estrutura química geral das casearinas.

Baseado no que foi exposto este estudo visa caracterizar a atividade antioxidante *in vitro* da fração rica em casearinas obtida das folhas da *C. sylvestris*, por meio de reações químicas que avaliam o potencial dos diterpenóides em reduzir a formação dos radicais livres nitrito (NO₂[•]) e do radical hidroxila (•OH).

MATERIAL E MÉTODOS

A fração rica em casearinas (FC) foi obtida a partir do extrato etanólico das folhas da *C. sylvestris* por colaboradores do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho e do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais - NuBBE, do Instituto de Química da UNESP (Araraquara, São Paulo) por meio do fracionamento em fase sólida empregando carvão ativo/sílica gel 60-200 mm (1:1, m/m), como fase estacionária, e os eluentes hexano/acetato de etila (95:5, v/v), acetato de etila e metanol. A atividade da FC como sequestradora do radical nitrito foi realizada mediante a reação de 0,5 mL do reagente de Griess com 0,5 mL de diferentes concentrações de FC (0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg/mL) em meio reacional contendo nitroprussiato de sódio (NPS) 10 mM em tampão fosfato 20 mM pH 7,4 cuja absorvância foi analisada a 540 nm. A ação contra o radical hidroxila (•OH), produzido mediante a reação de Fenton, foi quantificada usando a degradação oxidativa da 2-desoxirribose a malonaldeído (MDA) por meio da adição da FC nas mesmas concentrações citadas anteriormente ao meio reacional contendo sulfato ferroso 6 mM, 2-desoxirribose 5 mM, H₂O₂ 100 mM e tampão fosfato (pH 7,2) 20 mM seguido da aferição das absorvâncias a 532

nm. Em ambos os experimentos, antes da adição aos meios reacionais, a FC foi devidamente diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) a 4% em água purificada. Para fins de controle utilizamos o Trolox, análogo hidrossolúvel do tocoferol, como padrão antioxidante de referência.

Os dados obtidos foram analisados com o software GraphPad Prism® versão 5.01 e avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste t-Student-Newman-Keuls como post hoc teste e apresentados como a média ± erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,001$. A porcentagem de inibição dos radicais livres (I%) foi determinada em função das medidas das absorvâncias por meio da seguinte equação (REANMONGKOL et al., 1994):

$$I\% = 100 \times (Ac - AT) / Ac$$

onde, Ac é a absorvância do controle, obtida do meio reacional sem a amostra e AT é o valor da substância testada, ou seja, a FC. A concentração de inibição de 50% das espécies reativas (CI₅₀) foi calculada a partir dos gráficos de I% e com o auxílio do GraphPad Prism®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Realizamos uma pesquisa visando caracterizar e expandir as informações sobre o poder antioxidante das casearinas isoladas das folhas da guatonga por meio de ensaios antioxidantes ainda não realizados com a *C. sylvestris* (FERREIRA et al., 2011). O método proposto para determinar a ação sequestradora do radical nitrito, conforme descrito anteriormente, foi baseado na decomposição do NPS em óxido nítrico em pH fisiológico, o qual em condições aeróbicas produz os nitritos que foram quantificados espectrofotometricamente pela reação com o reagente de Griess.

Os resultados corroboram que houve uma redução gradual e significativa ($p < 0,001$) na produção de nitrito com o aumento da concentração da FC em relação ao meio de produção deste radical (NPS) em 26,22, 30,44, 38,23, 43,73 e 50% respectivamente. Entretanto o Trolox, droga antioxidante de referência, reduziu a produção de nitrito em 59,76% (Ilustração 2). A concentração da FC capaz de inibir em 50% (CI₅₀) a produção de nitrito foi de aproximadamente 3,737 µg/mL variando de 2,823 a 4,948 µg/mL com 95% de intervalo de confiança.

Ilustração 2. Avaliação dos efeitos da fração rica em casearinas (FC) contra a formação do radical nitrito in vitro.



Efeitos da fração rica em casearinas (FC) na remoção do metabólito nitrito. O Trolox 0,45 nM foi usado como padrão antioxidante. Os valores representam a média ± E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, $n = 5$, experimentos em duplicata. ^a $p < 0,001$ em relação ao NPS (ANOVA e t-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste); ^b $p < 0,001$ comparado ao veículo (DMSO 4%) (ANOVA e t-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Estes resultados são superiores àqueles demonstrados por Serafini e colaboradores (2011) com o extrato aquoso das folhas de *Morinda citrifolia* L., espécie com ampla divulgação na medicina tradicional brasileira, regionalmente conhecida como noni. Para estes pesquisadores, o extrato das folhas da planta na concentração de 100 µg/mL reduziu em apenas 11% a produção de óxido nítrico no mesmo sistema reacional utilizado em nosso estudo. Além disso, Napolitano e colaboradores (2005) relataram que a *C. sylvestris* tem capacidade imunomodulatória contra a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos em processos inflamatórios. Neste mesmo trabalho o extrato hexânico da casca da raiz da planta produziu $97,1 \pm 5,4\%$ de inibição na produção de óxido nítrico, porém na concentração de 50 µg/mL, o que demonstra proporcionalmente, que a FC extraída das folhas possui a atividade superior.

Em relação à formação do radical hidroxila, todas as concentrações testadas de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg/mL da fração rica (FC) reduziram significativamente a concentração do radical livre em relação ao meio responsável pela sua produção, com diminuição de 10,55, 23,99, 42,72, 54,54 e 61,61% respectivamente, enquanto o Trolox promoveu a redução do radical em 78,06% em relação ao sistema ($p < 0,001$; Ilustração 3). A CI₅₀ neste caso foi de 6,454 µg/mL com uma margem de variação de 5,713 a 7,291 µg/mL com um intervalo de confiança de 95%. Desta forma, podemos perceber que o perfil de redução dos radicais livres da ilustração 2 é semelhante ao da ilustração 3, ou seja, mais uma vez houve maior diminuição na produção dos radicais com a maior concentração da FC, porém neste caso com uma porcentagem superior.

Ilustração 3. Avaliação dos efeitos da fração rica em casearinas (FC) contra a formação de radical hidroxila in vitro.



Efeitos da fração rica em casearinas (FC) na remoção de radical hidroxila. O Trolox 0,45 nM foi usado como padrão antioxidante. Os valores representam a média ± E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, $n = 5$, experimentos em duplicata. ^a $p < 0,001$ em relação ao sistema reacional (ANOVA e t-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste); ^b $p < 0,001$ versus o veículo (ANOVA e t-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Nossos resultados quanto à atividade "varredora" de radicais hidroxila são relevantes se comparados aos resultados obtidos por Awah e colaboradores (2010) ao estudarem as propriedades de *Stachytarpheta angustifolia* V., planta medicinal africana caracterizada por melhorar a condição de pacientes HIV positivos ao reduzir o estresse oxidativo decorrente da infecção. Segundo os pesquisadores, o extrato etanólico das folhas dessa planta inibe consideravelmente a degradação da 2-desossirribose pelo radical hidroxila, produzido em um ensaio ferro-dependente semelhante ao do nosso trabalho, com uma CI₅₀ de $99,43 \pm 1,71$ µg/mL em relação ao tocoferol o que demonstra comparativamente a significativa atividade protetora da FC contra o radical hidroxila.

Devemos também salientar que existe a necessidade da comprovação da atividade antioxidante por meio de testes *in vivo* visto que, a presença de atividade antioxidante *in vitro* não garante a manutenção do potencial antioxidante da FC em sistemas orgânicos, principalmente devido ao fato das casearinas apresentarem atividade antioxidante *in vitro* inferior ao Trolox (Ilustrações 2 e 3). Isto porque o poder antioxidante de uma substância não depende somente da sua reatividade química, mas também da sua interação com as moléculas orgânicas e da influência que o meio biológico exerce sobre ela. Além disso, a solubilidade, a concentração e a complexidade dos constituintes das plantas medicinais são fatores que podem ser alterados quando estes componentes são isolados ou sofrer variação dentro do organismo, modificando assim sua atividade antioxidante (HALLIWELL, 1995; ALVES, 2010).

CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados foi possível verificar o potencial antioxidante das casearinas diante de espécies reativas comparativamente com constituintes de produtos naturais obtidos de outras plantas medicinais citadas na literatura. Entretanto, a FC não demonstrou ser capaz de reduzir o dano oxidativo de modo superior ao Trolox, o que levanta a possibilidade desta fração não possuir as mesmas propriedades antioxidantes in vivo. Logo, podemos concluir que a guaçatonga é realmente dotada de ação antioxidante in vitro perante os radicais nítrico e hidroxila, porém exige-se a constatação desta característica em sistemas orgânicos.

REFERÊNCIAS

- ALAM, M. N.; BRISTI, N.J.; RAFIQUZZAMAN. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal, 2012.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. Química Nova, v. 33, n.10, p.2202-2210, 2010.
- AWAH, F.M.; UZOEGWU, P.N.; OYUGI, J.O.; RUTHERFORD, J.; IFEONU, P.; YAO, X-J.; FOWKE, K.R.; EZE, M.O. Free radical scavenging activity and immunomodulatory effect of *Stachytarpheta angustifolia* leaf extract. Food Chemistry, v.119, p.1409-1416, 2010.
- FERREIRA, P.M.P.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; BARROS, F.W.A.; MARTINS, A.M.A.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; SANTOS, A.G.; PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v.83, p.1373-1384, 2011.
- HALLIWELL, B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. Biochemical Pharmacology, v.49, p.1341-1348, 1995.
- NAPOLITANO, D.R.; MINEO, J.R.; SOUZA, M.A.; PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S.; ESPINDOLA, F.S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. Journal of Ethnopharmacology, v.99, p.35-41, 2005.
- REANMONGKOL, W.; MATSUMOTO, K.; WATANABE, H.; SUBHADHIRASAKUL, S.; SAKAI, S.I. Antinociceptive and antipyretic effects of alkaloids extracted from the stem bark of *Hunteria zeylanica*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, v.17, p.1345-1350, 1994.
- SANTOS, A.G.; PEREZ, C.C.; TININIS, A.G.; BOLZANI, V.S.; CAVALHEIRO, A.J. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. Química Nova, v.30, n.5, p.1100-1103, 2007.
- SERAFINI, M.R.; SANTOS, R.C.; GUIMARÃES, A.G.; SANTOS, J.P.A.; SANTOS, A.D.C.; ALVES, I.A.; GELAIN, D.P.; NOGUEIRA, P.C.L.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; BONJARDIM, L.R.; ARAÚJO, A.A.S. Morinda citrifolia Linn Leaf Extract Possesses Antioxidant Activities and Reduces Nociceptive Behavior and Leukocyte Migration. Journal of Medicinal Food, v.14, n.10, p.1159-1166, 2011.

CN03 - Avaliação *in vivo* de um nanocarreador transdérmico contendo fenobarbital na epilepsia induzida por pilocarpina: resultados preliminares e perspectivas

Kayo Alves Figueiredo^{1*} (PG), Shirlene Cesário Medeiros² (IC), André Luis Menezes Carvalho² (PQ), Rivellison Mendes de Freitas¹ (PQ)

1. Universidade Federal do Piauí – Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
2. Universidade Federal do Piauí – Curso de Graduação em Farmácia

* Autor principal

kayo.figueiredo@hotmail.com

Palavras-chave: Epilepsia. Fenobarbital. Nanocarreador transdérmico. Ratos

RESUMO

Esse trabalho objetivou avaliar um sistema transdérmico microemulsionado contendo fenobarbital frente ao modelo de epilepsia induzida por pilocarpina em ratos e traçar ainda perspectivas para a continuação de sua avaliação farmacológica utilizando outras metodologias. O nanocarreador transdérmico foi aplicado no dorso depilado de ratos Wistar. Os animais foram tratados com salina 0,9%, microemulsão contendo fenobarbital 5 e 10% 40 mg/kg t.p., fenobarbital 5% em creme base não iônico 40 mg/kg t.p. e fenobarbital solução 40 mg/kg v.o. Após 60 min, os grupos foram tratados com pilocarpina (400 mg/kg, i.p.) e observados durante 1 h e o número de mortes contabilizadas durante 24 h após a administração. Foram avaliados também a presença de sinais colinérgicos periféricos, movimentos estereotipados e tremores. Os animais apresentaram piloereção, cromodacriorréia, tremores, diarreia, diurese, salivação e movimentos estereotipados de coçar, rearing (levantar), mastigar, entre outros. O fenobarbital 40 mg/Kg incorporado a 10% em microemulsão foi capaz de aumentar o tempo de latência para o estado de mal epilético ($p < 0,0228$) e para a morte do animal ($p < 0,0127$) e evitou o desenvolvimento das crises epiléticas em aproximadamente 50 e 100% nos grupos ME-FEN 10% 40mg/Kg e ME-FEN 5% 40mg/Kg, respectivamente. Nos outros grupos, as mortes foram evitadas em 80 a 100% dos animais. Os resultados desse estudo demonstram pela primeira vez demonstrar a capacidade do fenobarbital em um nanocarreador transdérmico em reduzir as crises epiléticas induzidas por pilocarpina em animais experimentais quando administrado por uma via alternativa e com resultados semelhantes à administração oral.

INTRODUÇÃO

A epilepsia é um distúrbio cerebral causado por predisposição persistente do cérebro a gerar crises epiléticas e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicossociais e sociais da condição, caracterizada pela ocorrência de pelo menos uma crise epilética (GUILHOTO; MUSZKAT; YACUBIAN, 2006). É um dos distúrbios neurológicos graves mais comuns em todo o mundo, a qual pode ser controlada com sucesso com um único antiepilético (DALMORA; SANGOI; NOGUEIRA et al., 2010).

Na última década foi observado um grande avanço no tratamento das epilepsias incluindo as novas drogas descobertas, novas formulações de antigas drogas, entre outros. Como estratégia geral para o tratamento de todas as epilepsias, vários especialistas sugerem o uso de drogas em monoterapia (BETTING et al., 2003).

O fenobarbital é um barbitúrico utilizado no tratamento de diferentes formas de epilepsia pediátrica e estado de mal epilético, sendo uma droga de primeira linha para o controle de crises epiléticas neonatais (DJABRI; GUY; DELGADO-CHARRO, 2012). Apresenta como vantagens o baixo custo, o amplo espectro de ação e a facilidade de uso (DALMORA; SANGOI; NOGUEIRA et al., 2010). Este fármaco possui boa biodisponibilidade oral, entretanto pode apresentar flutuações nos níveis plasmáticos em pacientes pediátricos (TOUW et al., 2000).

A administração tópica de fármacos com finalidade transdérmica é conhecida como uma via alternativa da administração oral de ativos medicamentosos e oferece muitas vantagens como a ausência de efeito de primeira passagem, o fato de ser indolor e a facilidade de aplicação (SILVA; SANTANA; BEDOR et al., 2009). Transdermicamente, os fármacos, normalmente, não conseguem penetrar o estrato córneo, sendo a pele considerada como uma barreira que deixa penetrar apenas algumas substâncias em determinadas condições (OLIVEIRA; SCARPA; CORREA et al., 2004).

Os sistemas microemulsionados podem funcionar como nanocarreadores transdérmicos para diversos fármacos. São sistemas termodinamicamente estáveis e com partículas nanométricas de dois líquidos imiscíveis (usualmente água e óleo) estabilizados por um filme de compostos tensoativos, localizados na interface óleo/água (OLIVEIRA; SCARPA; CORREA et al., 2004). Recentemente, uma grande quantidade de estudos voltou-se para o emprego de microemulsões como sistema carreador de fármacos (DAMASCENO; SILVA; OLIVEIRA, et al., 2011).

Tendo em vista as inúmeras vantagens da administração transdérmica de fenobarbital incorporado em nanocarreador transdérmico, o objetivo deste trabalho foi avaliar o referido sistema transdérmico microemulsionado frente ao modelo de epilepsia induzida por pilocarpina em ratos e traçar ainda perspectivas para a continuação de sua avaliação farmacológica utilizando outras metodologias.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Ratos Wistar fêmeas (n = 5-7/grupo), com peso entre 180-240 g foram adquiridos no Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da UFPI. Esses foram alojados em uma sala mantida a 25 ± 1 °C, com uma alternância de 12 h de ciclo claro-escuro. Os pelos da região dorsal dos animais foram removidos em uma região de 4 cm² por meio de depilador elétrico. Todos os experimentos propostos foram previamente submetidos à avaliação do Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI (Protocolo 089/12).

Modelo de epilepsia induzida por pilocarpina

Foi aplicado no dorso depilado de ratos Wistar uma quantidade de microemulsão correspondente a 40 mg/Kg de fenobarbital. Os animais foram tratados com salina 0,9% (controle negativo), microemulsão contendo fenobarbital nas concentrações de 5 e 10% 40 mg/Kg via tópica (t.p.), fenobarbital 5% em creme base não iônico na dose de 40 mg/Kg t.p. e fenobarbital solução 40 mg/Kg v.o. (controle positivo). Após 60 min, os grupos foram tratados com pilocarpina (400 mg/Kg, i.p.) e observados durante 1 h e o número de mortes contabilizadas em 24 h após a administração. Após os tratamentos, os grupos foram colocados em gaiolas para observação dos seguintes parâmetros: sinais colinérgicos periféricos (SCP), tremores, movimentos estereotipados (MET), crises epiléticas, estado de mal epilético (EME) e a taxa de mortalidade, a latência de instalação da primeira crise epilética e a latência de desenvolvimento de estado de mal epilético.

Perspectivas para avaliação das crises epiléticas: avaliação bioquímica, histopatológica, permeação in vitro e biodisponibilidade do fenobarbital após administração transdérmica

De forma a avaliar o efeito do fenobarbital em prevenir o estresse oxidativo gerado pela pilocarpina em certas áreas cerebrais, serão parâmetros bioquímicos envolvidos no dano cerebral no hipocampo de ratos após os experimentos farmacológicos de crises epiléticas. Todos os grupos estudados nesse experimento tiveram seu cérebro removido e conservado em formaldeído 10% para a realização de análise histopatológica e comparar lesões em diversas áreas cerebrais induzidas pela pilocarpina. Em outra parte destes animais, o hipocampo foi removido e pesado para ser usado nas dosagens de catalase, superóxido dismutase (SOD) e glutadiona sintetase (GSH). Esses experimentos ainda serão realizados e todos os grupos serão avaliados quanto aos níveis dessas enzimas nos diferentes grupos analisados.

A pele de rato é bem menos espessa do que a pele humana. Desta forma, a microemulsão contendo fenobarbital será avaliada quanto a sua capacidade de permear através de membranas biológicas semelhante a pele de humanos. Para isso, será utilizada pele de orelha de porco obtida em matadouro de Teresina. As amostras de microemulsão serão aplicadas no compartimento doador de células de difusão de Franz. Serão realizadas coletas do meio receptor em tempos entre 0-24 h e será realizada quantificação em HPLC do fenobarbital permeado. Dessa forma, avaliar-se-á a capacidade do fenobarbital incorporado em nanocarreador transdérmico permear membranas biológicas semelhantes à pele humana.

Para se analisar a quantidade de fármaco que se encontra na corrente sanguínea após administração transdérmica de fenobarbital, será realizado um estudo de biodisponibilidade em ratos. A administração pela via transdérmica será comparada à administração oral e amostras de sangue (0,5 mL) serão coletadas em diferentes tempos de até 48 h. Análise do fenobarbital na amostra biológica será realizada utilizando metodologia analítica de acordo com o método por HPLC relatado na literatura (DALMORA; SANGOI; NOGUEIRA et al., 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando administrada por via sistêmica em ratos adultos em doses superiores a 350 mg/Kg, a pilocarpina induz uma gama de alterações comportamentais persistentes. A acinesia, automatismos gustativos e tremores de cabeça dominam a atividade motora dos animais em cerca de 5-10 min após injeção deste fármaco. Após 10-15 min, esse comportamento progride para crises epiléticas motoras, com a presença de rearing (movimentos de levantar), movimentos de coçar, salivação intensa e movimentos mastigatórios. Crises epiléticas motoras límbicas iniciam em 20-30 min e se repetem a cada 2-5 min, levando ao estado de mal epilético em aproximadamente 50-60 min (CAVALHEIRO; SILVA; TURSKI, 1987).

Após administração intraperitoneal de pilocarpina 400 mg/Kg os animais apresentaram mudanças comportamentais semelhante ao aumento da estimulação colinérgica, como piloereção, cromodacriorréia, tremores, diarreia, diurese, salivação e movimentos estereotipados de coçar, rearing (levantar), mastigar, entre outros. Os dados obtidos foram semelhantes aos descritos na literatura (FREITAS, 2006). Os animais que receberam fenobarbital apresentaram redução de MET, mas não de SCP e tremores. Essa redução foi menos acentuada no grupo P400 + CR-FEN 5% 40mg/Kg (Tabela 1).

Tabela 1. Alterações comportamentais no pré-tratamento dos animais com nanocarreador transdérmico contendo fenobarbital sob as crises epiléticas induzidas por pilocarpina.

Grupo	SCP (%)	MET (%)	Tremores (%)	Cris. Epilépt. (%)
P400	100,0	100,0	100,0	100,0
P400 + ME-FEN 10% 40mg/Kg	100,0	50,0	100,0	50,0
P400 + ME-FEN 5% 40mg/Kg	100,0	66,6	100,0	-
P400 + CR-FEN 5% 40mg/Kg	100,0	80,0	100,0	50,0
P400 + FEN 40mg/Kg	100,0	57,1	100,0	-

P=Pilocarpina; ME=Microemulsão; FEN=Fenobarbital; SCP=Sina is colinérgicos periféricos; MET=Movimentos estereotipados. O grupo P400 foi tratado com pilocarpina (400 mg/Kg, i.p., n = 5). Os grupos P400 + ME-FEN 10% 40mg/Kg e P400 + ME-FEN 5% 40mg/Kg (n = 6) foram tratados respectivamente com microemulsão contendo fenobarbital 10% e 5% na dose de 40 mg/Kg e, 1 h depois, receberam pilocarpina. O grupo P400 + CR-FEN 5% 40mg/Kg (n = 6) foi tratado com creme base não iônico contendo fenobarbital 5% na dose de 40 mg/Kg e, 1 h depois, recebeu pilocarpina. O grupo P400 + FEN 40mg/Kg (n = 7) foi tratado com solução de fenobarbital na dose de 40 mg/Kg v.o. e, 1 h depois, recebeu pilocarpina. Os resultados foram expressos como porcentagem (%).

Após a aplicação tópica do fenobarbital incorporado em microemulsão, foi possível observar que houve alterações nos parâmetros analisados quanto às crises epiléticas induzidas por pilocarpina em relação ao grupo controle (Tabela 2). O fenobarbital 40 mg/Kg incorporado a 10% em microemulsão foi capaz de aumentar o tempo de latência para o estado de mal epilético (p=0,0228) e para a morte do animal (p=0,0127). Foi capaz ainda de evitar o desenvolvimento das crises epiléticas em cerca de 50 e 100% nos grupos ME-FEN 10% 40mg/Kg e ME-FEN 5% 40mg/Kg, respectivamente (Tabela 1). Nos outros grupos, as mortes foram evitadas em 80 a 100% dos animais. A dose de fenobarbital capaz de evitar o aparecimento de crises epiléticas em neste trabalho foi menor àquela capaz de evitar crises epiléticas motoras em 50% dos animais em um estudo americano, com um ED50 de 47 mg/Kg (WALTON; TREIMAN, 1989).

Tabela 2. Efeito do pré-tratamento dos animais com nanocarreador transdérmico contendo fenobarbital sob as crises epiléticas induzidas por pilocarpina.

Grupo	Lat. Cris. Epilépt. (min)	Lat. EME (min)	Lat. morte (min)	Número de Mortes 1 – 24 h	Sobrev. (%)
P400	14,6±1,43	16±1,68	19,8±1,83	-	0
P400 + ME-FEN 10% 40mg/Kg	17±3,36	24±1,18*	28,33±0,24*	-	50,0
P400 + ME-FEN 5% 40mg/Kg	-	-	-	1	83,3
P400 + CR-FEN 5% 40mg/Kg	35,0	-	-	1	80,0
P400 + FEN 40mg/Kg	-	-	-	-	100,0

P=Pilocarpina; ME=Microemulsão; FEN=Fenobarbital; EME=Esta do de mal epilético. O grupo P400 foi tratado com pilocarpina (400 mg/Kg, i.p., n = 5). Os grupos P400 + ME-FEN 10% 40mg/Kg e P400 + ME-FEN 5% 40mg/Kg foram tratados respectivamente com microemulsão contendo fenobarbital 10% e 5% na dose de 40 mg/Kg e, 1 h depois, receberam pilocarpina. O grupo P400 + CR-FEN 5% 40mg/Kg foi tratado com creme base não iônico contendo fenobarbital 5% na dose de 40 mg/Kg e, 1 h depois, recebeu pilocarpina. O grupo P400 + FEN 40mg/Kg foi tratado com solução de fenobarbital na dose de 40 mg/Kg v.o. e, 1 h depois, recebeu pilocarpina. Os resultados foram expressos como média±epm. *p<0,05, Teste de Student.

Os resultados deste estudo veem pela primeira vez demonstrar a capacidade do fenobarbital incorporado em nanocarreador transdérmico em reduzir as crises epiléticas induzidas por pilocarpina em animais experimentais quando administrado por uma via alternativa e com resultados semelhantes à administração oral. Além disso, houve redução do número de mortes e de MET nesses grupos. O aumento do teor de fármaco e a consequente diminuição proporcional da quantidade de microemulsão administrada no grupo P400 + ME-FEN 10% 40 mg/Kg pode ter dificultado a absorção do fármaco administrado e consequente diminuição do percentual de sobreviventes em relação aos outros grupos. Apenas um dos animais do grupo P400 + CR-FEN 5% 40 mg/Kg apresentou crises epiléticas e morreu entre 1-24 h, apresentando resultado semelhante ao grupo P400 + ME-FEN 5% 40 mg/Kg.

Esse estudo preliminar apresentou resultados positivos na redução do número de animais que apresentaram crises epiléticas e no número de mortes em relação ao grupo controle. No entanto, estudos adicionais são necessários de forma a melhor avaliar a diferença observada entre os grupos, bem como avaliar a possível neuroproteção induzida pelo fenobarbital, sua capacidade de permear tecidos epidérmicos semelhantes à pele humana e sua biodisponibilidade em roedores quando administrado por via transdérmica.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados desse estudo, foi possível observar que o fenobarbital incorporado em nanocarreador transdérmico foi capaz de aumentar o tempo de latência para o estado epilético e para a morte dos animais, bem como reduzir o percentual de crises epiléticas, de mortes e de movimentos estereotipados em relação ao grupo controle.

REFERÊNCIAS

- BETTING, L.E.; KOBAYASHI, E.; MONTENEGRO, M.A.; MIN, L.L.; CENDES, F.; GUERREIRO, M. M.; GUERREIRO, C. A. M. Tratamento de epilepsia: consenso dos especialistas brasileiros. Arquivos de Neuro-Psiquiatria, v. 61, p. 1045-1070, 2003.
- CAVALHEIRO, E. A.; SILVA, D. F.; TURSKI, W. A.; CALDERAZZO-FILHO, L. S.; BORTOLOTO, Z. A.; TURSKI, L. The susceptibility of rats to pilocarpine-induced seizures is age-dependent. Developmental Brain Research, v. 37, p. 43-58, 1987.
- DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, E. E.; SILVEIRA, W. L. L.; ARAÚJO, I. B.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, E. S. T. Microemulsão: um promissor carr eador para moléculas insolúveis. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 32, n. 1, p. 9-18, 2011.
- DJABRI, A.; GUY, R. H.; DELGADO-CHARRO, M. B. Passive and iontophoretic transdermal delivery of phenobarbital: Implications in paediatric therapy. International Journal of Pharmaceutical, 2012. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.02.026.
- FREITAS, R. M. Estudo farmacológico e neuroquímico da fase aguda d o processo convulsivo induzido por pilocarpina em áreas cerebrais de ratos adultos. Fortaleza: UFC, 2006. 332 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- GUILHOTO, L. M. F. F.; MUSZKAT, R. S.; YACUBIAN, E. M. T. Consenso terminológico da associação brasileira de epilepsia. Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology, v. 12, p. 175-177, 2006.
- DALMORA, S. L.; SANGOI, M. S.; NOGUEIRA, D. R.; D'AVILA, F. B.; MORENO, R. A.; SVERDLOFF, C. E.; OLIVEIRA, R. A.; BORGES, N. C. Determination of phenobarbital in human plasma by a specific liquid chromatography method: application to a bioequivalence study. Química Nova, v. 33, n. 1, p. 124-129, 2010.
- OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. Química Nova, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.
- SILVA, J. A.; SANTANA, D. P.; BEDOR, D. G. C.; BORBA, V. F. C.; LIRA, A. M. M.; EGITO, E. S. T. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. Química Nova, v. 32, n. 6, p. 1389-1393, 2009.
- TOUW, D. J.; GRAAFLAND, O.; CRANENDONK, A.; VERMEULEN, R.J.; VAN WEISSENBRUCH, M. M. Clinical pharmacokinetics of phenobarbital in neonates. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 12, n. 2, p. 111-116, 2000.
- WALTON, N. Y.; TREIMAN, D. M. Phenobarbital treatment of status epilepticus in a rodent model. Epilepsy Res., v. 4, p. 216-22, 1989.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Farmácia Escola da UFPI e ao Núcleo de Tecnologia Farmacêutica pela disponibilização dos laboratórios para a realização destes protocolos experimentais.

CN04 - Obtenção do extrato seco otimizado de *Bauhinia forficata* Link por atomização em spray dryer

Paula do Nascimento Batista^{1*} (PG), Thaisa Cardoso de Oliveira² (IC), Maria das Graças Freire de Medeiros³ (PQ), Lívio César Cunha Nunes³ (PQ).

1. Universidade Federal do Piauí – PPGCF/CAPES
2. Universidade Federal do Piauí – PIBIC/UFPI
3. Universidade Federal do Piauí - PPGCF

* Autor principal

paulabatista13@hotmail.com

Palavras-chave: *Bauhinia forficata* Link. Spray dryer. Secagem. Otimização

RESUMO

A *Bauhinia forficata* Link é uma planta largamente utilizada pela população e está presente na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) apresentando potencial para a produção de fitoterápicos. Por ser de grande interesse para a comunidade farmacêutica, existe o interesse em desenvolver métodos, processos e formulações a base deste vegetal para a obtenção de formas farmacêuticas.

Uma das operações mais frequentes na produção de medicamentos é a secagem, sendo empregada no processamento de diversos materiais para a obtenção de pós e grânulos. Com base nesses fatores, objetivou-se neste estudo desenvolver e otimizar método de secagem do extrato fluido de *Bauhinia forficata* L. através de spray dryer. A solução extrativa foi preparada a partir de 167 g do material vegetal e 1000ml de solução hidroetanólica (1:1). A secagem foi realizada em Mini spray-dryer (BUCHI B-290) e sua otimização foi feita através de planejamento fatorial, onde foram testadas concentrações diferentes de dois tipos de adjuvantes de secagem em diferentes proporções (Aerosil e Maltodextrina). As características visuais e de fluxo e o rendimento bruto da secagem foram parâmetros analisados para a escolha do melhor método de secagem. O rendimento bruto dos extratos mostraram resultados semelhantes, porém foi observado que os extratos que apresentaram maior concentração de maltodextrina apresentaram um rendimento inferior quando comparados aos de menor concentração da mesma. O extrato seco T2 (15% Aerosil + 10% Maltodextrina) foi o que apresentou melhores características com relação aos parâmetros avaliados neste estudo.

INTRODUÇÃO

A utilização das plantas para fins terapêuticos é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade e acompanha a evolução da história da farmácia e dos medicamentos. A demanda pela utilização de plantas medicinais na cura ou prevenção de doenças tem impulsionado a indústria farmacêutica na busca por espécies vegetais com potencial para o desenvolvimento de fitoterápicos. A matéria-prima para estes produtos é constituída, majoritariamente, por extratos secos, os quais dentre as suas vantagens incluem a maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, mais fácil padronização, maior concentração de compostos ativos e mais elevada capacidade de transformação em diferentes tipos de formas farmacêuticas sólidas (VEIGA-JUNIOR, 2008; SIMÕES, 2010; CUNHA, 2010).

Com o intuito de direcionar a pesquisas científicas na área, foi publicada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse para o Sistema Único de Saúde (RENISUS) que conta com 71 espécies vegetais com promissor potencial farmacológico para o desenvolvimento de produtos terapêuticos (BRASIL, 2009). Dentre as espécies divulgadas na RENISUS, figuram alguns representantes do gênero *Bauhinia*, sendo a *Bauhinia forficata* Link, umas das espécies mais estudadas no Brasil e que apresenta maior número de pesquisas quanto à atividade hipoglicemiante (SILVA & CECHINEL FILHO, 2002).

A maioria dos medicamentos fitoterápicos registrados no Brasil apresenta-se sob a forma farmacêutica sólida, utilizando extratos secos como principal matéria-prima ativa. A técnica de secagem por aspersão (spray drying) tem sido amplamente aplicada na obtenção de extratos secos com melhores características tecnológicas e maior concentração de constituintes com atividade biológica (OLIVEIRA E PETROVICK, 2010). Com base nesses fatores, objetivou-se neste estudo desenvolver e otimizar método de secagem do extrato fluido de *Bauhinia forficata* L. através de spray dryer para obtenção de produto tecnológico intermediário.

MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal de *B. forficata* L. foi obtido em Telêmaco Borba – PR (coletadas em abril/2010 na Fazenda Monte Alegre) adquirido através do fornecedor Klabin do Paraná Produtos Florestais Ltda, sendo a identificação botânica e depósito de exsicata realizado no Herbário da Universidade Estadual do Maringá, sob registro nº 150. A solução extrativa foi preparada a partir de 167 g das folhas secas e pulverizadas e 1000 ml de solução hidroetanólica (1:1), submetido a 200 rpm e 40°C por 1 hora. A determinação do resíduo seco da solução extrativa foi realizada de acordo como indicado na Farmacopéia Brasileira, 5ª edição.

O procedimento de secagem foi realizado em Mini spray-dryer (BUCHI B-290), utilizando como parâmetros fixos a temperatura de entrada (170 °C), a velocidade de fluxo (4 mL/min), a pressão (0,9 bar) e aspirador (90%). Foram utilizados o Aerosil (A) e a Maltodextrina (M) como adjuvantes de secagem em diferentes proporções e em concentrações baseando-se no resíduo seco: T1 – 15%A +15%M; T2 – 15%A + 10%M; T3 – 10%A + 15%M; T4 – 10% A+10%M. As características físicas e o rendimento bruto dos extratos secos foram critérios de escolha para otimização dos parâmetros de secagem por aspersão.

O rendimento bruto da operação de secagem dos extratos nebulizados foi calculado em relação à massa teórica de sólidos totais presentes nas soluções extrativas. Os sólidos totais correspondem ao teor de resíduo seco da solução extrativa somada ao peso dos adjuvantes adicionados. Uma vez obtidas as amostras, estas foram armazenadas em recipientes adequados e mantidas em dessecador para evitar ganhos de umidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos vegetais fluidos são instáveis e facilmente sujeitos a contaminação microbiana o que impossibilita a obtenção de um produto viável e com boa estabilidade a partir dos mesmos. O objetivo principal da secagem farmacêutica é a retirada da água, responsável por proporcionar um meio reacional propício para reações químicas, fenômenos físicos e proliferação microbiana (De SOUZA et al., 2006). Com isso torna-se possível a preservação das características do extrato e proporciona o aumento de sua estabilidade possibilitando o desenvolvimento de formas farmacêuticas a partir do mesmo.

Os extratos secos obtidos neste estudo apresentaram coloração semelhante, apresentando uma tonalidade amarelo-amarronzada. As características visuais de fluxo mostraram que os extratos com maior concentração de aerosil em relação ao resíduo seco (T1 e T2) apresentaram melhores propriedades de fluxo, aderindo menos às paredes do recipiente em que foi armazenado e apresentando menor tendência a formação de aglomerados. O Aerosil adicionado aos extratos proporcionou uma boa estabilidade física, mantendo o aspecto de pó fino e solto. Estes dados corroboram com estudos realizados por Vasconcelos et al (2005). Esta estabilidade pode ser atribuída a uma possível microencapsulação das partículas do pó pelo Aerosil (CORNEC, 1990).

Com relação ao rendimento bruto, os extratos mostraram resultados semelhantes, porém foi observado que os extratos que apresentaram maior concentração de maltodextrina (T1 – 15% A +15%M e T3 – 10%A + 15%M) apresentaram um rendimento inferior quando comparados aos de menor concentração (T2 – 15%A + 10%M e T4 – 10% A+10%M). Os resultados encontram-se demonstrado na tabela abaixo:

Tabela 1: Rendimento do processo de secagem em função das diferentes concentrações de adjuvantes tecnológicos

Adjuvantes Tecnológicos	Rendimento (%)
T ₁ - 15% Aerosil + 15% Maltodextrina	84
T ₂ - 15% Aerosil + 10% Maltodextrina	86
T ₃ - 10% Aerosil + 15% Maltodextrina	85
T ₄ - 10% Aerosil+10% Maltodextrina	86

A maltodextrina é amplamente utilizada na indústria alimentícia para processos de secagem por proporcionar uma boa resposta sensorial e manter características de estabilidade físico-química (TONON et al., 2008). Em virtude destas características este adjuvante foi selecionado para o nosso estudo. Com relação ao rendimento foi observado que a concentração de 10% de maltodextrina em relação ao resíduo seco proporcionou um melhor rendimento ao processo e não alterou as propriedades de fluxo quando associada ao aerosil a 15%.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que, na obtenção do extrato seco por aspersão, a alta concentração de aerosil influenciou positivamente no aspecto físico do produto final e a alta concentração de maltodextrina diminuiu um pouco o rendimento da operação.

O extrato seco T2 (15% Aerosil + 10% Maltodextrina) foi o que apresentou melhores características com relação aos parâmetros avaliados neste estudo.

Outros parâmetros estão sendo avaliados para caracterizar a melhor concentração de adjuvantes tecnológicos a serem utilizados para a secagem deste extrato. Assim, após a elucidação da melhor forma de secagem, teremos um extrato seco como forma farmacêutica intermediária e a partir desta serão desenvolvidas formulações finais que posteriormente serão submetidas a análise sensorial.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Saúde. **RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**, fevereiro de 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>. Acesso em: 18 jul, 2012.
- CORNEC, M. Aérosil: un adjuvant efficace pour les formes sèches, liquides et pâteuses. STP Pharma Sciences. n. 6, p. 110-112, 1990
- CUNHA, A. M. et al. Hypoglycemic activity of dried extracts of Bauhinia forficata Link. Phytomedicine. v. 17, n.1, p. 37-41, 2010.
- DE SOUZA T. P. Compressional behavior of formulations from Phyllanthus niruri spray dried extract. Die Pharmazie. v. 61, p. 213-217, 2006.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.
- OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. Revista Brasileira de Farmacognosia. v. 20, p. 641-650, 2010.
- SILVA, K.L.; CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero Bauhinia: composição química e potencial farmacológico. Química Nova, v. 25, n. 3, p. 449-454, 2002.
- SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2010.
- TONON R.V.; Brabet, C.; Hubinger, M.D. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (Euterpe oleraceae Mart.) powder produced by spray drying. Journal of Food Engineering. v. 88, p. 411-418, 2008 .
- VASCONCELOS, E. A. F. et al. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil®200 nas características dos extratos secos por aspersão da Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia. v. 15, p. 243-249, 2005.
- VEIGA-JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 2, n. 18, p.308-313, 2008.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Universidade Federal do Piauí pelo apoio financeiro.

CN05 - Preparo do complexo α -Borneol- β -CD por *spray drying*

Raiane Morais Silva^{1*}, Márcio dos Santos Rocha², Ulisses Nogueira Aguiar³, José Couras da Silva Filho⁴, Aldeídia Pereira de Oliveira⁵, Sidney Gonçalo de Lima⁶

1. Universidade Federal do Piauí – Curso de Graduação em Química (Iniciação científica)
2. Universidade Federal do Piauí – Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (Mestre em Ciências Farmacêuticas)
3. Universidade Federal do Piauí – (Mestrando em Ciências Farmacêuticas)
4. Universidade Federal do Piauí – (Doutorando - RENORBIO)
5. Universidade Federal do Piauí – (Professora do mestrado em farmacologia)
6. Universidade Federal do Piauí – Curso de Graduação em Química (Orientador) * raianezinha-@hotmail.com

* Autor principal

Palavras-chave: α -Borneol. β -Ciclodextrina. Complexo de inclusão. *Spray drying*.

RESUMO

α -Borneol é um álcool bicíclico monoterpênico que tem sido amplamente utilizada na indústria alimentar e de medicamentos. Entretanto, sua degradação durante a estocagem e sua baixa solubilidade em água dificulta sua aplicação tecnológica. Neste trabalho, preparou-se o complexo de inclusão entre α -Borneol e a β -ciclodextrina através do método de secagem por *spray drying* bem como sua caracterização por difratometria de raios X.

INTRODUÇÃO

α -Borneol (BN) é um álcool bicíclico monoterpênico que tem sido amplamente utilizada na indústria alimentos e de medicamentos, especialmente na medicina tradicional na China e na Índia, para tratar a dor abdominal, ferimentos, queimaduras, dores reumáticas, e ulcerações da boca, ouvidos, olhos ou nariz (SU et al., 2012). Possui ponto de fusão entre 205 e 210 °C e ponto de ebulição de 212 °C (HE e LI 2009). Entretanto, durante o período de armazenagem é lentamente degradado a cânfora, um produto de toxicidade bem mais acentuada. Além disso, sua baixa solubilidade em água e sua suscetibilidade a sublimação dificultam sua aplicação tecnológica (SU et al., 2012). Estas características podem ser melhoradas através da formação do complexo de inclusão entre o BN e as ciclodextrinas (CD).

As ciclodextrinas naturais mais comuns são o α , β e γ -ciclodextrinas, todas capazes de formar complexo de inclusão com uma grande variedade de compostos orgânicos (WANG; JIANG; LI, 2009; JIANG; LI; JIANG, 2010; WANG et al., 2011), a partir de diversos métodos, dentre eles a coprecipitação, a malaxagem, *spray drying*, liofilização e fluidização supercrítica. A escolha da técnica a ser utilizada depende das características de cada componente, sendo que não existe uma técnica universal de preparação (CUNHA-FILHO e SÁ-BARRETO, 2007).

Neste trabalho optamos pelo método de secagem por *spray drying*, o qual é amplamente utilizado pela facilidade de execução e boa reprodutibilidade. Neste método, a amostra é solubilizada ou dispersa em água seguida de sua aspersão sob uma corrente de ar aquecido, gerando partículas de pequeno diâmetro, relativamente uniformes e esféricas. Além disso, esta técnica possui a vantagem de apresentar baixo custo quando comparado a outros processos (RAMOS, 2006). FERNANDES et al., (2009) utilizou esta técnica para o preparo do complexo de inclusão entre o óleo essencial de Lippia sidoides com β -CD.

O complexo de inclusão entre o BN e a β -CD foi previamente descrito por HE e LI (2009) a partir da utilizaram método de dióxido de carbono supercrítico, e por SU et al., (2012) a partir da utilização do método do ultrassom. Ambos determinaram a relação estequiométrica de 1:1. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi preparar o complexo de inclusão entre o BN e a β -CD utilizando outra técnica de preparo (*spray drying*) e sua caracterização utilizando a técnica de difração de raios X.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais

α -Borneol foi adquirido da Sigma-Aldrich, a β -ciclodextrina foi adquirida da ISP Pharmaceuticals. Os demais reagentes utilizados foram todos de grau analítico.

Preparo do complexo de inclusão $(-)$ Borneol/ β -CD

O complexo de inclusão entre o BN e β -CD foi preparado de acordo com o método de secagem por spray drying, utilizando a relação estequiométrica de 1:1. Resumidamente, 1 grama de BN foi solubilizado em 100 mL de etanol PA, 7,4 grama de β -CD foi solubilizado em 450 mL de água destilada aquecida a 45 °C. Posteriormente verteu-se a solução de BN à solução de β -CD sob agitação com o auxílio de uma agitador magnético, por 90 minutos. Em seguida a mistura formada foi seca em spray drying BUCHI B-290, sob as seguintes condições: temperatura de entrada 105 °C, pressão de entrada 0,9 bar e fluxo da amostra de 3 mL/min.

Paralelamente foi preparada uma mistura física (MF) entre o BN e β -CD por simples trituração com o auxílio de um gral com pistilo.

DRX

Os difratogramas das amostras foram obtidos em um difratômetro de raios X, SHIMADZU XRD-6000. Os difratogramas foram medidos em ângulo de 2θ , variando de 5° a 75° a uma razão de 8°/min e uma resolução de 0,02°, tendo-se o cuidado de colocar todas as amostra em dessecador com sílica por 24 horas antes da realização dos ensaios.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Formação do complexo de inclusão $(-)$ Borneol/ β -CD

O complexo de inclusão entre BN e β -CD foi preparado numa razão estequiométrica de 1:1, o rendimento obtido foi de 72%, sendo considerado um bom rendimento para um processo piloto, em função do teor de sólidos presentes na dispersão (RAMOS, 2006), FERNANDES et al., (2009) após otimização do processo de obtenção do complexo de inclusão entre o óleo essencial de *Lippia sidoides* e a β -CD obteve um rendimento de 90%.

De acordo com CUNHA-FILHO e SÁ-BARRETO (2007), a maioria dos métodos de preparação de complexos sólidos necessita de diferentes graus de solubilização no seu processo de obtenção. Durante este processo, em solução aquosa, a cavidade levemente apolar da CD está ocupada por moléculas de água, sendo, portanto, uma interação energeticamente desfavorável. Estas moléculas de água são facilmente substituídas por moléculas apolares de forma espontânea, conferindo uma interação mais favorável para o sistema (OLIVEIRA et al., 2001; VEIGA; PECORELLI; LYRA et al., 2010; SZEJTLI, 2008; RIBEIRO, 2008) sendo o complexo, posteriormente desidratado por diversas técnicas.

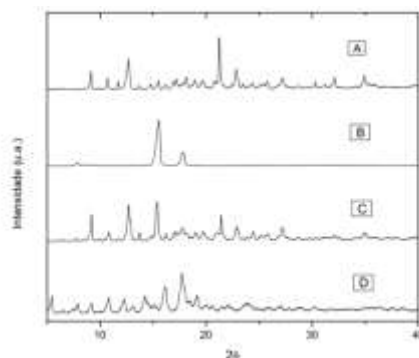
Estes complexos em estado sólido são estruturas heterogêneas que podem estar constituídas pelos seus componentes individuais não complexados e por complexos formados por diferentes relações moleculares, além disso, podem apresentar-se como agregados com variável estados cristalinos ou amorfos. Por esta razão, a eficiência de complexação é completamente dependente do processo de preparação utilizado (CUNHA-FILHO e SÁ-BARRETO, 2007).

DRX

A técnica de difração de raios X é útil na detecção da formação do complexo de inclusão. A mudança do padrão de difração do complexo quando comparada padrão dos componentes individuais indica a formação do complexo.

Na Figura 1A observa-se o padrão de difração característico da β -CD com picos nos ângulos de difração 2θ de 9,2;12,7;21,2; 22,8; 27,2 sugerindo que a β CD apresenta-se como um material cristalino, como visto em trabalhos anteriores (WANG et al., 2011). Na Figura 1B, observamos alguns picos nos ângulos de difração 2θ de, 15,6 e 17,9, sugerindo que o BN se apresenta como um material cristalino. Na MF (Figura 1C) observa-se a superposição do padrão de difração de ambos os componentes individuais, sugerindo a existência de pequena interação entre o BN e a β -CD. Quando ocorre a formação do CI (Figura 1D), observa-se a alteração dos padrões de difração de ambos os componentes, com o desaparecimento ou a redução da intensidade dos picos nos ângulos de difração 2θ , de 9,2;12,7;21,2; 22,8; 27,2 característicos da β -CD. Efeito semelhante ocorreu com os picos característicos ângulos de difração 2θ do BN. Além disso, observa-se o aparecimento de novos picos nos ângulos de difração 2θ , de 5,5; 7,9; 12,3; 14,2 e 16,2 sugerindo a formação de uma nova estrutura cristalina, bem como a formação do complexo de inclusão. Resultado semelhante foi obtido por SU et al., 2012, utilizando o método do ultrassom para o preparo de complexo de inclusão BN/ β -CD.

Figura 1. Difratograma de raios X da β -ciclodextrina (A), $(-)$ Borneol (B) mistura física (C) e complexo de inclusão (D).



CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho mostram que o uso do spray drying foi eficiente no preparo do complexo de inclusão entre o $(-)$ Borneol e a β -ciclodextrina e que a técnica de difração de raios X pode ser utilizada na sua caracterização.

REFERÊNCIAS

- CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v.28, n.1, p.1-9, 2007.
- FERNANDES, L. P.; OLIVEIRA, W. P.; SZTATISZ, J.; SZILÁGYI, I. M.; NOVÁK, CS. Solid state studies on molecular inclusions of Lippia sidoides essential oil obtained by spray drying. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, v.95 n.3, p.855-863, 2009.
- HE, J.; LI, W. J., Preparation of borneol-methyl-beta-cyclodextrin inclusion complex by supercritical carbon dioxide processing. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, v.65, n.3-4, p.249-256. 2009.
- JIANG, S.; LI, J.-N.; JIANG, Z.-T. Inclusion reactions of β -cyclodextrin and its derivatives with cinnamaldehyde in Cinnamomum loureirii essential oil. European Food Research and Technology, v.230, p.543-550, 2010.
- LYRA, M. A. M.; ALVES, L. D. S.; FONTES, D. A. F.; SOARES SOBRINHO, J. L.; ROLIM NETO P. J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v.31, p.117-124, 2010.
- OLIVEIRA, V. E.; ALMEIDA, E. W. C.; CASTRO, H. V.; EDWARDS, H. G. M.; DOS SANTOS, H. F.; L. DE OLIVEIRA, F. C. Carotenoids and β -Cyclodextrin Inclusion Complexes: Raman Spectroscopy and Theoretical Investigation. Journal of Physical Chemistry A, v.115, p.8511-8519, 2011.

- RAMOS, M. F. S. Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica. [Tese] Ribeirão Preto: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2006.
- RIBEIRO, A. M. Preparação, caracterização e aplicação de complexos de inclusão de miconazol com metil- β -ciclodextrina: administração bucal. [Dissertação] Porto: Universidade do porto, 2008.
- SU, J. Y.; CHEN, J. P.; LI, L.; LI, B.; SHI, L.; CHEN, L.; XU, Z. B. Formation of beta-Cyclodextrin Inclusion Enhances the Stability and Aqueous Solubility of Natural Borneol. *Journal of Food Science*, v.77, n.6, p.658-664, 2012.
- SZEJTLI, J., Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews*, 1998. 98(5): p. 1743-1753.
- VEIGA F.; PECORELLI C.; RIBEIRO L. As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica. Coimbra: Editora Minerva Coimbra, 2006.
- WANG, J.; CAO Y.; SUN, B.; WANG, C. Physicochemical and release characterisation of garlic oil- β -cyclodextrin inclusion complexes. *Food Chemistry*, v.127, p.1680-1685, 2011.
- WANG, Y.; JIANG, Z.-T.; LI, R. Complexation and molecular microcapsules of Litsea cubeba essential oil with β -cyclodextrin and its derivatives. *European Food Research and Technology*, v.228, p.865-873, 2009.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao laboratório de Materiais avançados- LIMAV da UFPI por permitir a realização das análises.

CN06 - Atividades biológicas de derivados sintéticos da riparina

Luciana Muratori Costa^{1*} (IC), Geandra Batista Lima Nunes² (PQ), Paôlla Rodrigues Policarpo³ (IC), Stanley Juan Chavez Gutierrez³ (PQ), Rivellison Mendes de Freitas² (PQ)

1. Universidade Federal do Piauí – PIBITI/CNPq
2. Universidade Federal do Piauí- RENORBIO
3. Universidade Federal do Piauí – Curso de Graduação em Farmácia

* Autor principal

luciana.muratori@hotmail.com

Palavras-chave: Riparina. Antioxidante. Citotoxicidade. *Leishmania*

RESUMO

Alguns alcalóides (riparinas), isolados do fruto verde da Aniba riparia demonstraram, em estudos pré-clínicos, potencial de atividades farmacológicas. Após síntese de análogos, denominadas Rip-A; B; C; D; E e F buscou-se investigar potencial biológico dessas substâncias. O presente estudo se propôs a desenvolver testes antioxidantes “in vitro”, contra a formação de espécies reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS), radical hidroxila e produção de óxido nítrico, citotoxicidade in vitro destas substâncias em 2 linhagens de células tumorais e triagem de atividade na inibição do crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. No estudo de citotoxicidade as células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL. As substâncias foram testadas na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$. A absorbância foi lida a 595nm. As Riparinas C, D, E, F atingiram percentual de inibição do crescimento celular superior a 70%. Nos testes de atividade antioxidante nas concentrações 10; 50; 100; 250 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, verificou-se pela quantificação de TBARS, um efeito antioxidante significativo. Percebeu-se um forte efeito sequestrante contra o OH, especialmente na dose mais alta. Os íons nitrito formados foram medidos pela reação de Griess e uma diminuição significativa na produção de óxido nítrico NO foi observado. Para o teste anti-leishmania, os parasitos foram plaqueados, com inoculo inicial de 1×10^6 promastigotas/mL, as substâncias foram testadas na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$ em triplicata, incubadas a 26°C e após 24 horas de cultivo comparadas com controle. Os resultados sugerem propriedades antioxidantes, antitumorais e anti-leishmania que requerem aprofundamento e acenam tais substâncias como fontes promissoras de compostos biologicamente ativos.

INTRODUÇÃO

A síntese de novas substâncias com atividade farmacológica representa um grande desafio, sendo o maior deles, a transformação de produtos de plantas medicinais em substâncias medicamentosas. Do fruto verde da Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae) foram isolados alguns alcalóides, do tipo alcalmidas, as riparinas que, em estudos em estudos pré-clínicos, apresentaram potencial de atividades farmacológicas.

Ao usar produtos naturais bioativos como ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos a indústria farmacêutica se depara, em geral, com a baixa concentração das substâncias selecionadas nas fontes naturais, o que muitas vezes inviabiliza a exploração comercial. Porém, a síntese destas substâncias e de derivados planejados, permite frequentemente que se estabeleça o farmacóforo e que se module o perfil biológico, representando uma excelente oportunidade para a atuação de químicos orgânicos sintéticos e químicos medicinais (COSTA, 2009).

Por meio da reação de Schotten Bauman foram preparados seis novos derivados da Riparina, denominadas Rip-A; B; C; D; E e F processando uma síntese de análogos de produto natural com potenciais de atividades biológicas e com viabilização de exploração comercial da substância pela indústria farmacêutica, pela disponibilidade independente da concentração da substância selecionada nas fontes naturais, porém há ausência na literatura de estudos farmacológicos destas atividades, bem como ainda não foram avaliadas o seu perfil de toxicidade em ensaios pré-clínicos (GUTIERREZ, 2007).

O presente estudo visa realizar a otimização da síntese de tais substâncias, e se propõe a desenvolver testes antioxidantes “in vitro”, contra a formação de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), radical hidroxila e produção de óxido nítrico, estudos de citotoxicidade in vitro destas substâncias em duas linhagens de células tumorais: HT29 (carcinoma de cólon - humano) e HEP-2 (carcinoma de laringe humano); e triagem de atividade na inibição do crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, considerando a triagem de potencial de atividade biológica como o passo inicial para o aprofundamento de estudos que culminarão na bioprospecção de novos produtos farmacológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Testes de atividade antioxidante “in vitro”

As seis substâncias foram testadas em diferentes concentrações (10; 50; 100; 250 e 1000 $\mu\text{g/mL}$). A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL de solução de AAPH (2,2'-azobis-2-methyl-propanimidamide) e a quantificação de TBARS mensurou a atividade antioxidante. As atividades sequestradoras de radicais livres foram avaliadas na interação direta das substâncias com moléculas reativas. A formação do radical hidroxila (OH.) foi quantificada a partir da reação de Fenton usando a degradação oxidativa da 2-desoxirribose. A absorbância foi medida a 532 nm e os resultados foram expressos pela quantificação do produto desta degradação, o malonaldeído (MDA), formados pelo Fe^{2+} e H_2O_2 . O óxido nítrico (NO) foi produzido a partir da decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio (SNP) em 20 mM de padrão fosfato (pH 7,4). Uma vez formado, o NO interagiu com o oxigênio para produzir íons nitrito, os quais foram medidos pela reação de Griess. A absorbância do cromóforo foi medida a 540 nm e o percentual de inibição da produção de NO foi determinado por comparação dos valores de absorbância do controle negativo e as preparações testes.

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos desvio no programa Graph Pad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software Incorporated, San Diego, USA).

Testes de citotoxicidade

Verificou-se a citotoxicidade in vitro destas substâncias em duas linhagens de células tumorais: HT29 (carcinoma de cólon - humano) e HEP-2 (carcinoma de laringe humano). As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL. As substâncias foram diluídas em DMSO puro e testadas na concentração de 25 µg/mL. A absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras sem atividade (1 a 20% de inibição), com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 20 a 50%), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 70%) e com muita atividade (inibição de crescimento variando de 70 a 100%).

Triagem do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania Amazonensis*

Os parasitas foram repicados para placas contendo meio Schneider, com inoculo inicial de 1×10^6 promastigotas/mL, as substâncias foram testadas na concentração de 400 µL/mL em triplicata. A placa foi incubada a 26°C e após 24 horas de cultivo, foi feito comparativo de crescimento entre poços com cada substância e os poços controle, classificados em uma escala de 0 a +++ crescimento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação de TBARS demonstrou que as Riparinas exercem um efeito antioxidante significativo, em todas as doses testadas, contra os radicais peróxil gerados, protegendo os lipídios da oxidação, como pode ser visto na Tabela 1. Resultado semelhante foi obtido com o Trolox, um análogo sintético hidrofílico do α -tocoferol, que é largamente usado como padrão antioxidante.

Um forte efeito sequestrante contra o radical hidroxila também foi gerado in vitro, especialmente na dose mais alta, semelhante ao resultado obtido com o trolox e sugestivo de atividade antioxidante.

As substâncias demonstraram exercer ainda um efeito significativo de scavenging contra o óxido nítrico (NO), havendo uma diminuição significativa na produção deste composto pelas riparinas testadas.

Tabela 1- Atividade antioxidante "in vitro" das Riparinas A-F na produção de TBARS, remoção de radical hidroxila e formação de nitrito

Parâmetros	µL/mL	Meio	Sistema	Riparina A	Riparina B	Riparina C	Riparina D	Riparina E	Riparina F
Produção de nitrito (% indução por SNP)	10	34,88±0,96	100,4±2,01*	75,1±1,31*	75,8±1,02*	69,3±1,07*	72,6±1,81*	65,9±1,30*	74,9±2,27*
	50	34,88±0,96	100,4±2,01*	29,1±0,61*	34,1±1,85*	34,9±0,23*	32,2±1,45*	37,7±0,95*	35,3±0,96*
	100	34,88±0,96	100,4±2,01*	29,2±2,05*	29,1±2,00*	22,9±1,31*	28,9±1,74*	25,1±1,37*	21,5±0,98*
	250	34,88±0,96	100,4±2,01*	24,3±0,62*	23,17±0,97*	19,8±0,83*	24,7±1,77*	20,1±0,71*	19,9±0,71*
	1000	34,88±0,96	100,4±2,01*	20,4±1,20*	20,6±0,98*	16,5±1,44*	17,3±2,38*	15,48±1,11*	17,3±0,22*
Degradação oxidativa da 2-desoximbose [%]	10	13,96±0,96	100,2±1,35*	97,1±0,78*	98,4±0,39*	95,5±1,30*	93,5±1,17*	79,9±0,64*	83,3±2,13*
	50	13,96±0,96	100,2±1,35*	76,9±1,10*	79,8±1,34*	80,9±1,29*	67,9±1,74*	62,2±2,14*	61,5±0,98*
	100	13,96±0,96	100,2±1,35*	54,5±0,85*	58,5±0,85*	58,7±1,37*	56,9±0,82*	53,4±1,79*	57,6±1,47*
	250	13,96±0,96	100,2±1,35*	49,6±0,89*	47,72±0,44*	52,1±0,13*	51,9±1,27*	51,4±1,47*	55,1±1,78*
	1000	13,96±0,96	100,2±1,35*	44,8±0,30*	47,2±0,43*	46,7±0,35*	47,3±0,88*	49,4±0,85*	50,9±2,33*
Quantificação TBARS (% AAPH)	10	18,38±1,84	99,90±1,32*	40,9±1,77*	44,5±1,31*	39,3±0,60*	41,2±0,96*	41,4±0,69*	38,8±0,99*
	50	18,38±1,84	99,90±1,32*	38,1±0,49*	40,4±0,85*	38,8±1,07*	39,4±0,71*	38,6±0,63*	35,9±0,41*
	100	18,38±1,84	99,90±1,32*	36,7±0,66*	38,3±1,05*	34,3±0,92*	37,3±0,68*	35,5±0,37*	35,2±0,44*
	250	18,38±1,84	99,90±1,32*	35,1±0,88*	36,5±1,21*	29,5±1,91*	34,4±0,76*	31,3±0,76*	34,6±0,49*
	1000	18,38±1,84	99,90±1,32*	25,8±0,48*	29,7±1,31*	25,7±2,62*	25,6±0,66*	28,2±0,39*	30,3±0,47*

Numerical data were applied to the Graph Pad Prism program, version 5.0 (GraphPad software Incorporated, San Diego, USA) *p<0,05 (ANOVA and t de student-Newman-Kewls as post hoc test); ap<0,05 (ANOVA and t de Student-Newman-Kewls as post hoc test)

A Tabela 2 apresenta o percentual de inibição do crescimento celular (IC%) em duas linhagens tumorais (HT29 e HEP-2), das amostras de riparinas testadas na dose única de 25 µg/mL.

Tabela 2 - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em duas linhagens tumorais testadas na dose única de 25 µg/mL.

	HT29		HEP-2	
	% inibição	desvio	% inibição	Desvio
RIPARINA A	22,06	13,2	50,9	2,7
RIPARINA B	15,8	2,0	33,0	2,7
RIPARINA C	72,5	6,7	94,3	1,6
RIPARINA D	73,2	4,4	96,3	2,4
RIPARINA E	94,6	0,5	100,7	0,3

	86,0	0,1	95,9	0,8
RIPARINA F				

As amostras das Riparinas C, D, E, F mostraram-se bastante ativas, uma vez que na escala de intensidade utilizada para avaliar a atividade de inibição do crescimento celular apresentaram percentual de inibição superior a 70%, enquanto as riparinas A e B apresentaram pouca ou nenhuma atividade de inibição.

Na triagem de atividade de inibição do crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, obteve-se resultados em escala de 0 a +++ de crescimento conforme tabela 3.

Tabela 3 – Triagem em teste de dose única de 400µl/ml de Riparinas A-F na inibição do crescimento de formas promastigotas de *leishmania amazonensis*

RIPARINAS	AMOSTRA 1	AMOSTRA 2	AMOSTRA 3
A	+++	+++	+++
B	++	++	++
C	-	-	-
D	-	-	-
E	-	-	-
F	-	-	-

Legenda: +++ crescimento não inibido (igual ao controle)

++ Crescimento discretamente inibido em relação ao controle

- Inibição completa, com ausência de promastigotas vivas no poço.

As Riparinas C, D,E,F, apresentaram uma inibição completa do crescimento de leishmanias, após 24h de incubação à 26°C, que resultaram na ausência de promastigotas vivas nos poços tratados com tais substâncias.

CONCLUSÃO

Os resultados dos testes in vitro, antioxidantes e de citotoxicidade, e de inibição do crescimento das formas promastigotas de *Leishmania*, sugerem, por meio da capacidade de remoção contra radicais hidroxilas e óxido nítrico, bem como pela prevenção da formação de TBARS, que as substâncias testadas são fontes promissoras de compostos biologicamente ativos com propriedades antioxidantes, são sugestivos de atividade antitumoral e aludem ter atividade anti-*Leishmania* que requerem aprofundamento na investigação, mais acenam tais substâncias como fontes promissoras de compostos biologicamente ativos.

REFERÊNCIAS

- BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., McCOY, K. D., WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. *Biochemica*, 4: 14-19, 1996.
- COSTA, P.R.R. Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: Candidatos a fármacos com ação antifúngica, anticâncer e antiparasitária. *Rev. Virtual Quim*, v.1, n.1, p. 58-66, 2009.
- GUTIERREZ, STC. Síntese do Bowdenol, um dihidrobenzofuranoide isolado de *Bowdichia virgilioides* e preparação de derivados da Riparina isolada de *Aniba riparia* com potencial atividade biológica. Tese (Doutorado) UFPB/CCS. João Pessoa, 2007.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBITI/CNPQ), pelo financiamento e incentivo à pesquisa. Ao professor Stanley Juan Chávez pelo fornecimento das substâncias e colaboração no desenvolvimento das pesquisas. À Universidade Federal do Pernambuco e Universidade Federal da Paraíba pela parceria e cooperação no desenvolvimento do estudo.

CN07 - Análise cromatográfica do complexo OELCβ-CD

Márcio dos Santos Rocha1* (PG), Sidney Gonçalo de Lima2 (PQ)

1 Universidade Federal do Piauí – Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (Mestre em Ciências Farmacêuticas)

2 Universidade Federal do Piauí – Curso de Graduação em Química (Orientador)

* Autor principal

farmrocha@gmail.com

Palavras-chave: *Lantana camara*. Óleo essencial. β-Ciclodextrina. Complexo de inclusão. Cromatografia gasosa.

RESUMO

O gênero *Lantana* é largamente utilizado na medicina popular. Seu óleo essencial possui atividade antibacteriana, antifúngica e repelente. Entretanto, sua instabilidade térmica e sua baixa solubilidade em água reduzem sua aplicação tecnológica. Neste trabalho, preparou-se o complexo de inclusão entre o óleo essencial de *L. camara* L. e a β-ciclodextrina, realizou-se ainda sua caracterização por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, determinando a proporção 6:94 (m:m) como a proporção mais eficiente.

INTRODUÇÃO

Lantana camara é um exemplar da família Verbenaceae, originária da América Central e América do Sul. É cultivada como espécie ornamental, estando adaptada às várias regiões do planeta (PATEL 2011). É utilizada na medicina popular para tratar prurido, úlceras, hepatite e reumatismo (BOUDA et al., 2011). No Brasil teve ampla utilização na medicina tradicional em associação com outras espécies para tratar afecções pulmonares (SILVA, 1929).

Estudos recentes apontam que o óleo essencial de *L. camara* (OELC) obtido das suas folhas possui um elevado espectro antibacteriano, antifúngico, anti-inflamatório e antioxidante (BENITES et al., 2009; COSTA et al., 2009; SOUSA et al 2010). Os principais constituintes ativos deste óleo são o β-cariofileno e Germacreno D, que possuem atividade anti-inflamatória e antibacteriana (MOURA, 2010).

Entretanto, sua instabilidade térmica, sua baixa solubilidade em água e sua elevada volatilidade dificultam sua aplicação tecnológica. Estas características podem ser melhoradas através da formação do complexo de inclusão do OELC com ciclodextrinas.

As ciclodextrinas naturais mais comuns são o α , β e γ -ciclodextrinas, todas capazes de formar complexo de inclusão com uma grande variedade de compostos orgânicos tais como os óleos essenciais (WANG; JIANG; LI, 2009; JIANG; LI; JIANG, 2010; WANG et al., 2011). Entretanto um grande problema no estudo destes complexos é a sua caracterização, visto que nem todos os métodos analíticos possuem sensibilidade suficiente para detectar sua formação. Desta forma, neste trabalho utilizamos a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas para caracterizar a formação do complexo de inclusão.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração do óleo Essencial

Folhas frescas de *L. camara* coletadas no município de Simões-PI foram submetidas ao processo de hidrodestilação em um aparato tipo Clevenger durante 4 horas. O óleo coletado foi desidratado com sulfato de sódio anidro e estocado sob refrigeração até o momento do uso.

CG-EM

A análise do OELC foi realizada em um cromatógrafo em fase gasosa GC-Ultra (Thermo Scientific) acoplado a um espectrômetro de massa ISQ (Thermo Scientific) utilizando uma coluna capilar HP-5MS (J & W Scientific) e gás hélio como gás de arraste sob fluxo de 1 mL/min. O injetor e o detector foram mantidos a temperatura de 270 °C e 290 °C, respectivamente. A coluna foi aquecida sob a seguinte programação: temperatura inicial de 50°C por 5 minutos seguida de um aquecimento até 180 °C a uma taxa de 4 °C/minutos. Seguida de uma nova rampa de aquecimento até 260 °C a uma taxa de 10 °C/minutos, permanecendo nesta temperatura por mais 10 minutos.

O volume de amostra injetado foi de 1 μ L diluído a 5% em n-hexano. Uma série de n-alcenos foi utilizada como referência para calcular o índice de retenção. A porcentagem da composição foi obtida por integração das áreas sob os picos. E o espectro de massa foi obtido por impacto de elétrons sob uma faixa de 43 a 500 Daltons. Os componentes individuais foram identificados através de seu índice de similaridade com os espectros de massa do banco de dados armazenados no aparelho. Além disso, foi calculado o índice de retenção para todos os componentes identificados e comparados com os dados da literatura (ADAMS, 2007; DE LIMA et al., 2009; SOUSA et al., 2010).

Preparo do complexo de inclusão OELC/ β -CD

O complexo de inclusão entre o OELC e β -CD foi preparado, em duplicata, de acordo com o método proposto por BHANDARI; D'ARCY; BICH (1998), com algumas modificações. Resumidamente, preparou-se complexo de inclusão nas proporções de OELC: β -CD (massa:massa) de 3:97, 6:94, 9:91, 12:88 e 15:85. Para tanto, massa adequada de OELC foi solubilizado em etanol PA (10%), a β -CD foi solubilizada em uma mistura etanol:água (1:2) aquecida a 55°C. Adicionou-se, sob agitação, o OELC à solução de β -CD, retirou-se o aquecimento e manteve-se a agitação por 4 horas a 150 rpm a uma temperatura média de 25°C. Após este período, resfriou-se a mistura, sob repouso, a uma temperatura média de 4 °C por 12 horas. O precipitado foi recolhido, seco por liofilização e pesado. Paralelamente foi preparada uma mistura física (MF) entre o OELC e β -CD por simples trituração entre o OELC e a β -CD com o auxílio de um gral com pistilo.

Extração do óleo complexado

A quantidade total de óleo no complexo de inclusão foi determinada pelo método de extração com solvente proposto por HARANGI e NÁNÁSI (1984), com modificações. Resumidamente amostras equivalentes a 10 mg de OELC dos complexos de inclusão e da mistura física foram solubilizados com 8 mL de água destilada em um tubo de ensaio fechado com tampa rosqueada de baquelite e extraídas com 4 mL de n-hexano. Para tanto, a mistura foi aquecida em banho-maria à temperatura de 80 ± 2 °C por 15 minutos, com agitação intermitente. A fase n-hexânica contendo o óleo essencial, foi recolhida com auxílio de uma pipeta e a fase aquosa foi submetida a duas novas extrações com n-hexano (2 x 4 mL). Os extratos combinados, foram concentrados e transferidos para balão volumétrico de 5 mL e analisados por GC-MS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CG/EM

As análises do óleo essencial de *L. camara* por CG/EM possibilitaram determinar uma predominância de mono e sesquiterpenos (Tabela 1), semelhante aos óleos de *L. camara* obtidos de outras regiões (SONIBARE e EFFIONG, 2008; COSTA et al., 2009; SOUSA et al., 2010). Observa-se ainda que a massa molecular dos constituintes identificados é compatível com a capacidade de complexação pela β -CD, que de acordo com VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO (2006) deve ser em torno de 200 a 800 Daltons.

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial de *L. camara*.

Componentes ^a	L. K. ^b	(%)	PM
β -Pineno	974	1,17	136
Limoneno	1024	1,54	136
1, β -Cineol	1039	1,17	154
Linalol	1095	1,28	154
α -Copaeno	1379	0,80	204
δ -Elemeno	1330	5,11	204
β -Elemeno	1396	1,02	204
β -cariofileno	1430	23,91	204
γ -elemeno	1440	32,81	204
Germacreno-D	1448	17,77	204
α -Humuleno	1460	2,63	204
alfo-Aromadendreno	1466	0,99	204
δ -cadimeno	1530	1,50	204
Espatuleno	1591	2,48	220
TOTAL (%)		94,27	
Monoterpenos		2,81	
Monoterpenos oxigenados		2,45	
Sesquiterpenos		86,54	
Sesquiterpenos oxigenados		2,48	

^a Compostos listados por ordem de eluição na coluna DB-5HT.

^b Índice de Retenção relativo a série de C6 a C20 n-alcenos na coluna DB-5HT.

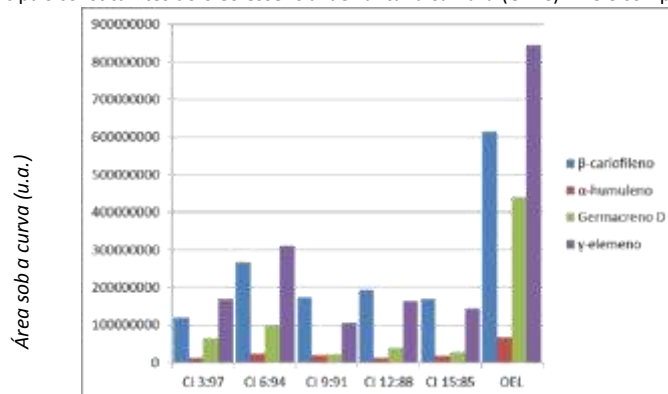
Formação do complexo de inclusão OELC/ β -CD

A Figura 1 mostra a curva de retenção dos principais constituintes do OELC e dos complexos de inclusão. Nela, pode-se observar a uma diferença na composição qualitativa e quantitativa do óleo essencial livre e complexado. Entretanto, observa-se que o perfil qualitativo do óleo nos complexos nas proporções 3:97, 6:94 e do óleo livre são semelhantes. De acordo com HARANGI e NÁNÁSI (1984) existe diferença de afinidade entre os diferentes componentes dos óleos essenciais e a β -CD, isto explica a mudança do perfil qualitativo dos complexos nas proporções 9:91, 12:88 e 15:85, visto que nestes casos o OELC está em excesso e aqueles componentes com maior afinidade podem deslocar aqueles com menor afinidade. Esta diferença de afinidade também explica a variação da eficiência de complexação entre o OELC e a β -CD (Tabela 2), nesta tabela observa-se que o complexo de inclusão 6:94 foi o que apresentou a maior eficiência de complexação (38,0%), indicando que este complexo apresenta a melhor proporção entre o OELC e a β -CD.

Tabela 2 – Eficiência de complexação do óleo essencial de *Lantana camara* em β -Ciclodextrina.

Amostra	Massa teórica (mg)	Massa recuperada (%)	Eficiência de complexação (%)
CI 3:97	664,8	57,9	20,6
CI 6:94	340,1	75,9	38,0
CI 9:91	227,2	51,4	19,7
CI 12:88	244,9	64,1	22,6
CI 15:85	262,3	61,2	20,7
MF	263,4	92,7	-

Figura 1 – Concentração dos principais constituintes do óleo essencial de *Lantana camara* (OELC) livre e complexado



CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho mostram que a formação do complexo de inclusão entre o óleo essencial de *L. camara* e β -ciclodextrina pode ser avaliada por cromatografia gasosa e que o complexos de inclusão nas proporções 3:97 e 6:94 (m:m) apresentaram o mesmo perfil qualitativo que o óleo essencial de *L. camara* livre e que o complexo de inclusão na proporção 6:94 foi o que apresentou maior eficiência de complexação.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification of essential oil Components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th ed. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL, USA, 2007.
- BENITES, J.; MOITEIRO, C.; MIGUEL, G.; ROJO, L.; LÓPEZ, J.; VENÂNCIO, F.; RAMALHO, L.; FEIO, S.; DANDLEN, S.; CASANOVA, H.; TORRES, I. Composition and biological activity of the essential oil of peruvian *Lantana camara*. *Journal of the Chilean Chemical Society*, v.54, n.4, p.379-384, 2009.
- BHANDARI, B. R.; D'ARCY, B. R.; BICH, L. L. T. Lemon oil to β -cyclodextrin ratio effect on the inclusion efficiency of β -cyclodextrin and the retention of oil volatiles in the complex. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, p.1494-1499, 1998.
- BOUDA, H.; TAPONDJOU, L. A.; FONTEM, D. A.; GUMEDZO, M. Y. D. Effect of essential oils from leaves of *Ageratum conyzoides*, *Lantana camara* and *Chromolaena odorata* on the mortality of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, v.37, p.103-109, 2001.
- COSTA, J. G. M.; SOUSA, E. O.; RODRIGUES, F. F. G.; DE LIMA, S. G.; BRAZ-FILHO, R. Composição química e avaliação das atividades antibacteriana e de toxicidade dos óleos essenciais de *Lantana camara* L. e *Lantana* sp. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.19, n.3, p.710-714, Jul./Set. 2009.
- DE LIMA, S. G.; MOITA NETO, J. M.; COSTA, J. G. M. D.; CITÓ, A. M. G. L.; REIS, F. A. M. Monoterpenes, sesquiterpenes and fatty acids from *Julocroton triquetus* (euphorbiaceae) from Ceará-Brazil. *Journal of the Chilean Chemical Society*, v.53, p.1718-1720, 2009.
- HARANGI, J.; NÁNÁSI, P. Measurement of the essential oil in inclusion complexes with cyclodextrin by means of capillary gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*, v.166, p.103-109, 1984.
- JIANG, S.; LI, J.-N.; JIANG, Z.-T. Inclusion reactions of β -cyclodextrin and its derivatives with cinnamaldehyde in *Cinnamomum loureirii* essential oil. *European Food Research and Technology*, v.230, p.543-550, 2010.
- MOURA, W. R. A., Ensaio farmacológico das atividades antiinflamatória, citotoxicidade e toxicidade aguda da *Copaifera luetzelburgii*, Harms e *Sida santaremnensis*, Monteiro. [Dissertação] Teresina: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ, 2010.
- PATEL, S. A weed with multiple utility: *Lantana camara*. *Review in Environmental Science and Biotechnology*, v.10, p.341-351, 2011.
- SILVA, R. A. D. *Pharmacopeia Brasileira*. Companhia Editora Nacional: Rio de Janeiro, 1929.
- SONIBARE, O. O., EFFIONG I. Antibacterial activity and cytotoxicity of essential oil of *Lantana Camara* L. leaves from Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, v.7, n.15, p.2618-2620, August, 2008.
- SOUSA, E. O.; SILVA, N. F.; RODRIGUES, F. F. G.; CAMPOS, A. R.; DE LIMA, S. G.; COSTA, J. G. M. Chemical composition and resistance-modifying effect of the essential oil of *Lantana camara* Linn. *Pharmacognosy Magazine*, v.22, p.78-82, 2010.
- VEIGA F.; PECORELLI C.; RIBEIRO L. *As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica*. Coimbra: Editora Minerva Coimbra, 2006.
- WANG, J.; CAO Y.; SUN, B.; WANG, C. Physicochemical and release characterisation of garlic oil- β -cyclodextrin inclusion complexes. *Food Chemistry*, v.127, p.1680-1685, 2011.
- WANG, Y.; JIANG, Z.-T.; LI, R. Complexation and molecular microcapsules of *Litsea cubeba* essential oil with β -cyclodextrin and its derivatives. *European Food Research and Technology*, v.228, p.865-873, 2009.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao laboratório de análise de combustíveis – LAPETRO da UFPI por permitir a realização das análises.

Mônica Cristiane Soares Mendes¹ (PG)*, Mayara Ladeira Coelho¹ (PG), Mirna Luciano de Gois da Silva² (PG), Ana Paula dos Santos Correia Lima da Silva² (PG) Joselma Sousa Lacerda³ (IC), José Arimatéia Dantas Lopes⁴ (PQ), Rivelilson Mendes de Freitas⁴ (PQ)

1. Universidade Federal do Piauí – Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas- PPGCF

2. Universidade Federal do Piauí – Doutorado em Biotecnologia- Renorbio

3. Universidade Federal do Piauí- Iniciação científica

4. Universidade Federal do Piauí- Professores/ Orientadores do PPGCF

* Autor principal

monycacrys@yahoo.com.br

Palavras-chave: Ensaios físico-químicos. Fitocosméticos. *Platonia insignis* Mart. Trioleína.

RESUMO

Considerando-se a qualidade dos fitoterápicos, é importante salientar que a preocupação com esta questão inclui rigoroso acompanhamento das diferentes etapas do desenvolvimento e produção destes produtos, desde a coleta do vegetal até a disponibilidade do produto final. Neste trabalho, foram realizados alguns ensaios do controle de qualidade para o desenvolvimento de uma formulação fitocosmética a partir da trioleína, um derivado da *Platonia insignis* Mart., conhecida popularmente como bacuri. Para o delineamento do estudo foi obtida a formulação fitocosmética, cujas propriedades físico-químicas foram estabelecidas através da avaliação das características organolépticas, determinação do pH, densidade, resíduo seco, material volátil e espalhabilidade. Os resultados obtidos por esses ensaios preliminares mostraram que a formulação mostrou-se compatível para implementação do ativo proposto. Estudos complementares necessitam ser realizados, como testes de estabilidade preliminar em outras concentrações do creme e testes de estabilidade acelerada, a fim de se obter informações mais detalhadas sobre a vida útil do produto e seu comportamento frente a situações adversas. Destaca-se a importância do estabelecimento do controle da qualidade para formulações a base de plantas medicinais, a fim de que sejam utilizadas para o desenvolvimento de uma formulação fitocosmética segura, eficaz e com qualidade.

INTRODUÇÃO

No cenário mundial, inúmeras indústrias de produtos cosméticos buscam a inovação, fazendo uso de matérias-primas de origens diversificadas, principalmente oriundas de vegetais, representando uma alternativa de substituição de materiais sintéticos pelos naturais (SOUSA; FERREIRA, 2010). Nesse sentido, o Brasil tem enorme biodiversidade, possuindo uma das mais ricas floras do mundo e os poucos estudos existentes deste material justificam a busca de maior desenvolvimento nesta área (IHA et al., 2008)

Fitocosmético pode ser definido como o cosmético que contém ativo natural, de origem vegetal, ou um extrato, ácido graxo, óleo essencial, cuja ação define a atividade farmacológica do produto. Um fitocosmético deve passar por todas as etapas de pesquisa como a proposição, a criação e o desenvolvimento, incluindo os testes de estabilidade, para assegurar a atividade durante toda sua vida útil (ISAAC et al, 2008).

Estudos recentes realizados com a planta *Platonia insignis* Mart, permitiram identificar no extrato hexânico de suas sementes, os seus componentes majoritários: ácido palmítico e ácido oléico, a partir do qual foi isolada a trioleína, substância utilizada como princípio ativo, na concentração de 6%, para produção de uma forma farmacêutica semissólida, denominada creme de bacuri. (COSTA JÚNIOR, 2011)

A incorporação dos extratos vegetais em bases para fins cosméticos é uma prática bastante difundida, sendo de fundamental importância à escolha adequada da base à qual os princípios ativos de uso tópico serão incorporados, garantindo, assim, a estabilidade e absorção dos princípios ativos e, conseqüentemente, obtenção de seus efeitos farmacodinâmicos esperados. No cenário industrial, existem várias formas farmacêuticas para serem incorporados os extratos, destacando-se as formas farmacêuticas tópicas, como géis e cremes (emulsões), que são bastante utilizadas popularmente, possuindo uma boa aceitação pelos consumidores por apresentarem características sensoriais agradáveis, além de possibilitarem uma boa permeação cutânea de ativos (BUHLER e FERREIRA, 2008).

Para a obtenção do sucesso terapêutico, a forma farmacêutica deve manter suas características físico-químicas ao longo do tempo de uso, requisito fundamental para apresentar-se estável, eficaz e segura. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo traçar as características físico-químicas da formulação obtida a partir da trioleína a partir dos seguintes parâmetros: características organolépticas, determinação do pH, densidade, resíduo seco e material volátil e determinação da espalhabilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

• Preparação do creme

Foi desenvolvido um creme não-iônico, tendo em vista sua resistência à incorporação de diversos ativos (BRASIL, 2005). Utilizaram-se os conservantes usualmente empregados no Brasil, adequados para bases e ativos cosméticos. A composição qualitativa da emulsão está representada na formulação (Tabela 1).

• Avaliação das características organolépticas:

A amostra foi analisada levando-se em consideração as propriedades organolépticas, através da visualização, considerando qualquer alteração de coloração, odor ou separação de fases. O aspecto pode ser descrito como granulado, pó seco, pó úmido, cristalino, pasta, gel, fluido, viscoso, volátil, homogêneo, heterogêneo, transparente, opaco e leitoso. A amostra pode ser descrita como normal, sem alteração; levemente separada, precipitada, turva; separada, precipitada, turva. (BRASIL, 2004; SOUSA; FERREIRA, 2010)

• Determinação do pH

Utilizou-se pHgâmetro digital previamente calibrado com soluções tampão de acetato pH 4,0 e tampão fosfato pH 7,0. Mediu-se o pH em triplicata para cada amostra correspondendo o resultado a média das três determinações.

• Determinação da densidade

A densidade aparente é a relação direta entre a massa de uma amostra e seu volume específico, medido em proveta graduada. A densidade foi medida através do método do densímetro e da proveta (BRASIL, 2007).

• Determinação do resíduo seco e material volátil

Determinada quantidade da amostra, pesada analiticamente, é submetida à secagem por 3 h em estufa aquecida a 105 C, até atingir peso constante. A diferença entre a massa da amostra, antes e depois da secagem, revela a massa dos componentes da formulação que volatilizam ou não naquelas condições. O material remanescente é denominado resíduo seco (BRASIL, 2007).

• Determinação da espalhabilidade

A determinação da espalhabilidade foi realizada de acordo com metodologia previamente descrita na literatura por Knorst (1991). No equipamento utilizado, uma placa molde circular, de vidro (diâmetro = 20 cm; espessura = 0,2 cm), com orifício central de 1,2 cm de diâmetro, foi colocada sobre uma placa-suporte de vidro (20 cm x 20 cm) posicionado sobre uma escala milimetrada (Figura 10). A amostra de 0,5 g do creme foi introduzida no orifício da placa molde e a superfície foi nivelada com espátula. A placa molde foi cuidadosamente retirada e sobre a amostra foi colocada uma placa de vidro de peso conhecido. Após um minuto, foi realizada a leitura dos diâmetros atingidos pela amostra, em duas posições opostas, com auxílio da escala do papel milimetrado. Posteriormente, foi calculado o diâmetro médio. Este procedimento foi repetido acrescentando-se sucessivamente outras placas, em intervalos de um minuto.

Os resultados foram expressos em espalhabilidade (mm²) da amostra em função do peso aplicado (gramas), de acordo com a equação abaixo, sendo que os mesmos correspondem à média de três determinações (BRASIL, 2004). Utilizou-se para o teste 10 placas, as quais variavam o peso entre 79,89 g e 309,73 g e foram aplicadas de forma decrescente perfazendo um total de 1676,5 g quando todas se apresentavam sobrepostas. A metodologia foi citada por Borghetti e Knorst (2006). Onde:

E_i = espalhabilidade da amostra para um determinado peso i (mm²); d = diâmetro médio (mm); $\pi = 3,14$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição qualitativa do creme obtido está representada na Tabela 1.

Tabela 1 – Componentes do creme não iônico com trioleína a 6%.

Componentes	Concentração
Álcool cetosteárilico/ Álcool cetosteárilico etoxilado	9,00%
Álcool cetosteárilico	4,00%
Palmitato de isopropila	3,00%
Propilenoglicol	4,00%
Metilparabeno	0,18%
Propilparabeno	0,02%
Trioleína	6%
Água destilada qsp	100 mL

A amostra do creme de trioleína a 6% foi analisada, após sua obtenção e as características organolépticas, estão descritas na tabela 2.

Tabela 2- Descrição das características organolépticas de creme de trioleína a 6%.

Parâmetro Organoléptico	Descrição
Aspecto	Homogêneo.
Cor	Amarelo-esverdeado opaco.
Odor	Característico a cremes não iônico.

Os ensaios de pH, densidade, resíduo seco e o material volátil tiveram seus resultados descritos a partir do cálculo da média e desvio padrão da triplicata.

Tabela 3 – Descrição dos parâmetros de qualidade físico-químicos do creme de trioleína a 6%.

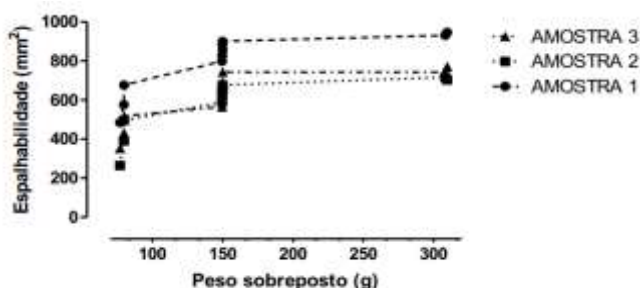
Ensaio	Resultado
pH	5,37±0,04
Densidade	0,975 g/ml±0,05
Resíduo seco	19,2%±0,1
Material volátil	80,8%±0,1

O aspecto de um fitocosmético, em relação à homogeneidade e coloração do produto, é importante do ponto de vista comercial, uma vez que pode influenciar a compra, por parte do consumidor, que não se sente atraído pela aparência do produto (ISAAC et al, 2008). Dessa forma, a formulação proposta teve aspecto homogêneo, não apresentando separação de fases visível, conforme mostra a Tabela 1.

Variações grandes de pH são um indicativo de instabilidade da formulação considerando que ele é um parâmetro químico e pode indicar falta de estabilidade entre os ingredientes das formulações, comprometimento da eficácia e segurança do produto (BRASIL, 2004). A pele humana é susceptível à variações de pH, sendo de extrema importância a sua determinação em formulações cosméticas ou dermatológicas visto que alterações na composição destas formulações podem desencadear processos alérgicos ou inflamatórios podendo provocar descamação, vermelhidão, inchaço, perda da elasticidade, ressecamento, dentre outros. O pH da pele apresenta-se levemente ácido podendo variar entre 4,6 a 5,8 (LEONARDI et al, 2002; GONÇALVES; CAMPOS, 2009). O pH da formulação foi de 5,37, compatível com a pele humana.

A espalhabilidade serve para avaliar alterações nas características reológicas da formulação durante o estudo. Em especial, nas formas farmacêuticas semissólidas, este parâmetro é importante para acompanhar as modificações na capacidade que a formulação tem de se espalhar ou abranger determinada área, o que pode facilitar ou dificultar a sua aplicação (BUGNOTTO et al, 2006). A Ilustração 1 demonstra a espalhabilidade do creme de trioleína em triplicata.

Ilustração 1 - Avaliação da espalhabilidade do creme de trioleína a 6% em triplicata, Teresina, 2012.



CONCLUSÃO

A formulação fitocosmética proposta teve suas características organolépticas e físico-químicas definidas preliminarmente, o que pode sugerir a estabilidade inicial da formulação. Os valores de pH são compatíveis com tecido cutâneo humano e o produto apresentou boa espalhabilidade. Esses parâmetros são importantes e necessários serem definidos como etapa inicial na construção dos parâmetros físico-químicos de uma nova formulação, com fins de se proceder em etapa futura aos testes de estabilidade.

Estudos complementares necessitam ser realizados, como testes de estabilidade preliminar em outras concentrações do creme e por períodos pré estabelecidos e testes de estabilidade acelerada, a fim de se obter informações mais detalhadas sobre a vida útil do produto e seu comportamento frente a situações adversas. Estudos farmacológicos in vivo para testar possíveis atividades do creme também são sugeridos.

REFERÊNCIAS

- BORGHETTI GS, KNORST MT. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtro solares. Rev Bras Ciênc Farm. v.42, n.4, p.531-7. 2006.
- BRASIL. Guia de estabilidade de produtos cosméticos/Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. 1.ed. Brasília: ANVISA, 2004.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário Nacional. Brasília:ANVISA, 2005.
- BRASIL. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA. 1. ed. Brasília : ANVISA, 2007.
- BUGNOTTO, C et al. Estudo de Estabilidade de Formulações Tópico contendo Própolis. Disc. Scientia. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2006.
- Buhler F V, Ferreira JRN. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações contendo extratos de *Ilex paraguariensis* St. Hil. a 5 e 10%. Rev Perspect.;v 32: p. 47-55, 2008.
- COSTA JÚNIOR, J.S. Análise fitoquímica, farmacológica e toxicológica das sementes de *Platonia insignis* Mart. (Bacuri).2011. 217f. Tese (Doutorado em Genética e Toxicologia Aplicada)- Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2011.
- GONÇALVES, G. M. S.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Aplicação de métodos de biofísica no estudo de eficácia de produtos dermocosméticos. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 45, n. 1, p. 1-10, 2009. IHA, S. M.; MIGLIATO, K. F.; VELLOSA, J. C.; SACRAMENTO, L. V.; PIETRO, R. C. L. R.; ISAAC, V. L. B.; BRUNETTI, I. L.; CORREA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 18, p. 387-393, 2008.
- ISAAC et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. Rev Cienc Farm Básica Apl, v.29, n.1, p. 81-96, 2008.
- LEONARDI, G. R. Cosmetologia aplicada. São Paulo: Medfarma Livraria e Editora, 2004.
- SOUSA, V.B, FERREIRA, J.R.N. Desenvolvimento e estudo de estabilidade de cremes e géis contendo sementes e extratos do bagaço da uva Isabel (*Vitis labrusca* L.). Rev Cienc Farm Básica Apl, v.31, n.3, p.217-222, 2010.

AGRADECIMENTOS

À Farmácia Escola da UFPI, em especial aos estagiários que gentilmente colaboraram com a realização dos testes.

CN09 - Complexos de inclusão rifampicina/ciclodextrinas

Jocélio Felipe Araujo de Sousa Cavalcante^{1*} (IC), Rhilder Borges Reis¹(IC), Lyguia Meirelles Maria Araújo Meirelles²(PG), Lívio Cesar Cunha Nunes²(PQ), Alexandre Araujo de Souza²(PQ).

1. Universidade Federal do Piauí – PIBIC/CNPq
2. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí

* Autor principal

Palavras-chave: Caracterização Físico-Química. Complexos de Inclusão. Rifampicina. Ciclodextrinas.

RESUMO

As doenças negligenciadas (DN) são aquelas que afetam milhares de pessoas ao redor do mundo, mas que não dispõem de tratamentos eficazes ou adequados. Como exemplo, malária, leishmaniose, entre outras que são disseminadas nos países subdesenvolvidos. A maioria dos fármacos disponíveis para o tratamento dessas doenças, são tóxicos ou ineficientes. Alguns utilizam o mesmo processo de cura há cerca de 40 anos. Porém há um grande volume de trabalhos científicos que tratam da biologia, imunologia e genética dos parasitas causadores destas doenças. Falta o interesse das indústrias na produção de medicamentos mais eficientes. Essa revisão tenta traçar um panorama da Pesquisa e desenvolvimento de medicamentos para o tratamento dessas doenças a partir de leituras referentes ao assunto. No Brasil, os incentivos governamentais para P&D em doenças negligenciadas é crescente, em torno de R\$ 75 milhões ao ano, boa parte vem do Ministério da Ciência e Tecnologia, por meio de suas duas principais agências de fornecimento: o CNPq e a FINEP. Em 2008, elas investiram mais de R\$ 25 milhões em projetos de P&D para as DN. Mas, sem os mecanismos de mercado, faltam incentivos para o desenvolvimento de inovações de produtos necessários à saúde das populações enfermas. Ficando claro que um novo paradigma voltado para a correção desse desequilíbrio deve ser urgentemente criado. Apesar dos últimos decênios terem sido palco de revoluções científicas e de transformações nos processos de pesquisa, desenvolvimento tecnológico e produção industrial, temos políticas públicas insuficientes voltadas para P&D de medicamentos para o combate dessas doenças.

INTRODUÇÃO

Sabendo que as doenças negligenciadas (DN), como exemplo, malária, hanseníase, tuberculose, entre outras que são disseminadas nos países subdesenvolvidos, que afetam milhares de pessoas ao redor do mundo, pois não dispõem de tratamentos eficazes ou adequados e que a maioria dos fármacos disponíveis para o tratamento dessas doenças, são tóxicos ou ineficientes, tornou-se evidente no meio científico nacional e internacional a necessidade de estimular pesquisas para encontrarmos soluções para esses problemas (MOREL, 2006).

A rifampicina (3-[[[4-Metil-1-piperazinil]imino]metil]rifamicina) é um fármaco de pó cristalino, de cor castanho avermelhado, de massa molar 822,94 g/mol, pouco solúvel em água e solúvel em metanol. Sua estabilidade varia de acordo com o pH, devido a sua natureza anfoterica. A estabilidade máxima é alcançada em soluções quase neutras (ARISTOFF et al., 2010).

Alternativas eficientes que tornem os fármacos mais disponíveis para determinado sítio de absorção com taxas de dissolução mais adequadas têm sido amplamente descritas na literatura com a finalidade de aumentar a solubilidade em sistemas aquosos, direcionar os fármacos a sítios específicos do organismo, liberar o fármaco de maneira controlada e aumentar o efeito terapêutico (SOUTO, 2008). Destacando-se as ciclodextrinas, α , β e γ que se diferenciam por números de anéis glicose, cujos são, respectivamente, 6, 7 e 8. A mais utilizada na formação de complexos com fármacos é a do tipo β . Isso porque sua cavidade é mais propícia ao recebimento de moléculas que possuam pelo menos um anel aromático (SALTÃO, 2001).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, constituídos por unidades de α -D-glicose, obtidas por ação da enzima ciclodextrina glicosil transferase (CGTase) sobre o amido. As ciclodextrinas apresentam cavidade hidrofóbica e superfície hidrofílica, devido a presença de grupos OH. Esta estrutura possibilita a formação de complexos de inclusão estáveis, com grande diversidade de substâncias orgânicas, sais e halogênios. Esta propriedade permite alterar a solubilidade de fármacos, modelar a velocidade de dissolução, aumentar a estabilidade e proteger as mucosas da irritação causada por determinados fármacos (LINDNER; SZENTE; SZEJTLI, 1981; SALTÃO; VEIGA, 2006; SZEJTLI, 1994).

MATERIAL E MÉTODOS

Verificação do diagrama de solubilidade:

O estudo de solubilidade foi realizado conforme o método descrito por Higuchi e Connors (1965), adicionando-se excesso de RIF a tubos de ensaio contendo soluções aquosas da ciclodextrinas naturais, α -, β - e γ CD, em concentrações crescentes (0 – 10 mM). As amostras foram mantidas em banho-maria (Nova Ética 304D) a 37°C, sob agitação, por 2 dias.

Aliquotas foram retiradas, filtradas em papel filtro e adequadamente diluídas em água destilada. O conteúdo foi determinado em espectrofotômetro (Varian AA 50) no LIMAV, em 475 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Calorimetria exploratória diferencial (dsc):

A análise térmica através de DSC (2920 TA Instruments), foi realizada no LAPETRO, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 mL / min, empregando uma massa de aproximadamente 5,5 mg, acondicionada em porta-amostra de alumina hermeticamente fechado. Analisou-se o fármaco puro, a β CD, a PVP, as misturas físicas, o complexo de inclusão e a dispersão sólida entre 30 – 350°C, sob um razão de aquecimento de 10°C min⁻¹.

Espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier (ft-iv):

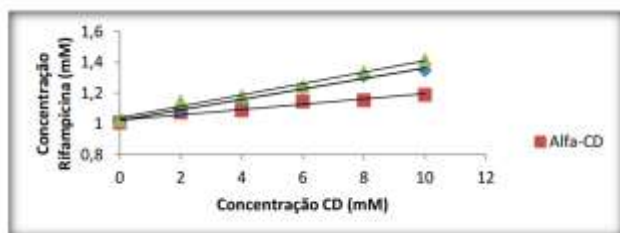
Os espectros de infravermelho foram obtidos em espectrômetro no infravermelho por transformada de Fourier Vertex 70, do Laboratório do Grupo de Materiais e de Bionanotecnologia da UFPI, com resolução de 4 cm⁻¹, na faixa de 4000 – 400 cm⁻¹ e com 16 scans, utilizando pastilhas de KBr.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O diagrama de solubilidade obtido a partir das CDs naturais demonstrou um aumento linear da solubilidade da rifampicina, conforme Gráfico 03, com um inclinação (S0) inferior a um, caracterizando-o como um diagrama do tipo AL, ou seja, o aumento da solubilidade é proporcional ao incremento das concentrações do agente complexante em uma estequiometria 1:1 (HIGUCHI; CONNORS, 1965).

Sabendo disso, investimos na inclusão com ciclodextrinas que é um fenômeno molecular em que uma molécula hospede (ou parte dela) interage com a cavidade de uma molécula de ciclodextrina, para ficar aprisionada e formar uma associação estável. A superfície interna da cavidade é hidrofóbica e a externa é hidrófila, devido ao arranjo dos seus grupos hidroxilo na molécula. Onde, a cavidade da molécula hospedeira, deve ser suficientemente grande para acomodar o hóspede, e suficientemente pequena para eliminar a água, para que o contato total entre a água e as regiões não polares do hospedeiro e do hóspede seja reduzido (GUEDES, 2008). Em solução aquosa, a cavidade ligeiramente apolar das ciclodextrinas são ocupadas por moléculas de água, que se encontram em ambiente energeticamente desfavorável, o que favorece a substituição das moléculas de água por moléculas hóspede que sejam menos polares (VEIGA, 2006). Esta complexação das ciclodextrinas com o fármaco vai alterar algumas das suas propriedades físico-químicas (tais como solubilidade e estabilidade), no entanto, a capacidade intrínseca do fármaco de permear as membranas biológicas lipofílicas e de interagir com receptores no organismo não é afetada. De fato, durante a formação do complexo, não se formam nem se rompem ligações covalentes (LOFTSSON, 2007).

GRÁFICO 3: Diagrama de solubilidade de rifampicina em presença de α CD, β CD e γ CD, em água destilada a 37°C.



CONCLUSÃO

Estudos bibliográficos e resultados obtidos com esse trabalho mostram que há uma complexação discreta entre a rifampicina e a β - e γ -CD, promovendo um incremento de solubilidade do fármaco de quase 50%. Portanto, apresentam-se como uma alternativa promissora para minimizar ou resolver problemas de solubilidade de fármacos.

REFERÊNCIAS

- ARISTOFF, P. A.; GARCIA, G. A.; KIRCHHOFF, P. D.; HOLLIS SHOWALTER, H. D. Rifamycins Obstacles and opportunities. *Tuberculosis*, v. 90, p. 94-118, 2010.
- GUEDES, F.L.; ALVES, G.M.C.; SANTOS, F.L.A.; LIMA, F.L.; ROLIM, L.A. & ROLIM NETO, P.J. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. *Rev. Bras. Farm.v.* 89. p.220-225. 2008.
- HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. Phase solubility techniques. *Advanced Analytical Chemistry Instrumental*. v. 4, p. 207–212, 1965.
- LOFTSSON, T., DUCHENE. D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm.* 2007. LINDNER, K.; SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Food flavoring with β -cyclodextrin complex flavor substances. *Acta Alimentaria*. v. 10, n. 3, p. 175-185, 1981.
- MOREL, C. M. Inovação em saúde e doenças negligenciadas. *Cad. Saúde Publica*, Rio de Janeiro, v.22, n.8, p.1522-1523. ago. 2006.
- SALTÃO, R., VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v.37, n.1, jan-abr. 2001.
- SOUTO, P. F. C., Avaliação da solubilidade do fluconazol em dispersões sólidas obtidas por técnica de co-precipitação. Universidade metodista de piracicaba, UNIMEP, São Paulo, 2008.
- SZEJTLI, L. Limits of cyclodextrins application in oral drug preparations. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. v. 2, p. 487-501, 1984.
- VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica. Coimbra: MinervaCoimbra, 2006.

AGRADECIMENTOS

Ao PPGCF, à UFPI e ao CNPq.

CN10 - Obtenção e caracterização de biofilmes à base dos polímeros naturais pectina e goma do cajueiro

Rosana Mirian Barros Mendes^{1*} (PG), Itaciara Erliny Maria da Silva Melo² (IC), Cleide Maria da Silva Leite³ (PQ), Rivelilson Mendes de Freitas⁴ (PQ)

1. Universidade Federal do Piauí – PPGCF/UFPI
2. Universidade Federal do Piauí – PIBITI/UFPI
3. Universidade Federal do Piauí – Curso de Licenciatura em Química
4. Universidade Federal do Piauí – Curso de Graduação em Farmácia

*Autor principal

RESUMO

A goma do caju é um heteropolissacarídeo exudato da árvore cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). Este trabalho teve por objetivo a obtenção e caracterização de filmes constituídos pelos biopolímeros goma do caju (GC), pectina (PEC) e aditivos termoplásticos poli(óxido de etileno) (PEO), sorbitol (SOR) e manitol (MAN) para incorporação de fármacos com ação transdérmica. Foram preparadas soluções aquosas dos constituintes, nas seguintes proporções em massa: 100GC, 100PEC, 50GC/50PEC/3MAN, 50GC/50PEC/3PEO, 50GC/50PEC/3SOR. As soluções foram misturadas e o solvente evaporado à temperatura ambiente obtendo-se os filmes (técnica "casting"). A caracterização foi realizada usando a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os filmes obtidos mostraram-se transparentes e homogêneos, no entanto o filme 100PEC apresentou após 24 hs aspectos de contaminação por fungos. O espectro de FTIR da GC mostrou absorções características de deformação axial assimétrica do anel na ligação COC, da fração glucosídica da goma e de ligações C-H, dos grupos hidroxila. A curva DSC da GC revela a presença de picos relativos a perda de moléculas de água e processos de fusão e cristalização. Os filmes apresentam processos de fusão com temperaturas próximas a 219°C, 214°C e 213°C, respectivamente, para 50GC/50PEC/3MAN, 50GC/50PEC/3PEO e 50GC/50PEC/3SOR. Os resultados do presente estudo apontam que os filmes produzidos com a GC apresentaram-se estáveis com relação a contaminações ambientais e o FTIR e DSC sugerem a miscibilidade entre os biopolímeros, podendo ser úteis no desenvolvimento de sistemas matriciais para incorporação de fármacos.

INTRODUÇÃO

Biomateriais podem ser aplicados na área médica, farmacêutica ou biomédica, com o objetivo de interagir com o sistema biológico, uma vez que apresentam baixos riscos de rejeição imunológica e grande disponibilidade. A goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é um exsudato natural com atividade antimicrobiana e antifúngica, evitando o processo de infecção durante o tratamento de feridas (TORQUATO, et al., 2004). A goma extraída de árvores do nordeste brasileiro foi caracterizada como um heteropolissacarídeo contendo β -D-galactose (72-73%), α -D-glucose (11-14%), arabinose (4,6-5%), ramnose (3,2-4%) e ácido glucurônico (4,7-6,3%) em porcentagem de massa. A goma é composta, sobretudo de uma cadeia principal de galactose ligada por C-1 e C-3, com ramificações de galactose ligada por C-1 e C-6. A pectina (PEC) representa um grupo de polissacarídeos encontrado nas paredes celulares de plantas e contribuem para retenção de água e formação de géis (AXELOS, et al., 1997).

Este trabalho teve por objetivo a obtenção e caracterização de filmes constituídos pelos biopolímeros goma de caju (GC), pectina (PEC) e os aditivos termoplásticos poli(óxido de etileno) (PEO), sorbitol (SOR) e manitol (MAN) para posterior incorporação de fármacos com ação transdérmica. A caracterização dos filmes foi realizada usando a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais utilizados para a preparação dos biofilmes foram: goma do caju – Gcaju - (exsudada de cajueiros em Teresina), Pectina, Manitol, Sorbitol e Poli(óxido de etileno) adquiridos comercialmente. Para a preparação dos biofilmes dissolveu-se a Gcaju, Pectina e os aditivos termoplásticos: Manitol (MAN), Sorbitol (SOR) e Poli(óxido de etileno) (PEO) isoladamente, em água e então as soluções foram misturadas e submetidas a temperatura ambiente, em dessecador, para evaporação do solvente, obtendo-se os filmes. O procedimento de obtenção das blendas foi o mesmo para os filmes obtidos nas seguintes proporções: 100GC, 100PEC, 50GC/50PEC/3MAN, 50GC/50PEC/3PEO, 50GC/50PEC/3SOR e caracterizados usando a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). As curvas DSC foram obtidas em atmosfera de N₂, usando massa aproximada de 7 mg, acondicionadas em porta-amostras herméticos de alumínio. Os experimentos foram conduzidos na faixa de temperatura de 30 a 600 oC, com razão de aquecimento de 10 oC/min. Os espectros de FTIR foram obtidos na faixa de 400 a 4000cm⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os filmes obtidos mostraram-se transparentes e homogêneos, no entanto o filme contendo somente pectina - 100PEC, apresentou após 24 horas aspectos de contaminação por fungos. A goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é um exsudato natural com atividade antimicrobiana e antifúngica (TORQUATO, et al., 2004). Tal propriedade pode ser responsável pela não ocorrência de contaminação microbiana nos filmes que continham a goma como constituinte. O espectro de FTIR (Figura 1) da goma de caju mostrou absorções em 772 cm⁻¹, 2938 cm⁻¹, 3447 cm⁻¹ e 3758 cm⁻¹, características da deformação axial assimétrica do anel na ligação COC, da fração glucosídica da goma, de ligação C-H, dos grupos hidroxila, devido as pontes de hidrogênio intermoleculares de álcool, e de grupos hidroxila livres, respectivamente. A pectina mostra absorção na região do espectro entre 3600 e 2500 cm⁻¹, característicos do estiramento -OH que caracterizam ligações de hidrogênio inter e intramolecular da fração do ácido galacturônico do polímero, sendo que a absorção em 2927 cm⁻¹ é atribuída ao O-CH₃, devido ao estiramento de ésteres metílicos do ácido galacturônico. (GNANASAMBANDAM, et al., 2000).

Os filmes conservaram os grupos funcionais presentes na goma do cajueiro e da pectina. Em todos os filmes se observa uma banda em 2924 cm⁻¹ característica da deformação axial da ligação C-H, também observada na GC. Em 3434 cm⁻¹ observa-se a ligação de hidrogênio inter e intramolecular do polímero de ácido galacturônico da pectina. A absorção em 1635 cm⁻¹ revela o estiramento simétrico de grupos carboxilatos, COO-, proveniente da pectina. A banda de 1075 cm⁻¹ atribuída às vibrações de estiramento de grupos C-OH secundários da pectina, também é observada nos filmes.

A presença desses grupos funcionais evidencia uma boa interação entre os polímeros. A alteração na proporção dos constituintes dos filmes promoveu apenas diferenças de intensidade, pois o número de grupos funcionais aumentou igualmente sugerindo indícios de miscibilidade dos biopolímeros (Figura 1).

A curva DSC (Figura 2) mostra para a goma de caju, a presença de picos relativo a perda de moléculas de água e picos endotérmicos associados entre 220oC e 250 oC, relativos a processos de fusão e cristalização. Estes picos sugerem a presença de substâncias polimórficas (estereoisômeros). A pectina mostra na curva DSC a partir de 200 oC os processos relativos a decomposição térmica dos seus constituintes. Os filmes mostram processos de fusão com temperaturas próximas a 219°C, 214°C e 213°C, respectivamente, para 50GC/50PEC/3MAN, 50GC/50PEC/3PEO e 50GC/50PEC/3SOR. Este comportamento sugere que o aditivo manitol induz a formação de cristais que fundem em mais alta temperatura (Figura 2).

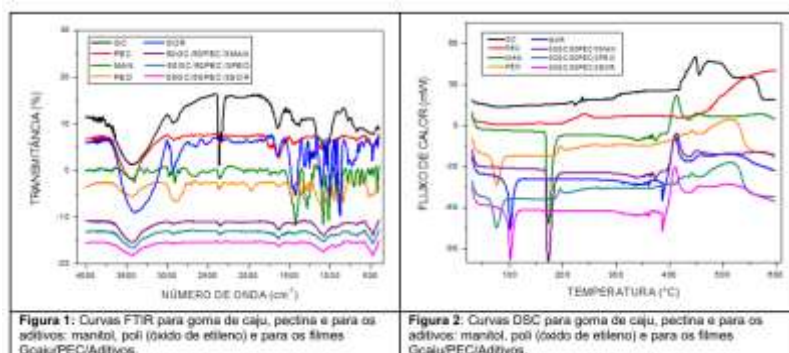


Figura 1: Curvas FTIR para goma de caju, pectina e para os aditivos: manitol, poli (óxido de etileno) e para os filmes GCoju/PEC/Aditivos.

Figura 2: Curvas DSC para goma de caju, pectina e para os aditivos: manitol, poli (óxido de etileno) e para os filmes GCoju/PEC/Aditivos.

CONCLUSÃO

Os biofilmes obtidos pela técnica “casting” mostram pelas análises em FTIR e DSC a formação de materiais com propriedades intermediárias entre as observadas para os constituintes puros. Os plastificantes adicionados à composição dos filmes não acrescentam mudanças significativas na composição estrutural de sua base, uma vez que os picos característicos da goma de caju e pectina foram mantidos em todos os filmes, sem deslocamentos, apresentando apenas diferenças de intensidade relativas ao aumento do número de grupos funcionais.

Os filmes produzidos com a GC apresentaram-se estáveis com relação a contaminações ambientais e os resultados obtidos na caracterização por FTIR e DSC sugerem a miscibilidade entre os biopolímeros, podendo ser úteis no desenvolvimento de sistemas matriciais para incorporação de fármacos.

REFERÊNCIAS

- AXELOS, M.A.V.; THIBAUT, J.F. The chemistry of low methyl pectin. Academic Press, New York, v. 37, n.1, p. 109-118, 1997.
- GNANASAMBANDAM, R.; PROCTOR, A.; Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. Food Chem., Amsterdam, v. 68, p. 327-332, 2000.
- MORAES, I. C.; SILVA, G. G. D.; CARVALHO, R. A.; HABITANTE, A. M. Q. B.; BERGO, P. V. A.; SOBRAL, P. J. A. Influência do grau de hidrólise do poli(vinil álcool) nas propriedades físicas de filmes à base de blendas de gelatina e poli(vinil álcool) plastificados com glicerol. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v. 28, n. 3, p. 738-745, 2008.
- RODRIGUES, I.F.; PAULA, R.C.M.; COSTA, S.M.O. Polímeros: Ciência e Tecnologia - n. 1, p. 31-36 1993.
- TORQUATO, D. S.; FERREIRA M. L.; SÁ, G. C.; BRITO, E. S.; PINTO, G. A. S.; AZEVEDO, E. H. F. Evaluation of antimicrobial activity of cashew tree gum. World J. Microb. & Biotec. v. 20, p. 505-507, 2004.

AGRADECIMENTOS

A toda equipe, professores/orientadores envolvidos. Ao CNPq, pelo apoio e financiamento a esta pesquisa.

CS01 - Monitoramento de alterações nucleares e de enzimas antioxidantes em pacientes com câncer de mama em tratamento FAC e AC

Antonio Luiz Gomes Júnior^{1*} (IC), Marcia Fernanda Correia Jardim Paz² (IC), Laís Iasmin Soares da Silva³ (IC), Simone da Costa e Silva Carvalho⁴ (IC), André Luiz Pinho Sobral² (IC), Rivelilson Mendes de Freitas¹ (PQ), Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante^{1,5} (PQ).

1. Universidade Federal do Piauí – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.
2. Universidade Luterana do Brasil – Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada.
3. Universidade Federal do Piauí – PIBIC/CNPq.
4. Faculdade NOVAFAP – Curso de Graduação em Biomedicina
5. Faculdade NOVAFAP – Professora das disciplinas de Genética Citogenética e Biologia Molecular

* Autor principal

junior-gonzaga01@hotmail.com

Palavras-chave: Micronúcleo. Estresse oxidativo. Câncer de mama. Quimioterapia.

RESUMO

O câncer de mama é uma das causas de morte mais relevante entre as mulheres e o seu desenvolvimento está relacionado com mutações. Estudos apontam que além da exposição a agentes mutagênicos e carcinogênicos, hábito nutricional, estilo de vida e a predisposição genética são fatores de risco. As drogas utilizadas para tratamento do câncer de mama lesam não apenas as células neoplásicas, mas também as células normais, causando danos ao DNA e levando ao aumento do estresse oxidativo celular. Com o intuito de desenvolver uma terapia mais confiável o presente estudo tem como objetivo monitorar pacientes com câncer de mama em tratamento quimioterápico pelo protocolo 5-fluorouracil, doxorubicina e ciclofosfamida (FAC) e/ou doxorubicina e ciclofosfamida (AC) utilizando biomarcadores de mutagenicidade, apoptose e necrose com o teste de micronúcleo em linfócitos e do estresse oxidativo pela dosagem catalase e superóxido dismutase. Este projeto permitirá obter dados significativos e relevantes para as pesquisas relacionadas aos estudos da qualidade e eficácia da quimioterapia a partir de um tratamento individual relacionando as capacidades de dano do DNA e estresse oxidativo das pacientes em tratamento quimioterápico para o câncer de mama.

INTRODUÇÃO

O câncer de mama constitui, mundialmente, uma das causas de morte mais relevantes entre mulheres. No Brasil, é a segunda mais frequente neste grupo populacional, que ainda prevalece o câncer de pele (SANTOS; VIEIRA, 2011). Dados da Organização Mundial de Saúde apontam que, a partir de 2020, pode se atingir a casa de 16 milhões de casos novos ano (DA CUNHA et al., 2007), contribuindo para ocupar a primeira causa de mortalidade no mundo. Associado a este fato, o câncer possui um forte impacto na sociedade, debilitando indivíduos produtivos, tanto no âmbito social quanto no econômico, além de constituir sério problema de saúde pública (ALMEIDA et al., 2005).

O desenvolvimento do câncer resulta de mutações em um ou mais grupos de genes que regulam o crescimento celular e a morte celular programada. Quando o câncer ocorre como parte de uma síndrome de câncer hereditária, a mutação inicial causadora do câncer é herdada através de linhagem germinativa e, portanto, já presente em cada célula do corpo. Entretanto, a maioria dos cânceres é esporádica porque as mutações ocorrem em uma única célula somática que então se divide e prossegue para desenvolver uma neoplasia. A base do desenvolvimento do câncer está estreitamente relacionada com alterações celulares, as quais em conjunto determinam o fenótipo maligno. Primeiramente é necessário destacar que existem quatro classes de genes responsáveis pelo controle do crescimento celular: os proto-oncogenes promotores do crescimento,

genes supressores de tumor que inibem o crescimento, genes que regulam a morte celular programada (apoptose) e os genes envolvidos no reparo do DNA (principais alvos do dano genético) (ROBERT, 2008).

Estudos epidemiológicos apontam que além da exposição a agentes mutagênicos e carcinogênicos, hábito nutricional, estilo de vida e predisposição genética são fatores relevantes que podem desencadear um câncer (LEAL, 2009). O diagnóstico precoce sinaliza um bom prognóstico para o paciente que dispõe de várias terapêuticas para o tratamento (MARTA et al., 2011).

Um dos agentes antineoplásicos mais utilizados na quimioterapia é a Ciclofosfamida (CP), que faz parte da família das mostardas nitrogenadas e é um agente alquilante bifuncional, pois atua tanto no tratamento de diversos cânceres como droga imunossupressora. Porém, como dito, os antitumorais lesam não apenas as células neoplásicas, mas também as células normais. O 5-fluorouracil é um agente antimetabólico de baixo peso molecular, que exerce seu efeito devido às semelhanças estruturais e funcionais que apresentam com os metabólitos envolvidos na síntese de ácidos nucleicos. Como são confundidos pela célula como metabólitos normais, tanto podem ser incorporados ao ácido nucleico e produzir códigos incorretos, como podem inibir as enzimas envolvidas na síntese de ácidos nucleicos (FONSECA et al., 2000). A doxorubicina é um antibiótico da antraciclina. Esse tipo de composto é capaz de se intercalar com o DNA. Muitas funções do DNA são afetadas, incluindo a síntese de DNA e RNA. Ocorrem rupturas de filamento único e filamentos duplos, bem como troca de cromátides irmãs. Por conseguinte, as antraciclinas são tanto mutagênicas quanto carcinogênicas (MOUSTACHI, 2000).

Estudos de biomarcadores humanos podem ser potencialmente usados para identificar os possíveis fatores de susceptibilidade a carcinogênese. Mudanças citogenéticas, expressão de genes e perfil epigenético podem ser usados para determinar status para químicos conhecidos como carcinógenos. O teste de micronúcleos tem sido mostrado como um preditor de riscos de câncer em humanos. Diversos ensaios para avaliação da mutagenicidade em células de mamíferos podem ser utilizados dependendo da finalidade do estudo. Dentre eles, destacam-se o ensaio do cometa e micronúcleo. O teste de micronúcleo com bloqueio da citocinese permite a comparação da frequência de danos cromossômicos, permitindo uma medida mais precisa da frequência de células micronucleadas (FENECH, 1997).

Diante do exposto o presente estudo visa à avaliação dos possíveis danos de quimioterápicos em células normais do sangue periférico e a avaliação da expressão das enzimas antioxidantes em pacientes em tratamento, como uma estratégia de aplicação clínica de biomarcadores de mutagenicidade e de estresse oxidativo.

MATERIAL E MÉTODOS

TIPO DE ESTUDO

A pesquisa se constitui como um estudo piloto de aplicação clínica de biomarcadores de mutagenicidade e do estresse oxidativo no Centro de Referência em Tratamento de Câncer de Teresina, Piauí. Será um estudo observacional, descritivo, com aplicação de testes de mutagenicidade e dosagem de enzimas antioxidantes em amostras biológicas de pacientes em tratamento de câncer de mama no Hospital São Marcos. As amostras biológicas serão devidamente processadas no Laboratório de Toxicidade Genética do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal do Piauí, para a realização dos testes.

GRUPO DE ESTUDO

Dois grupos de pacientes do sexo feminino serão avaliadas: Grupo Teste que compreenderá 30 pacientes com diagnóstico de câncer de mama em tratamento com o protocolo FAC ou protocolo AC e o Grupo controle, que compreenderá 30 pessoas que não tenham nenhum contato com medicamentos antineoplásicos e nem com outros agentes químicos/físicos potencialmente genotóxicos e/ou mutagênicos, selecionadas após aplicação do questionário de saúde.

As pacientes também serão selecionadas após a aplicação do Questionário de Saúde que segue em anexo, na Clínica de Oncologia do Hospital de referência em oncologia de Teresina, mediante os seguintes critérios: Critérios de Inclusão: Mulheres até 64 anos diagnosticadas com carcinoma ductal invasivo ou com carcinoma lobular invasivo e que serão submetidas a quimioterapia de caráter adjuvante, neoadjuvante e paliativo. Critérios de Exclusão: Mulheres acima de 64 anos, que já foram submetidos à quimioterapia prévia ou tratamento radioativo em algum momento da vida; presença de co-morbidades que levem ao uso de outros medicamentos que possam influenciar na quimioterapia; alterações de função renal e hepática; hipertensão e diabetes não controlados; presença de infecção ou lesões bucais não tratadas.

ASPECTOS ÉTICOS

Antes da coleta das amostras, será aplicado um Questionário de saúde pessoal às pacientes, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Para as pacientes envolvidas neste estudo, dados do tipo idade, sexo, hábitos de dieta, fumo e álcool, serão necessários. Para tanto, a elaboração de um questionário será baseada conforme protocolo publicado pela Comissão Internacional para Proteção Ambiental a Mutágenos e Carcinógenos (ICPEMC) (CARRANO; NATARAJAM, 1988). O projeto terá seu início somente após aprovação pelo Comitê de Ética da NOVAFAP. Este projeto é um subprojeto do projeto: Aplicação clínica de biomarcadores de genotoxicidade/mutagenicidade em tratamento quimioterápico do câncer de mama, no centro de referência em tratamento de câncer do Piauí.

Os voluntários receberão explanação da natureza e dos objetivos do estudo. Foi enfatizado que o estudo tem a finalidade de pesquisa aplicada. Os voluntários serão cientes de que é livre para se retirar a qualquer momento do estudo, sem ser obrigado a fornecer o motivo de fazê-lo, e sem que isto cause qualquer prejuízo aos mesmos. Todos os resultados obtidos no processamento das amostras serão entregues aos respectivos oncologistas, para adoção de medidas preventivas.

COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Como o tratamento antineoplásico é feito em ciclos, as amostras de sangue de cada participante serão colhidas antes de cada aplicação das drogas para posterior avaliação através do teste de micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN) e dosagem das enzimas antioxidantes. Serão realizadas 5 coletas de sangue periférico durante aplicação de 4 ciclos do protocolo FAC ou AC de maneira que a primeira amostra será coletada antes do primeiro ciclo e as demais antes de cada ciclo subsequente. A coleta será por punção venosa em ambiente livre de luz amarela/branca. No ato, serão utilizados microtubos de eppendorf heparinizados e com EDTA envolvidos em papel alumínio. A amostra obtida será usada exclusivamente para execução desta pesquisa e os dados obtidos serão encaminhados para revistas especializadas, sendo mantido o sigilo e respeitada a privacidade dos voluntários. Para tanto, a elaboração de um questionário será baseada conforme protocolo publicado pela Comissão Internacional para Proteção Ambiental a Mutágenos e Carcinógenos (ICPEMC) (CARRANO; NATARAJAM, 1988).

TESTE DE MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DA CITOCINESE

Em um frasco de cultura contendo 5 ml de meio RPMI mais 15% de soro bovino fetal, mais 1,5% de fitohemaglutinina A, será adicionado 0,5 ml de sangue da paciente e incubado a 37°C em estufa de CO₂ por 44 horas em seguida, adicionar 6 µg de CtB/ ml da cultura e conservar na estufa por mais 28 horas. Ao fim das 28 horas, transferir a cultura para um tubo de centrifuga tipo "Falcon" e centrifugar a 800 rpm, por 5 minutos, descartar o sobrenadante, agitar levemente o sedimento e adicionar, vagarosamente pela parede do tubo, 5 ml de solução hipotônica gelada (KCl 0,075M) e agitar novamente. Centrifugar a 800 rpm, por 5 minutos, descartar o sobrenadante, agitar levemente o sedimento e adicionar, vagarosamente pela parede do tubo, 5 ml de fixador (metanol/ácido acético 5:1) recém-preparado. Acrescentar 3 gotas de formaldeído e agitar. Repetir o procedimento anterior por mais 2 vezes, utilizando fixador 3:1, sem o formaldeído. Em seguida descartar o sobrenadante deixando aproximadamente 1 ml no tubo, agitar a suspensão de células, gotejar (2 a 4 gotas/lâmina) sobre as lâminas previamente lavadas e deixar secar a temperatura ambiente. Corar com solução Giensa 5%, por 7 minutos (MALUF; RIEGEL, 2011).

DOSAGEM DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Catalase

As hemácias serão obtidas após centrifugação do sangue total por 5 minutos a 3.500 rpm/4°C. As hemácias serão lavadas com solução gelada de NaCl (0,9%) e centrifugadas a 3.500 rpm/4°C, desprezando-se o sobrenadante. O processo será repetido por 3 vezes. Da papa de eritrócitos final, retirar uma alíquota de 100 µL dos glóbulos vermelhos lavados e acrescentar 900 µL de solução tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,4) e congelar a – 20°C. Centrifugar por 15 minutos a 3500 rpm. Em seguida será colocado na cubeta de quartzo 940 µL do meio de reação mais 60 µL do hemolisado a 10% preparado em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4. E feita à leitura durante 6 min a temperatura de 37°C em espectrofotômetro a 230 nm. O branco cinético foi feito pela a leitura na absorbância relativa a 230 nm com apenas 1ml do meio reacional.

Superóxido dismutase

Centrifugar as amostras (hemolisado a 10%) a 5000 rpm por 45 min. a 4 °C e remover o sobrenadante para determinar a atividade da SOD (Despreza o precipitado). Em uma cubeta de vidro adicionou, 970 µl do meio reacional, 20 µl do sobrenadante e 10 µl da xantina oxidase, seguido de agitação. Realizar a leitura em espectrofotômetro a 550 nm em temperatura ambiente durante 6 minutos. O branco cinético foi feito pela adição apenas do sistema gerador de ânion superóxido e o citocromo C, e foi realizada a leitura do branco na absorbância relativa à oxidação do citocromo C à 550 nm.

CRONOGRAMA

Realização dos testes		X	X	X	X	X	X			
Coleta de dados				X	X	X	X			
Estatística dos dados						X	X			
Discussão dos resultados							X	X		
Qualificação									X	
Correção dos dados da Qualificação									X	
Defesa da Dissertação										X

Realização dos testes		X	X	X	X	X	X			
Coleta de dados				X	X	X	X			
Estatística dos dados						X	X			
Discussão dos resultados							X	X		
Qualificação									X	
Correção dos dados da Qualificação									X	
Defesa da Dissertação										X

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA VR, LEITÃO A, REINA LCB, MOUNTANARI A E DONNICI CL. Câncer e Agentes Antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. Química Nova, vol. 28, p. 118-129, 2005.
- CARRANO, A. ; NATARAJAN, A. T. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques International Commission for protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (ICPEMC publication 14). Mutation Research, vol. 204, p.379 – 406, 1988.
- DA CUNHA, S. S. et al. Efeitos da Radioterapia no Tecido Ósseo. Radiol Bras, vol.40, p.189–192, 2007.
- FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. Mutation Research, vol. 392, p. 11-18, 1997.
- FONSECA, S.M. et al. Manual de Quimioterapia Antineoplásica, Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso. 2000.
- LEAL, L. S. Avaliação da Mutagenicidade Induzida por Raios X Periapical em Células da Mucosa Bucal de Pacientes em Tratamento Odontológico. ULBRA, Porto Alegre, 2009.
- MALUF, S. W.; RIEGEL, M. Citogenética Humana. Porto Alegre: Artmed Ltda, ed.1, v. 1, p. 336, 2011.
- MARTA, G. N. et al. Câncer de mama estágio inicial e radioterapia: atualização. Rev. Assoc. Med. Bras. vol.57 no.4 São Paulo July/Aug. 2011.
- MOUSTACCHI, E. DNA damage and repair: consequences on dose-responses. Mutation Research. vol. 464, p. 35-40, 2000.
- ROBERT, L. N. et al. Genética Médica. Rio de Janeiro: Elsevier, . C.16, p. 389-390, 2008.
- SANTOS, D. B. e VIEIRA E. M. Imagem corporal de mulheres com câncer de mama: uma revisão sistemática da literatura. Ciência & Saúde Coletiva, vol. 16, p. 2511-2522, 2011.

CS02 - Ensaios pré-clínicos com a ciano-carvona

Gabriela da Costa Soares^{1,*}(IC), Thallita Castelo Branco de Andrade³ (PQ), Thiago Henrique Costa Marques² (PQ), Rivelilson Mendes de Freitas^{2,3} (PQ)

1 Universidade Federal do Piauí – Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental.

2 Universidade Federal do Piauí - Rede Nordeste de Biotecnologia.

3 Universidade Federal do Piauí - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. E-mail: gabrielasoares_@hotmail.com

* Autor principal

Palavras Chave: Ansiedade. Camundongo. Ciano-carvona. Óleos essenciais.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A ciano-carvona (CC), derivado sintético da carvona, foi avaliada em camundongos para efeitos neurofarmacológicos, hematológicos e bioquímicos. **METODOLOGIA:** CC obtida por adição de cianeto em meio aquoso a R-(-)-carvona a 0 oC, com acréscimo de ácido acético (rendimento 90%). Protocolos e procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI (CEEA/UFPI nº 012/2011). Animais: Camundongos Swiss machos, 25-30 g, 2 meses de idade, temperatura = 23 ± 2 °C, ciclo claro-escuro = 12 h, comida (Purina®) e água ad libitum. Grupos tratados (via intraperitoneal, N = 10, 30 dias): Veículo (Salina 0,9%), DZP (diazepam 1 mg/kg), CC 25 (CC 25 mg/kg), CC 50 (CC 50 mg/kg) e CC 75 (CC 75 mg/kg). Testes: campo aberto, claro-escuro, rotarod, análise hematológica e bioquímica. Análise estatística: Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste t-Student-Newman-Keuls como post hoc teste. Diferenças significativas se p<0,05. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** No teste de campo aberto, CC mostrou diminuição significativa no número de cruzamentos e de rearings em comparação a Veículo, sugerindo redução da atividade locomotora. No teste de claro-escuro, CC mostrou aumento significativo no número de entradas no campo claro em comparação a Veículo, mostrando efeito ansiolítico. No teste rotarod, não houve diferença significativa entre os grupos tratados com CC e Veículo, sugerindo ausência de relaxamento muscular. Nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, os grupos tratados com CC apresentaram aumento de glicemia, TGO e TGP, sugerindo cautela em diabéticos e hepatopatas. **CONCLUSÃO:** CC mostrou reações adversas e apresentou efeito ansiolítico.

INTRODUÇÃO

A carvona (p-mentha-6,8-dien-2-ona) é um monoterpene cetônico encontrado como o principal componente ativo de diversos óleos essenciais de plantas medicinais. Apresenta propriedades farmacológicas antimicrobiana (DUARTE, 2006), antifúngica (SARTORATTO et al., 2004), anti-inflamatória e antisséptica (SOUSA, 2004), além de ser empregada na indústria farmacêutica, alimentícia e de cosméticos. Assim, a potencial atividade farmacológica da ciano-carvona (CC), um derivado sintético da carvona, foi estudada em modelos experimentais para a elucidação dos seus efeitos neurofarmacológicos, bem como foi investigada as alterações hematológicas e bioquímicas em camundongos para avaliação de possível utilização de forma segura em humanos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do composto

Realizou-se adição de cianeto em meio aquoso a R(-)-carvona a 0 °C, sendo em seguida acrescentado ácido acético à mistura. A partir desta reação, foi obtido o composto (cetronitrila ou ciano carvona) com 90% de rendimento. Esta reação ocorreu por meio da adição de 1,4 do ânion cianeto, que é termodinamicamente mais favorável e irreversível, contudo mais lenta que a adição 1,2.

Animais

Camundongos machos albinos (*Mus musculus*), variedade *Swiss*, adultos, com 2 meses de idade e peso variando de 25-30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias - CCA da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

Durante todos os experimentos, os animais foram aclimatados a 25 ± 2 °C e mantidos em gaiolas de acrílico apropriadas, com no máximo seis animais. Os animais foram observados durante 24h em condições ambientais semelhantes, com ciclo claro/escuro alternado de 12 horas, recebendo ração padrão tipo Purina e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados e usos de animais de laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (EUA).

Todos os experimentos desenvolvidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI (CEE/UFPI nº 012/2011).

Tratamento dos animais

Grupos (N = 10): Veículo (Salina 0,9%), DZP (diazepam 1 mg/kg), CC 25 (CC 25 mg/kg), CC 50 (CC 50 mg/kg) e CC 75 (CC 75 mg/kg). As drogas foram utilizadas por via intraperitoneal (i.p.), por 30 dias consecutivos. Nos últimos quatro dias de tratamento, meia hora após a administração das drogas, os testes experimentais foram realizados (um teste por dia).

Avaliação da atividade locomotora de camundongos em tratamento agudo com doses repetidas com CC (teste de campo aberto)

Este teste avalia a atividade exploratória do animal (ARCHER, 1973). Foi realizado em recipiente de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm³) dividido em nove quadrados de áreas iguais. Cada camundongo foi colocado individualmente no centro da arena, sendo permitida a ele a livre exploração do ambiente. Os parâmetros observados foram: número de cruzamentos (quadrados cruzados com as quatro patas), número de groomings (movimentos de auto-limpeza) e de rearings (ato de empinar as patas dianteiras), registrados para o período de teste de 5 min.

Avaliação da coordenação motora dos camundongos em tratamento agudo com doses repetidas com CC (teste de rotarod)

Este teste mede o efeito do relaxamento muscular ou incoordenação motora produzidos por drogas nos animais (CARLINI; BURGOS, 1979). Para este teste, os camundongos foram colocados com as quatro patas sobre uma barra de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso, em uma rotação de 17 rpm, por um período de 3 minutos. Foram registrados o tempo de permanência na barra giratória, em segundos (s), e o número de quedas, com três reconduções, no máximo.

Avaliação do efeito ansiolítico em camundongos em tratamento agudo com doses repetidas com CC (teste claro escuro)

Os animais foram colocados, um por vez, no aparato de acrílico dividido em 2 compartimentos (campo claro e campo escuro) que se comunicam por meio de uma pequena porta (CRAWLEY, 1985). O campo escuro (acrílico preto, 27 x 18 x 29 cm) é pobremente iluminado. O campo claro (acrílico 2 transparente, 27 x 18 x 29 cm) é iluminado pela luz do ambiente. O animal foi observado por 5 minutos. O parâmetro utilizado é o tempo de permanência e o número de entradas em segundos no campo claro.

Análise hematológica e bioquímica de camundongos em tratamento agudo com doses repetidas com CC

As análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas no laboratório do Hospital Universitário da Universidade Federal do Piauí.

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (10 - 15 mg/100 g de peso, i.p.) e a coleta do sangue foi realizada por punção do plexo retro-orbital, utilizando-se agulhas e seringas e tubos de microhematócrito. O sangue foi acondicionado em dois tipos de tubo: um com anticoagulante HB (Laborlab®) para determinação dos parâmetros hematológicos, e o outro, sem anticoagulante, para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos.

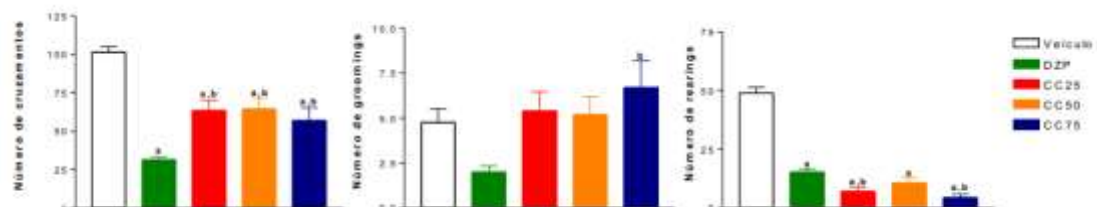
Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste t-Student-Newman-Keuls como post hoc teste. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste de campo aberto, CC (nas três doses) mostrou diminuição significativa no número de cruzamentos e de rearings em comparação ao grupo Veículo, sugerindo que CC reduz a atividade locomotora (Ilustração 1).

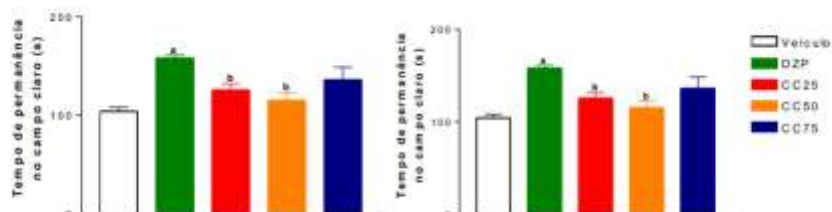
Ilustração 1- Efeito do tratamento agudo com doses repetidas de CC no teste de campo aberto em camundongos.



Valores são média \pm E.P.M. ^aquando comparado ao grupo Veículo ($p < 0,05$); ^bquando comparado ao grupo DZP ($p < 0,05$).

No teste de claro-escuro, os grupos CC 25 e CC 50 mostraram aumento significativo no número de entradas no campo claro em comparação ao grupo Veículo, sugerindo que CC pode ter efeito ansiolítico (Ilustração 2).

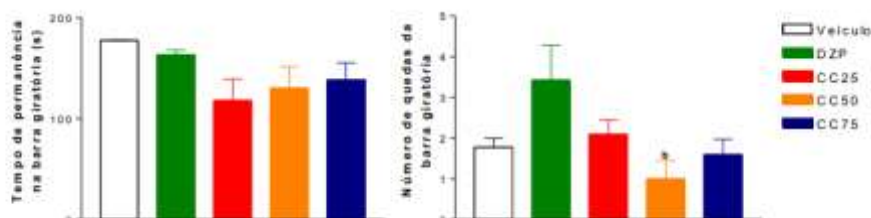
Ilustração 2- Efeito do tratamento agudo com doses repetidas de CC no teste de claro-escuro em camundongos.



Valores são média ± E.P.M. ^aquando comparado ao grupo Veículo (p<0.05); ^bquando comparado ao grupo DZP (p<0.05).

No teste rotarod, não houve diferença significativa entre os grupos tratados com CC nas três doses e o grupo Veículo, sugerindo ausência de efeito relaxante muscular de CC nos animais (Ilustração 3).

Ilustração 3- Efeito do tratamento agudo com doses repetidas de CC no teste de rotarod em camundongos.



Valores são média ± E.P.M. ^aquando comparado ao grupo Veículo (p<0.05); ^bquando comparado ao grupo DZP (p<0.05).

Os tratamento com CC nas três doses não apresentaram alterações hematológicas significativas clinicamente, mas CC causou aumento significativo de glicemia, AST e ALT (Tabelas 1 e 2). Os resultados sugerem uso em pacientes hipoglicêmicos, porém se deve ter cautela em pacientes diabéticos e hepatopatas.

Tabela 1- Efeito do tratamento agudo com doses repetidas de CC em parâmetros hematológicos de camundongos.

Parâmetros hematológicos	Controle (n=10)	CC 25 (n=10)	CC 50 (n=10)	CC 75 (n=10)
Eritrócitos (mm ³)	8,63 ± 0,03	10,72 ± 0,67 ^a	10,56 ± 0,56 ^a	10,98 ± 0,44 ^a
Hemoglobina (g/dL)	14,17 ± 0,17	17,84 ± 0,86 ^a	11,70 ± 2,94 ^b	14,75 ± 0,60
Hematócrito (%)	42,90 ± 0,48	55,11 ± 3,34 ^a	53,20 ± 2,69 ^a	55,60 ± 2,57 ^a
VCM (fL)	49,71 ± 0,04	51,40 ± 0,54 ^a	50,25 ± 0,95	50,50 ± 0,65
HCM (pg)	16,42 ± 0,03	16,75 ± 0,27	13,48 ± 0,28 ^{a,b}	13,43 ± 0,19 ^{a,b}
CHCM (g/dL)	35,93 ± 0,38	32,57 ± 0,34 ^a	26,73 ± 0,23 ^{a,b}	26,53 ± 0,24 ^{a,b}
Plaquetas (mm ³)	292,4 ± 0,8	618,7 ± 51,4 ^a	859,5 ± 71,7 ^{a,b}	668,5 ± 80,9 ^{a,c}
Leucócitos (mm ³)	8,53 ± 0,77	7,31 ± 0,80	5,77 ± 1,20	6,30 ± 0,35
Neutrófilos (%)	17,00 ± 0,79	9,30 ± 1,59 ^a	15,50 ± 2,02 ^b	14,50 ± 0,64 ^b
Eosinófilos (%)	0,35 ± 0,02	1,40 ± 0,27 ^a	2,25 ± 0,25 ^a	2,50 ± 0,64 ^{a,b}
Linfócitos (%)	78,12 ± 0,31	79,10 ± 2,82	71,50 ± 3,48	72,50 ± 1,55
Monócitos (%)	2,70 ± 0,21	10,20 ± 1,26 ^a	10,75 ± 1,44 ^a	10,50 ± 0,87 ^a

Valores são média ± E.P.M. ^ap<0,05 versus grupo Veículo, ^bp<0,05 versus grupo CDC 25, ^cp<0,05 versus grupo CDC 50.

Tabela 2- Efeito do tratamento agudo com doses repetidas de CC em parâmetros bioquímicos de camundongos.

Parâmetros bioquímicos	Controle (n=10)	CC 25 (n=10)	CC 50 (n=10)	CC 75 (n=10)
Glicose (mg/dL)	88,73 ± 0,11	115,9 ± 7,71 ^a	159,0 ± 14,65 ^{a,b}	128,5 ± 3,12 ^{a,b}
Ureia (mg/dL)	54,67 ± 0,30	70,3 ± 2,20 ^a	37,25 ± 1,38 ^{a,b}	37,75 ± 1,18 ^{a,b}
Creatinina (mg/dL)	0,43 ± 0,04	1,24 ± 0,09 ^a	0,30 ± 0,12 ^b	0,21 ± 0,01 ^b
Ácido úrico (mg/dL)	2,61 ± 0,04	10,32 ± 0,51 ^a	5,70 ± 0,54 ^{a,b}	6,22 ± 0,15 ^{a,b}
Triglicérides (mg/dL)	106,7 ± 0,05	129,1 ± 7,84 ^a	75,00 ± 5,70 ^{a,b}	73,25 ± 0,63 ^{a,b}
Colesterol total (mg/dL)	86,1 ± 0,57	193,0 ± 10,8 ^a	102,8 ± 4,13 ^b	93,00 ± 3,98 ^b
AST (U/mL)	91,4 ± 1,81	95,1 ± 3,19	186,0 ± 12,8 ^{a,b}	167,8 ± 16,5 ^{a,b}
ALT (U/mL)	57,83 ± 0,8	50,30 ± 3,0	119,8 ± 12,0 ^{a,b}	105,8 ± 9,2 ^{a,b}
Bilirrubina total (mg/dl)	0,26 ± 0,02	0,60 ± 0,05 ^a	0,37 ± 0,09 ^b	0,23 ± 0,02 ^b
Bilir. direta (mg/dl)	0,15 ± 0,02	0,24 ± 0,04	0,14 ± 0,02	0,12 ± 0,03
Bilir. indireta (mg/dl)	0,11 ± 0,02	0,36 ± 0,04 ^a	0,23 ± 0,10	0,11 ± 0,01 ^b

Valores são média ± E.P.M. ^ap<0,05 versus grupo Veículo, ^bp<0,05 versus grupo CDC 25, ^cp<0,05 versus grupo CDC 50.

CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que o tratamento agudo com doses repetidas de CC mostrou alterações adversas e apresentou efeito ansiolítico sem alterar a coordenação motora de camundongos. Após mais estudos, CC poderá ser usado como nova formulação farmacêutica no tratamento alternativo da ansiedade.

REFERÊNCIAS

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim. Behav.*, v. 21, p. 205-235, 1973. CARLINI, E.A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorbenzapam. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 1, p. 25-31, 1979. CRAWLEY, J. N. Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 9, p. 37-44, 1985. DUARTE, M.C.T. Construindo a história dos produtos naturais. *Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil*, v. 7, 2006.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SOUSA, O.V.; SOARES-JÚNIOR, D.T.; DEL-VECHIO, G.; MATTOSINHOS, R.G.; GATTAS, C.R.; KAPLAN, M.A.C. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do óleo essencial de cascas de *Duguetia lanceolata* St. Hil., Annonaceae. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 14, p. 11-14, 2004.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e FAPEPI pelo apoio financeiro.

CS03 - Avaliação da toxicidade reprodutiva do Garcinielliptone FC (GFC) extraído da *Platonia insignis* Mart em ratos

Wistar

Joselma Sousa Lacerda^{1*} (IC), Mirna Luciano de Gois da Silva² (PG), Ana Paula dos Santos Correia Lima da Silva² (PG), Mônica Cristiane Soares Mendes³ (PG), Rivelilson Mendes de Freitas¹ (PQ).

1. Universidade Federal do Piauí – Curso de Graduação em Farmácia
2. Universidade Federal do Piauí – Doutorado RENORBIO
3. Universidade Federal do Piauí – Mestrado em Ciências Farmacêuticas

* Autor principal

joselma.soudedeus@hotmail.com

Palavras-chave: *Platonia insignis* Mart. Garcinielliptone FC. Plantas medicinais. Toxicidade.

RESUMO

A *Platonia insignis* Mart é espécie popularmente denominada de bacuri no Brasil e tem grande importância econômica para o Piauí. A partir de sua semente pode ser extraído o Garcinielliptone FC (GFC). O presente estudo avaliou a toxicidade reprodutiva desse extrato considerando o peso corporal dos ratos Wistar e o consumo médio de água e ração. Utilizou-se trinta e seis ratos Wistar adultos, machos e fêmeas. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram tratados por via oral com GFC na dose 0,25 g.kg⁻¹ e ao grupo controle, solução salina. A análise dos machos e fêmeas considerou a variação do peso corporal e alimentação. Observou-se que houve variação de peso corpóreo entre machos (296%) e fêmeas (117%) tratados no período pré acasalamento. O consumo de água e ração foi variável entre os sexos dos ratos, sendo registrada uma consumação maior em fêmeas, mas que não variou em relação aos controles. Portanto, a administração de GFC não mostrou toxicidade nas variáveis analisadas entre os grupos tratados e controle, entretanto, estudos continuam sendo realizados através da autópsia dos animais e peso dos órgãos dos animais tratados.

INTRODUÇÃO

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes tem sido objeto de incessantes estudos, uma vez que já foram comprovadas as ações farmacológicas por meio de testes pré-clínicos com animais. Muitas dessas substâncias têm grandes possibilidades de futuramente virem a ser aproveitadas como agentes medicinais (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

As plantas medicinais desempenham, portanto, papel muito importante na medicina moderna, pois podem fornecer fármacos extremamente importantes, os quais dificilmente seriam obtidos via síntese química; as fontes naturais fornecem compostos que podem ser levemente modificados, tornando-os mais eficazes ou menos tóxicos; e os produtos naturais podem ser utilizados como protótipos para obtenção de fármacos com atividades terapêuticas semelhantes a dos compostos originais (ROBBERS, et al., 1996).

Além disso, sabe-se que muitas plantas medicinais apresentam substâncias que podem desencadear reações adversas, seja por seus próprios componentes, seja pela presença de contaminantes ou adulterantes presentes nas preparações fitoterápicas, exigindo um rigoroso controle de qualidade desde o cultivo, coleta da planta, extração de seus constituintes, até a elaboração do medicamento final (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

A espécie *Platonia insignis* Mart, conhecida popularmente como “bacuri”, pertence à família Clusiaceae. Algumas plantas dessa família têm as suas propriedades farmacológicas associadas com a presença de xantona e derivados policíclicos acilforoglucinol poliprenilado, que têm propriedades antioxidantes e atividades anticancerígenas. O Garcinielliptone FC (GFC) é isolado a partir do extrato hexânico das sementes da *Platonia insignis* (COSTA JUNIOR, 2012).

A toxicidade reprodutiva refere-se à interferência tóxica a qualquer espécie de capacidade reprodutiva tanto de machos, quanto de fêmeas, incluindo o desenvolvimento pré-natal (NEUBERT e CHAHOUD, 1995). Diante disso, os estudos de toxicidade de substâncias puras ou plantas utilizam doses que sejam capazes de provocar toxicidade sistêmica, na qual o resultado mais comum é a variação de massa corporal e consumo de água e ração (CHAPIN et al., 1993).

Baseado na necessidade de dados sobre a toxicidade reprodutiva do Garcinielliptone FC (GFC) extraída da *Platonia insignis* Mart, o presente estudo avaliará os possíveis efeitos adversos resultantes da administração via oral do extrato GFC sobre o sistema reprodutivo de ratos Wistar, após exposição durante o seu desenvolvimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 36 ratos Wistar (12 machos e 24 fêmeas) criados e mantidos no biotério do Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental (LAPNEX) da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram mantidos em gaiolas com temperatura controlada (22 ± 2 °C), obedecendo a um ciclo claro/escuro de 12 horas e receberam água e ração à vontade, sendo aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI sob o nº 078/12. Os animais foram previamente aclimatados durante 5 dias antes do início do ensaio, e posteriormente divididos em gaiolas com machos e fêmeas, nas quais iniciou-se a administração da dose 0,25 g/Kg de GFC e a mesma dose com solução salina no grupo controle, ambos por via oral durante seis semanas nos machos e 2 semanas nas fêmeas antes do período de cruzamento. Após esse período, eles foram postos em acasalamento. Os animais foram observados diariamente tendo o registro de sua massa corporal e consumo de água e ração. A análise dos dados e a confecção dos gráficos foram feitas através do programa Excel 2007.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho apontou que ratos Wistar, tanto machos quanto fêmeas, sob a administração diária por via oral, com dose de 0,25 g/kg de GFC durante os períodos de pré acasalamento apresentaram um aumento de peso corporal, sendo 296% para os machos e 117% para as fêmeas, mas durante o período pós acasalamento somente as fêmeas apresentaram uma diminuição do peso corporal quando comparadas ao grupo controle. A figura 1 mostra o ganho relativo de massa corporal durante os 50 dias de tratamento prévios ao acasalamento com os grupos tratados.

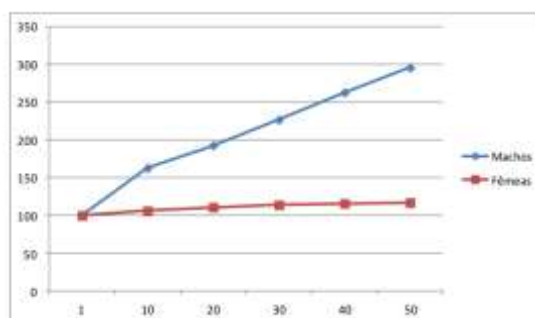


Fig. 1: Desenvolvimento ponderal de ratos Wistar tratados com GFC (0,25 g.kg-1) extraído da espécie *Platonia insignis* Mart.

O acompanhamento do peso corporal durante todo o tratamento fornece um índice geral do estado de saúde dos animais, e essa informação pode ser importante para a interpretação dos efeitos reprodutivos (EPA, 1996). O presente estudo mostrou que a administração de GFC não interferiu no consumo médio de água e ração quando comparados ao grupo controle, mas que houve uma diferença significativa no consumo de água das fêmeas em relação aos machos (Fig. 2).

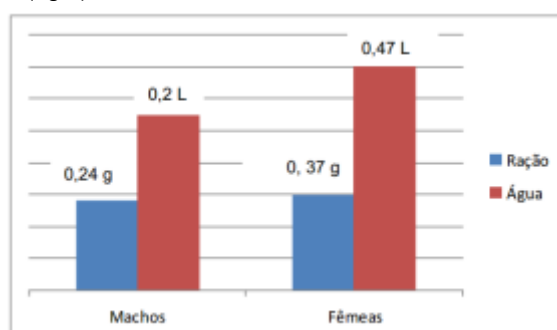


Fig. 2: Média de consumo de água (L) e ração (Kg) de ratos Wistar tratados com GFC (0,25 g.kg-1) extraído da espécie *Platonia insignis* Mart. durante 50 dias prévios ao acasalamento

A análise do peso corporal dos animais em experimento permitiu observar que não houve variação de massa corpórea nos machos quando comparados ao grupo controle, mas nos ratos Wistar fêmeas ocorreu variação no peso no período após acasalamento (Fig.3). Este fato, segundo EPA (1996) é justificado pelo estado fisiológico das fêmeas, pois os níveis de estrogênio e progesterona influenciam na ingestão de alimentos e no consumo energético, além das taxas de retenção de água e deposição de gordura serem afetadas.

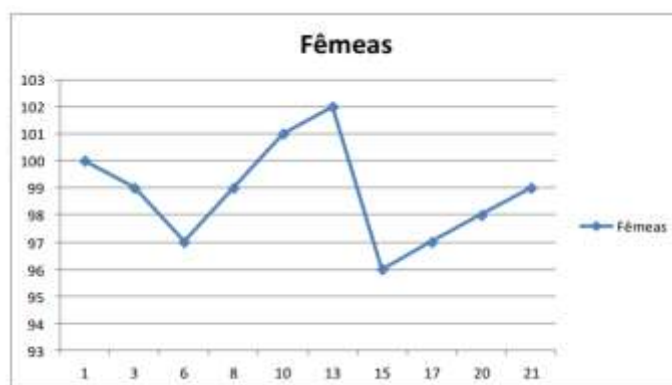


Fig. 3: Desenvolvimento ponderal de ratas Wistar tratadas com GFC (0,25 g.kg-1) extraído da espécie *Platonia insignis* Mart. durante período após o acasalamento.

CONCLUSÃO

A presente avaliação da toxicidade reprodutiva do Garcinielliptone FC mostrou que a administração por via oral da substância GFC causou aumento de peso corporal nos animais, sendo maior nos machos durante o período pré acasalamento, apesar das fêmeas terem um maior consumo de água e ração. Neste contraponto pode-se inferir que o ciclo hormonal possa interferir no peso. O ganho de peso das fêmeas ocorreu somente no período pós acasalamento, mas que não apresentou toxicidade reprodutiva quando comparada ao grupo controle.

Estudos relacionados ao ganho de peso nos órgãos dos ratos Wistar estão sendo realizados através da autópsia e análise dos animais.

REFERÊNCIAS

- CECHINEL FILHO, V, YUNES, RA. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quím Nova*. v. 21, p. 99-105, 1998.
- CHAPIN, R.E. et al.. The effects of feed restriction on reproductive function in Sprague-dawley rats. *Fundam. Appl. Toxicol*, v.20, p. 23-29, 1993.
- COSTA JUNIOR, J.S. et al.. Cytotoxic and leishmanicidal properties of garcinielliptone FC, a prenylated benzophenone from *Platonia insignis*. *Nat Prod Res*, iFirst, p. 1-5, 2012.
- EPA – Environmental Protection Agency. Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. Federal Register, v.61, p. 56274-56322, 1996.
- NEUBERT, D.; CHAHOUD, I. Possible consequences of pre- or early postnatal exposure to substances with estrogenic or androgenic properties. *Endocr Chemical Environ*, v.3, p.24-52, 1995.
- ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*. Baltimore: Willians & Wilkins, p.1-14, 1996.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental pela realização do estudo.

CS04 - Avaliação genotóxica da fração hidroalcoólica do babaçu (*Orbinya phalerata* M.) através do teste *Allium cepa* L.

Lais Iasmin Soares da Silva¹, Alisson Ferreira Dantas², Antonio Luiz Gonzaga Júnior², Nouga Cardoso Batista³, Lívio César Cunha Nunes⁴, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante⁴

1 Universidade Federal do Piauí - Graduanda em Farmácia

2 Universidade Federal do Piauí - Pós-graduado em Ciências Farmacêuticas

3 Universidade Estadual do Piauí – Coordenador Geral do Projeto Geração de Nova Tecnologias (GERATEC)

4 Universidade Federal do Piauí - Orientador no curso de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas *lais13_@hotmail.com

Palavras-chave: *Orbigny phalerata* M., *Allium cepa* L., genotoxicidade.

RESUMO

O babaçu, *Orbigny phalerata* M., é uma árvore utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças em comunidades da região nordeste. Porém, para ser usado como fonte de fármacos, recomenda-se o uso de testes genotóxicos a possíveis novos fármacos. Este estudo teve como objetivo avaliar a genotoxicidade da fração hidroalcoólica do mesocarpo do babaçu pelo teste *Allium cepa* L.. Três concentrações da fração hidroalcoólica (25, 50 e 100 µg/mL) diluídas em uma solução de Tween + DMSO foram utilizadas no teste A. cepa. A solução de Tween + DMSO também foi testada e como controles foram usados água da torneira desclorificada e sulfato de cobre (1,2 µg/mL) para controle negativo e positivo, respectivamente. A genotoxicidade foi avaliada através de três parâmetros: 1) comprimento das raízes (toxicidade), 2) índice mitótico (citotoxicidade), e 3) aberrações cromossômicas (ACs) e micronúcleos (MNs) (mutagenicidade). A fração hidroalcoólica não exibiu efeitos tóxicos, entretanto todas as concentrações testadas demonstraram ações citotóxicas em meristemas de raízes de A. cepa. Embora tenha sido observado atividade mutagênica na concentração de 50 µg/mL quanto a frequência de ACs, esta fração não foi capaz de induzir a formação de MNs em meristemas de raízes de A. cepa. Estes dados vão ao encontro com estudos que relatam atividade citotóxica e ausência de mutagenicidade para extratos do mesocarpo do babaçu. Portanto, sugere-se o uso da fração hidroalcoólica como fonte de obtenção de fármacos com ação citotóxica, entretanto outros estudos são necessários para permitir a sua utilização de modo seguro e eficaz.

INTRODUÇÃO

O babaçu, *Orbigny phalerata* M., é uma palmeira comum na região nordeste brasileira e utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças (SOUZA et al., 2011). Esta palmeira possui atividade antimicrobiana, antinociceptivos e cicatrizante (BALDEZ et al., 2006; CAETANO et al., 2002; PINHEIRO et al., 2012).

Entretanto, para produtos derivados do babaçu serem utilizados como fonte novos fármacos, órgãos de saúde como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomendam o uso do teste genotóxicos em possíveis candidatos a novos fármacos antes de estes serem comercializados. Teste de genotoxicidade detectam danos ao DNA produzidos por agentes químicos ou físicos (CHEN et al., 2008). O teste *Allium cepa* L. é um bioensaio simples, rápido, sensível e de boa correlação com outros testes (FISKESJÖ, 1985).

Tendo em vista o potencial do babaçu para a obtenção de fármacos e a necessidade de teste genotóxicos para assegurar seu uso a população, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos tóxicos, citotóxicos e mutagênicos da fração hidroalcoólica do mesocarpo do fruto do babaçu através do teste A. cepa.

MATERIAL E MÉTODOS

A fração hidroalcoólica do mesocarpo do fruto do babaçu foi obtida através da maceração do mesocarpo com álcool a 70%, seguido de filtração, concentração com auxílio do rota-vapor da solução resultante e liofilização. Para a avaliação tóxica, citotóxica e mutagênica no teste A. cepa foram utilizadas três concentrações (25, 50 e 100 µg/mL) desta fração diluídas em uma solução de Tween + DMSO.

O teste A. cepa seguiu o protocolo sugerido por Fiskesjö (1985) com algumas modificações. Os bulbos de A. cepa, com tamanho e peso uniformes adquiridos comercialmente em mercados populares de Teresina-PI, tiveram seus catáfilos externos secos removidos sem ter a área radicular danificada. Em seguida, os bulbos foram lavados em água de torneira e expostos às três concentrações da fração hidroalcoólica em um local com temperatura controlada de 20 °C, sem vibrações e sem iluminação direta durante 72 horas. A toxicidade foi avaliada pelo comprimento das raízes de A. cepa, enquanto que avaliação da citotoxicidade foi feita através do Índice Mitótico (IM) e a mutagenicidade foi analisada pela frequência de Aberrações Cromossômicas (ACs) e de Micronúcleos (MNs) (LEME e MARIN-MORALES, 2009).

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.00, por meio de estatística descritiva e ANOVA não paramétrica, com o teste de Tukey, para múltiplas comparações entre os grupos do sistema teste, com níveis de significâncias de *P < 0,05, **P < 0,01 e ***P < 0,001.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através dos resultados obtidos pode-se detectar que a fração hidroalcoólica não inibiu o crescimento das raízes indicando ausência de efeitos tóxicos em raízes de A. cepa. Observou-se também que a fração hidroalcoólica diminui o IM em todas as concentrações testadas demonstrando que esta fração teve efeitos citotóxicos em meristemas de raízes de A. cepa (Tabela 1). Estes dados são similares a resultados que demonstram citotoxicidade para extrato aquoso do pó do mesocarpo do fruto do babaçu em meristemas de A. cepa (SILVA, 2011).

Quanto aos efeitos mutagênicos, apesar de todas as concentrações terem induzidos ACs do tipo fragmento cromossômicos, mutagenicidade em meristemas de raízes de A. cepa pela frequência total de ACs foi observado somente na concentração de 50 µg/mL. Entretanto, estas ACs foram reparadas pelas células meristemáticas de A. cepa, pois efeitos mutagênicos não foram detectados quando avaliado a frequência de MNs (Tabela 1). ACs não reparadas pelas células podem resultar em mutações que induzem a formação de MNs (ROCHA et al., 2011). Ausência de atividade mutagênica para extrato obtido do mesocarpo do fruto do babaçu também tem sido relatada em linhagens nas linhagens de TA97a e T100 de *Salmonella typhimurium* (SANTOS et al., 2006).

Tabela 1 – Índice mitótico, aberrações cromossômicas, micronúcleos e comprimento das raízes de A. cepa expostas a fração hidroalcoólica do mesocarpo do fruto do babaçu.

Grupos	Índice mitótico (células em divisão/5.000)	Aberrações Cromossômicas				Frequência Total	Células com micronúcleos (MN/5.000)	Comprimento das raízes (cm)
		Atrasos Anafásicos	Fragmentos Cromossômicos	Pontes Anafásicas	Cromossomos Soltos			
Controle Negativo	40,66 ± 10,19	4,40 ± 3,20	0,60 ± 0,89	0,20 ± 0,44	0,40 ± 0,54	5,60 ± 3,20	0,20 ± 0,44	0,70 ± 0,17
Controle Positivo	11,38 ± 2,88****	11,00 ± 4,63**	3,60 ± 0,89**	3,80 ± 3,63**	4,60 ± 2,88**	23,00 ± 9,30****	3,00 ± 1,87**	0,49 ± 0,06**
Tween + DMSO	31,24 ± 3,69	6,80 ± 2,68	2,00 ± 1,22	0,60 ± 0,89	2,40 ± 2,30	11,80 ± 2,28	0,20 ± 0,44	0,72 ± 0,32
Hidroalcoólica 25 µg/mL	29,22 ± 2,41**	7,00 ± 2,55	4,00 ± 0,70**	0,40 ± 0,54	2,80 ± 2,58	14,20 ± 4,49	0,60 ± 0,54	0,62 ± 0,11
Hidroalcoólica 50 µg/mL	29,28 ± 1,06**	6,80 ± 3,42	4,80 ± 2,38**	1,20 ± 1,30	2,60 ± 0,89	17,40 ± 6,84**	1,00 ± 1,00	0,70 ± 0,08
Hidroalcoólica 100 µg/mL	26,48 ± 3,97**	6,20 ± 3,11	4,00 ± 2,55**	2,00 ± 1,87	1,80 ± 1,09	16,00 ± 5,09	1,40 ± 1,14	0,64 ± 0,11

Controle Negativo utilizado foi água de torneira sem cloro. Controle Positivo usado foi sulfato de cobre (1,2 µg/ml). * Significante em relação ao controle negativo. * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001. Teste de Tukey com Múltiplas Comparações.

CONCLUSÃO

Portanto, pode-se concluir que a fração hidroalcoólica do mesocarpo do fruto do babaçu não teve efeitos tóxicos, demonstrou citotoxicidade para todas as concentrações testadas em meristemas de raízes de *A. cepa* e, apesar de ter observado efeitos mutagênicos quanto a frequência de ACs na concentração de 50 µg/mL, esta fração não mostrou ter ação mutagênica capaz de ocasionar a formação de MNs em meristemas de *A. cepa*. Estes dados sugerem o uso da fração hidroalcoólica como fonte para a obtenção de fármacos com ação citotóxica, porém é necessário a utilização de outros testes genotóxicos, principalmente em humanos, para comprovar seus efeitos e ser usado de modo seguro e eficaz.

REFERÊNCIAS

- BALDEZ, R. N.; MALAFAIA, O.; CZECZKO, N. G.; MARTINS, N. L. P.; FERREIRA, L. M.; RIBAS, C. A. P. M.; JÚNIOR, G. S.; del CLARO, R. P.; dos SANTOS, L. de O. M.; NETO, L. G.; de ARAÚJO, L. R. R. Análise da cicatrizaçã do cólon com uso do extrato aquoso da *Orbignya phalerata* (Babaçu) em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. v. 21, p. 31-38. 2006.
- CAETANO, N.; SARAIVA, A.; PEREIRA, R.; CARVALHO, D.; PIMENTEL, M. C. B.; MAIA, M. B. S. Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como antiinflamatório. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 12, p. 132-135. 2002.
- CHEN, T.; MOORE, R. H.; HARRIS, A. J. Genetic Toxicology. In: *Toxicology Principles for the Industrial Hygienist*. William E. Luttrell, Warren W. Jederberg, Kenneth R. Still. (Org.). American Industrial Hygiene Association. p. 139-153. 2008.
- FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*. v. 102, p. 99-112, 1985.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES M. A. Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. v. 682, p. 71-81. 2009.
- PINHEIRO, M. M. G.; BOYLAN, F.; FERNANDES, P. D. Antinociceptive effect of the *Orbignya speciosa* Mart. (Babassu) leaves: Evidence for the involvement of apigenin. *Life Sciences*. 2012.
- ROCHA, H. R.; GARCIA, A. G.; PANAYIOTIDIS, M. I.; FRANCO, R. DNA damage and autophagy. *Cancer Metastasis Review*. v. 30, p. 185-197. 2011.
- SANTOS, F. V.; POZZETTI, G. L.; VARANDA, E. A. Avaliação da mutagenicidade do extrato alcoólico de *Orbignya phalerata* Mart. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. v. 8, p. 165-168. 2006.
- SILVA, A. P. dos S. Caracterização físico-química e toxicológica do pó de mesocarpo do babaçu (*Orbignya phalerata* Mart): subsídio para o desenvolvimento de produtos. Teresina: Universidade Federal do Piauí, 2011.
- SOUZA, M. H. S. L.; MONTEIRO, C. A.; FIGUEREDO, P. M. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; GUERRA, R. N. M. Ethnopharmacological use of babassu (*Orbignya phalerata* Mart) in communities of babassu nut breakers in Maranhão, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 133, p. 1-5. 2011.

AGRADECIMENTOS

Agrademos a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI) pelo apoio financeiro.

CS05 - Efeito antioxidante de LCNa: dosagem de nitrito

Giselle Zayra da Silva de Oliveira¹ (PG), Johanssy da Silva Oliveira^{2*} (IC), Viviane Pinheiro Alves de Almeida³ (IC), Lina Clara Gayoso e Almendra Ibiapina Moreno⁴, Natanael Viana Lourenço², Thallita Castelo Branco Andrade¹, Rivelilson Mendes de Freitas⁵ (PQ), Hercília Maria Lins Rolim Santos⁵ (PQ).

1. Universidade Federal do Piauí – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
2. Universidade Federal do Piauí – Curso de Graduação em Farmácia
3. Universidade Federal do Piauí – Curso de Graduação em Farmácia, PIBIC
4. Universidade Federal de Pernambuco – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
5. Universidade Federal do Piauí – Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

* Autor principal

johanssy@outlook.com

Palavras-chave: Lipossoma. Nimodipina. Hipocampo. Nitrito. Antioxidante.

RESUMO

Lipossomas são vesículas esféricas constituídas de uma ou várias bicamadas concêntricas de lipídios que podem carrear fármacos no seu interior ou entre os lipídios da membrana. Uma grande vantagem do uso destes, em relação a outros sistemas de vetorização, é a sua elevada biocompatibilidade, versatilidade, com tamanho, lamelaridade, superfície, composição lipídica, volume e composição do meio aquoso interno que podem ser manipulados em função dos requisitos farmacêuticos e farmacológicos. Este estudo avaliou a produção de NO₂- no hipocampo de camundongos tratados com soluções de Nimodipina e lipossoma contendo Nimodipina para comparar a eficiência antioxidante destas formulações. Foram formados seis grupos de sete camundongos, estes receberam soluções de Nimodipina (0,1; 1 e 10 mg/Kg, v.o), lipossoma contendo

Nimodipina-LCNa (1 e 10 mg/Kg, i.p.) e Vitamina C (Controle). Após 30 minutos dos tratamentos, os animais realizaram testes ansiolíticos e locomotores. Os resultados mostraram que a realização de testes motores após a administração das soluções de Nimodipina provoca aumento das concentrações de nitrito superiores aos produzidos após os testes ansiolíticos, evidenciando dano oxidativo no hipocampo. Já o tratamento com LCNa (1 e 10 mg/Kg, i.p.) atenuou significativamente a produção de nitrito em comparação com as soluções de Nimodipina e com o controle. A utilização de LCNa (1 e 10 mg/ Kg) ofereceu um efeito antioxidante e neuroprotetor por evitar o estresse oxidativo pela diminuição de nitrito no hipocampo de camundongos, o que pode ser benéfico para o auxílio de disfunções neurológicas.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de sistemas que melhoraram a distribuição de fármacos no organismo constitui-se uma tendência na Tecnologia Farmacêutica. Um desses sistemas é a vetorização de fármacos que tem por finalidade aperfeiçoar a farmacocinética de um determinado medicamento independentemente de propriedades físico-químicas. No âmbito dessa vetorização, os lipossomas assumem uma posição de destaque devido as suas características únicas que os tornam veículos seguros e eficazes. Neste contexto, os lipossomas podem ser definidos como microsistemas constituídos por uma ou mais bicamadas lipídicas dispostas esféricamente, separadas por fases aquosas, cujo cerne é um compartimento aquoso. Tais estruturas esféricas são fechadas, cujo diâmetro varia tipicamente entre os 50 nm e 5 µm. Este conceito surgiu pela primeira vez na década de 60 por Alec Bangham. Foi após a sua descoberta que surgiu a ideia de que este vetor poderia ser utilizado como um sistema transportador de fármaco tanto hidrossolúvel quanto lipossolúvel, podendo também ter em sua composição compostos naturais, relativamente não tóxicos, biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos (CONCEIÇÃO et al, 2010);(BATISTA, 2007).

A manutenção do equilíbrio entre a produção de Radicais Livres (RLs) e as defesas antioxidantes (enzimas e moléculas não enzimáticas) é uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo. Quando este equilíbrio tende para a produção de RLs dizemos que o organismo está em stress oxidativo. Este surge após a exposição prolongada do organismo a agentes oxidantes, como os RLs, provenientes de diversas fontes ou pela diminuição da capacidade antioxidante desse sistema. Conceitualmente, RLs são átomos ou moléculas que possuem um elétron não pareado ou ímpar na orbital externa, dando-lhe uma configuração espacial que gera uma alta instabilidade. Eles derivam de três elementos: oxigênio, nitrogênio e enxofre, criando, assim, espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS) e espécies reativas de enxofre (RSS). ROS incluem os RLs como o ânion superóxido (O_2^-), radical hidroperóxido (HO_2), radical hidroxila (HO), Óxido nítrico (NO) e outras espécies, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio simples (O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e peroxinitrito (ONOO⁻). RNS derivam da reação do NO com o (O_2) formando (ONOO⁻). RSS são formados facilmente pela reação dos ROS com os tióis (FERREIRA, 2013). É importante lembrar que as reações derivadas desses RLs alteram as funções das diferentes biomoléculas causando efeitos letais à célula (BRAVO et al, 2007);(MESA-VANEGAS et al, 2010).

A exposição à RLs levou o organismo a desenvolver uma série de mecanismos de defesa para eliminar estes radicais. As defesas antioxidantes podem ser tanto enzimáticas ou não e existem no organismo, tanto no meio intracelular como no meio extracelular. Exemplo destas defesas são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutatona peroxidase (GPH-Px), a glutatona redutase (GPH-R), entre outras. Entre as defesas antioxidantes não enzimáticas destacam-se compostos como a glutatona (GSH) o α -tocoferol (vit. E), o ácido ascórbico (vit. C), o ácido lipóico, os carotenóides, os flavonóides, entre outros. A SOD converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio que é em seguida transformado em água pela CAT nos lipossomas, ou pela GSH-Px nas mitocôndrias. Outra enzima importante é a GSH-R que regenera a GSH que é utilizada pela CAT como doadora do hidrogênio necessário para a redução do peróxido de hidrogênio em água (FERREIRA, 2007).

MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo, foram utilizados camundongos da espécie *mus musculus*, linhagem Swiss com peso entre 25-30 g e com idade de dois meses provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Os animais utilizados neste experimento permaneceram nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental por sete dias, para adequada aclimatação. Estes animais foram escolhidos aleatoriamente e alojados em gaiolas de propileno e mantidos em temperatura de 25 ± 1 °C até 12h de ciclo claro/escuro com acesso à alimentação (Labina®) e água ad libitum. Os protocolos experimentais e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEA/ UFPI n.º 014/11).

Nos animais dos grupos experimentais foram administradas soluções de Nimodipina (0,1; 1 e 10 mg/Kg, v.o), lipossomas contendo Nimodipina (1 e 10 mg/Kg, i.p.) e Vitamina C (controle). Após 30 minutos das administrações, foram realizados testes ansiolíticos (Labirinto em cruz elevada e Claro/Escuro) e motores (Campo aberto e Rota Rod).

O teste do Labirinto em Cruz Elevado consiste em dois braços abertos opostos (30 x 5 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm), também opostos, em forma de cruz. Os braços abertos e fechados estão conectados entre si por uma plataforma central (5 x 5 cm), elevada a 45 cm do chão. As medidas comportamentais mensuradas são: número de entradas nos braços abertos e braços fechados (NEBA e NEBF) e tempo de permanência do animal em cada um desses braços (TPBA e TPBF). O aparato usado para realizar o teste Claro/ Escuro é feito de acrílico dividido em dois compartimentos (campo claro e campo escuro) que se comunicam por meio de uma pequena porta. Ambos os lados têm as mesmas dimensões (27 x 18 x 29 cm). Nesse teste é avaliado o número de entrada e o tempo de permanência do animal no campo claro, durante 5 minutos (MORENO, 2011).

O campo aberto é um equipamento feito de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) e dividido em nove quadrantes iguais, tem como finalidade analisar a atividade exploratória do animal. Os parâmetros avaliados são o número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea; ALE), número de comportamento de autolimpeza (grooming) e o número de levantamentos (rearing), sem encostar-se à parede, durante o tempo de 5 minutos (COSTA, 2012).

No Rota Rod os animais foram colocados, um por vez, com as quatro patas em uma barra de diâmetro de 2,5 cm, 25 cm acima do piso e que estava girando a 12 rpm. Para avaliar, o número de quedas (até três quedas) e o tempo de permanência na barra durante três minutos (CAMPÊLO, 2011).

Encerrados os testes comportamentais, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, para realização da dissecação do cérebro e posterior retirada do hipocampo. Em seguida, a áreas foram homogeneizadas em tampão fosfato (pH, 8,0; 0,1 M) a 10% e armazenadas em eppendorfs de 2 mL. Fez-se a dosagem do teor de Nitrito tendo-se por base a reação de Griess (CAMPÊLO, 2011). Na preparação das amostras usou-se 500 µL reagente de Griess e 500 µL homogenatos, a leitura das absorbâncias foi feita por métodos espectrofotométricos.

Na análise estatística, foi utilizado o software GraphPad Prism® versão 5.04 (GraphPad™ Software Incorporated, San Diego, EUA). Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P. M) dos dados. As diferenças entre os grupos foram determinadas através do One-Way ANOVA (Análise de Variância), seguida, quando detectada diferença, pelo teste de Tukey. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre $p \geq 5\%$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados, não foi possível observar diferença significativa na produção de nitrito no hipocampo entres as doses das soluções de Nimodipina (0,1; 1 e 10 mg/Kg, i.p.), nos testes ansiolíticos (Claro / Escuro e Labirinto em cruz elevada) e motores (Rota Rod e Campo Aberto).

Porém, a realização de testes motores após a administração das soluções de Nimodipina resultou em concentrações de nitrito significativamente superiores ao produzido após a execução de testes ansiolíticos, evidenciando a geração de dano oxidativo no hipocampo (Gráfico 1), fenômeno que pode ser explicado pelo esforço produzido pelos animais no momento do teste, uma vez que a realização de esforço físico acentuado causa estresse oxidativo nas regiões musculares, nesse caso a dosagem de nitritos é utilizada para avaliar os efeitos de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nas regiões cerebrais (AKSU, 2009).

No entanto, o tratamento com lipossomas de Nimodipina (1 e 10 mg/Kg, i.p.) atenuou significativamente o estresse oxidativo no hipocampo por evidente decréscimo de nitrito em relação ao controle e as soluções de Nimodipina (Gráfico 1), indicando um promissor efeito antioxidante e neuroprotetor, uma vez que tratamentos antioxidantes reduzem significativamente a produção de nitrito e de peroxidação lipídica, assim como eleva a concentração de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no hipocampo de ratos adultos. Essa proteção cerebral impede o estresse oxidativo, evitando lesões que podem apresentar influência sobre as disfunções cerebrais, como é o caso do ácido ascórbico presente na vitamina C (SANTOS et al, 2009).

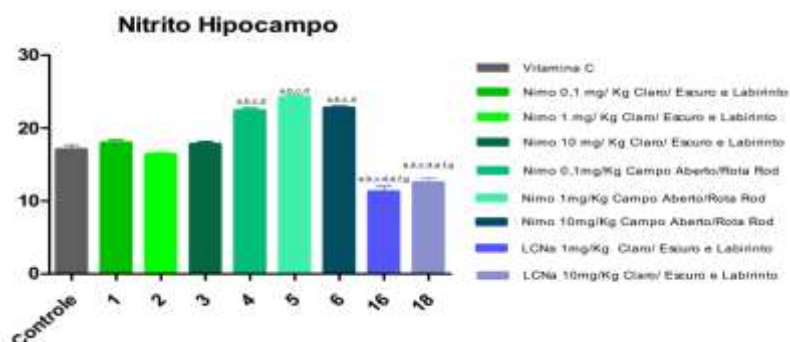


Gráfico 1. Avaliação da produção de nitrito em hipocampus de camundongos tratados com soluções de Nimodipina (0,01; 1 e 10 mg/Kg, v.o.) e Lipossoma contendo Nimodipina - LCNa (0,01; 1 e 10 mg/Kg, i.p.) após realização de testes ansiolíticos e motores.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo sugerem que o encapsulamento de Nimodipina em lipossomas promovem efeito antioxidante e neuroprotetor, uma vez que protege o hipocampo de camundongos de danos oxidativos causados pela produção de nitrito, sem diferença de efeito antioxidante entre as doses, o que pode ser benéfico para o auxílio de disfunções neurológicas, melhorando assim, os processos fisiológicos.

REFERÊNCIAS

- AKSU, I.; TOPCU, A.; CAMSARI, U. M.; ACIKGOZ, O. Effect of acute and chronic exercise on oxidant-antioxidant equilibrium in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. *Neuroscience letters*. v. 452, n.3, p. 281-285, 2009
- BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v. 43, n. 2, p. 168-179, 2007.
- BRAVO, A.; ARAUJO, S.; VARGAS, M. E.; MESA, J.; SOUKI, A.; BERMÚDEZ, V.; CANO, C. Actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa y niveles de cobre y zinc en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. v. 26, n.1, p. 37-41, 2007 .
- CAMPÊLO, L. M. L. C. Avaliação farmacológica do óleo essencial de Citrus limon (Burn) no Sistema Nervoso Central: Um estudo comportamental, histológico e neuroquímico. Teresina, 2011. 151 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí.
- CONCEIÇÃO, A. I. F. S.; MATOS, C. M.; MOUTINHO, C. G.; BALCÃO, V. M. Lipossomas: vectores atractivos e versáteis para o direccionamento de (bio) fármacos. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*. n. 7, p. 168-178, 2010.
- COSTA, J. P. Estudo dos efeitos neurofarmacológicos e toxicológicos do fitol visando o planejamento de novos psicofármacos. Teresina, 2012. 149 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí.
- FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. M.V. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise*. Ano IV, n. 2, p.32-39. 2007
- FERREIRA, I. C. F. R.; CAROCHO, M.; A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*. v. 51, p.15-25, 2013.
- MESA-VANEGAS, A. M.; GAVIRIA, C. A.; CARDONA, F.; SÁEZ-VEJA, J. A.; TRUJILLO, S. B.; ROJANO, B. A. Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género Calophyllum. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. v. 15, n. 2, p. 13-26, 2010.
- MORENO, L. C. G. A. I. Delineamento e caracterização de lipossomas contendo Nimodipina para uso direcionado a doenças neurodegenerativas. Teresina, 2011. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí.
- SANTOS, I.M.S; TOMÉ, A.R.; SALDANHA, G.B.; FERREIRA, P.M.P.; MILITÃO, G.C.G.; FREITAS, R.M. Oxidative stress in the hippocampus during experimental seizures can be ameliorated with the antioxidant ascorbic acid. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. v.2, n. 4, p. 214-221, 2009.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, LAPNEX, FAPEPI e UFPI

CS06 - Atividade antidepressiva do fitol no nado forçado

Pauline Sousa dos Santos^{1*} (IC), Thiago Ferreira Lima² (IC), Rivelson Mendes de Freitas³ (PQ), Jessica Pereira Costa⁴ (PQ), Damião Pergentino de Sousa⁵ (PQ).

1. Universidade Federal do Piauí – PIBIC/CNPq

2. Universidade Federal do Piauí – ICV

3. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí

4. Doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO

5. Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Sergipe - UFS, São Cristóvão, Brasil

* Autor principal

Palavras-chave: Camundongo. Depressão. Terpenóide.

RESUMO

Tendo em vista a prevalência atual de depressão, um distúrbio mental com alto grau de sofrimento psíquico, terapias alternativas têm sido exploradas na busca de novos compostos antidepressivos. Dentre estas, diversos compostos terpenícos têm demonstrado atividade antidepressiva, possibilitando a descoberta de novos alvos terapêuticos. Nesta perspectiva, o objetivo deste estudo foi avaliar os possíveis efeitos psicofarmacológicos do terpenóide fitol, utilizando-se o modelo experimental nado forçado. Para o estudo foram utilizados camundongos adultos da variedade Swiss, albinos, machos, pesando entre 25 a 30 g, com aproximadamente 2 meses de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal sob o nº 013/2011. Os camundongos foram divididos em sete grupos e tratados intraperitonealmente com imipramina, paroxetina, reserpina (25; 25 e 0,25 mg kg⁻¹, respectivamente) e fitol nas doses de 25, 50 e 75 mg kg⁻¹. Após 15 minutos, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado, onde o tempo de imobilidade foi registrado durante cinco minutos. Quando administrado por via intraperitoneal, o fitol diminuiu de forma significativa o tempo de imobilidade quando comparados ao grupo controle, em todas as doses testadas. É importante ressaltar que, mesmo a média do tempo de imobilidade do grupo da menor dose foi menor do que a média do tempo de imobilidade dos animais tratados com os antidepressivos imipramina e paroxetina. Desta forma, os resultados obtidos demonstram um possível efeito antidepressivo deste composto, podendo ser futuramente explorado para o tratamento deste transtorno psíquico em humanos.

INTRODUÇÃO

A depressão é um distúrbio mental com alto grau de sofrimento psíquico. Sabe-se que a doença envolve inúmeros aspectos clínicos, etiopatogênicos e de terapia e que, se não tratada precocemente e de forma adequada, pode levar à incapacitação do paciente ou até mesmo à morte por suicídio. Além disso, é caracterizada por lentificação dos processos psíquicos, humor depressivo e/ou irritável, redução da energia (desânimo, cansaço fácil), incapacidade parcial ou total de sentir alegria e/ou prazer, desinteresse, apatia ou agitação psicomotora, dificuldade de concentração, pensamentos de cunho negativo, com perda da capacidade de planejar o futuro e alteração do juízo da realidade. As causas da doença ainda não foram bem elucidadas, mas acredita-se que elas possam envolver uma predisposição genética e influências do meio, como morte de um parente ou perda do emprego (DEL PORTO, 2000; STELLA, 2002).

A descoberta dos antidepressivos no final da década de 50 e a utilização dos mesmos na prática clínica contribuíram para um avanço relevante no tratamento e na compreensão de possíveis mecanismos subjacentes aos transtornos depressivos. Atualmente, há pelo menos 35 antidepressivos diferentes disponíveis no mercado no mundo todo; entretanto a disponibilidade dos mesmos varia consideravelmente nos mercados dos países (BAUER et al., 2009). Entretanto, mesmo sob tratamento médico, 30% dos pacientes com diagnóstico depressivo não respondem à terapia farmacológica, devido ao tempo de latência associado ao surgimento do efeito terapêutico e, ainda, aos seus efeitos adversos, os quais contribuem para o abandono da terapia (ROMEIRO; FRAGA; BARREIRO, 2003).

Neste contexto, terapias alternativas devem ser exploradas na busca de novos compostos antidepressivos. Entre estas, os produtos naturais constituem uma importante fonte de pesquisa visando à descoberta de novas substâncias com atividade antidepressiva. Dentre os metabólitos secundários vegetais, os terpenóides, substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno, constituem o grupo majoritário. Diversos compostos terpenícos têm mostrado atividades antidepressivas significativas, possibilitando a descoberta de novos alvos terapêuticos para o tratamento da depressão patológica (HELLIÓN-IBARROLA et al., 2008; NESTEROVA et al., 2011).

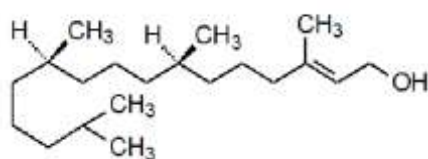


Ilustração 1: Estrutura química do Fitol.

Dentre estes terpenóides, o fitol (ilustração 1), 3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol, um diterpeno pertencente ao grupo dos alcoóis acíclicos insaturados de cadeia longa (C₂₀H₄₀O) e ramificada, componente da molécula da clorofila, foi explorado neste estudo buscando-se esclarecer seus possíveis efeitos psicofarmacológicos, utilizando-se o modelo experimental nado forçado em camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados Camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) (25-30 g), com aproximadamente 2 meses de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias - CCA da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Os animais foram mantidos sob condições monitoradas de temperatura equivalente a 26 ± 1 °C, com livre acesso a ração tipo pellets (Purina®) e água, mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os experimentos propostos foram aprovados pelo do Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI (Número 013/2011). O terpeno hidroxilado fitol foi preparado a partir da acetilação do álcool correspondente. A confirmação das estruturas dos produtos foi feita comparando os dados de RMN de ¹H e ¹³C, após previamente analisados e purificados por métodos cromatográficos em camada delgada e coluna. As substâncias foram disponibilizadas pelo Prof. Damião Pergentino de Sousa, do Laboratório de Química de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (LAPROBIO) da UFS. Para os testes os animais foram divididos em 07 grupos experimentais com 20 animais cada. O primeiro grupo correspondente ao veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%, i.p., grupo controle negativo; n=20). O segundo, terceiro e quarto grupo tratados com imipramina (50 mg kg⁻¹, i.p., controle positivo; n=20), paroxetina (20 mg kg⁻¹, i.p., controle positivo; n=20) e reserpina (0,25 mg kg⁻¹, i.p., controle positivo; n=20), respectivamente e os outros três grupos tratados somente com fitol (25, 50 e 75 mg kg⁻¹, i.p.; grupos FIT 25, FIT 50 e FIT 75, respectivamente, n=20). Para o experimento realizado foram utilizados tanques de 22 cm de diâmetro e 40 cm de altura contendo água fresca a 26 ± 1 °C até a metade do tanque. Após 15 minutos dos tratamentos, os animais foram colocados, um por vez, no tanque onde o tempo de imobilidade, em segundos, foi registrado durante cinco minutos. O animal foi considerado imóvel quando permaneceu flutuando na água, fazendo apenas movimentos suaves necessários para manter a cabeça acima da água.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estima-se que 10% das pessoas possam apresentar depressão durante a sua vida. As causas deste transtorno ainda não foram bem elucidadas, entretanto acredita-se que possa envolver a predisposição genética e fatores influenciados pelo meio (KATZUNG, 2010). As próprias investigações dos efeitos dos psicotrópicos no Sistema Nervoso Central estimularam estudos para investigar as causas das doenças mentais e proporcionaram uma maior compreensão das bases moleculares das funções extremamente complexas e variadas do cérebro. Entretanto, o desenvolvimento racional e a avaliação de qualquer fármaco estão aquém do ideal, particularmente com relação aos psicoativos (BRUNTON, 2010).

Dessa forma, estudos realizados em animais são de fundamental importância para a melhor compreensão da fisiopatologia destas afecções e para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. Apesar de não existir um modelo animal uma condição que corresponda

exatamente ao estado de depressão em humanos, sabe-se que existem procedimentos que induzem estados comportamentais semelhantes à patologia em questão (SILVA, 2009).

Neste contexto, o teste do nado forçado é uma situação estressante e não escapável frequentemente aplicada em laboratórios para se promover a identificação de compostos que apresentem atividade antidepressiva. Quando os camundongos são forçados a nadar eles tendem a se tornar imóveis após uma atividade inicial vigorosa. A atividade vigorosa é considerada um comportamento de fuga do animal e a imobilidade é descrita como um sinal de desespero. Substâncias que reduzem o tempo de imobilidade dos camundongos geralmente apresentam propriedades antidepressivas em seres humanos, por isso os testes têm sido considerados úteis como modelos de depressão em roedores (KAROLEWICZ et al, 2001).

Dessa forma, como podem ser observados nos resultados obtidos, (ilustração 2), os antidepressivos utilizados como controles positivos, (imipramina e paroxetina), reduziram de forma significativa, ($115 \pm 0,58$; $133 \pm 3,28$, respectivamente, $p < 0,001$), o tempo de imobilidade dos camundongos em relação ao grupo controle ($206,40 \pm 6,04$). Já a reserpina, que induz a depressão por provocar a depleção das reservas de neurotransmissores amínicos (KATZUNG, 2010), aumentou, ($263,70 \pm 2,15$ $p < 0,001$), de forma significativa o tempo de imobilidade em relação ao grupo veículo como também era previsto para esta droga no modelo de depressão em roedores utilizado.

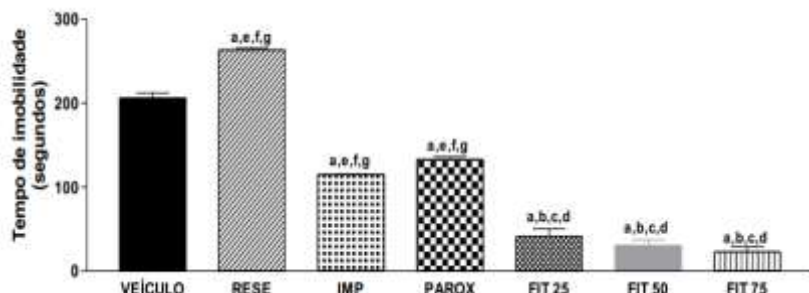


Ilustração 2: Efeito da administração de fitol no tempo de imobilidade de camundongos no teste do nado forçado. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. As diferenças nos grupos experimentais foram determinadas por análise de variância ANOVA e teste t-Student–Newman–Keuls como post hoc teste. ap<0,001 comparado ao grupo veículo; bp<0,001 comparado ao grupo IMP; cp<0,001 comparado ao grupo RESE; dp<0,001 comparado ao grupo PAROX; ep<0,001 comparado ao grupo FIT 25; fp<0,001 comparado ao grupo FIT 50; gp<0,001 comparado ao grupo FIT 75. FIT = fitol; IMP = imipramina; RESE = reserpina; PAROX = paroxetina.

Vale ressaltar que o terpenóide em estudo em todas as doses testadas (25, 50 e 75 mg/kg), quando administrado na forma intraperitoneal reduziu o tempo de imobilidade ($41,25 \pm 9,21$; $30,42 \pm 6,73$; $22,92 \pm 6,14$, respectivamente), significativamente, tanto em relação ao grupo veículo e reserpina ($206,40 \pm 6,04$; $263,70 \pm 2,15$, respectivamente), quanto em relação aos grupos de antidepressivos utilizados como controle positivo (imipramina - $115 \pm 0,58$ e paroxetina - $133 \pm 3,28$) ($p < 0,001$), demonstrando assim, um perfil antidepressivo melhor do que o observado para os grupos de antidepressivos já consolidados. Dessa forma, os resultados obtidos neste teste comportamental demonstram um possível efeito antidepressivo para o fitol, podendo ser explorado, após testes adicionais, como terapia alternativa para o tratamento deste transtorno psíquico.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com o terpenóide fitol evidenciam um possível efeito antidepressivo deste composto, podendo ser futuramente explorado para o tratamento da depressão em humanos. No entanto, estudos adicionais, são necessários para esclarecer totalmente o mecanismo de sua ação antidepressiva.

REFERÊNCIAS

- BAUER, M.; WHYBROW, P.C.; ANGST, J.; VERSIANI, M.; MOLLER, H.J. Diretrizes da World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) para o tratamento biológico de transtornos depressivos unipolares, 1ª parte: tratamento agudo e de continuação do transtorno depressivo maior. Revista de Psiquiatria Clínica, v. 36, p. 17-57, 2009.
- BRUNTON, L. L. Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11 ed. São Paulo: McGraw-Hill Interamericana, 2006, p.383.
- DEL PORTO, J.A. Conceito de depressão e seus limites. In: LAFER, B.; ALMEIDA, O.P.; FRAGUAS, J.R.R.; MIGUEL, E.C. Depressão no ciclo da vida. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000, p. 20-28.
- HELLIÓN-IBARROLA, M.C.; IBARROLA, D.A.; MONTALBETTI, Y.; KENNEDY, M.L.; HEINICHEN, O.; CAMPUZANO, M.; FERRO, E.A.; ALVARENGA, N.; TORTORIELLO, J.; DE LIMA, T.C.M.; MORA, S. The antidepressant-like effects of Aloysia polystachya (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice. Phytomedicine, v. 15, p. 478-483, 2008.
- KAROLEWICZ, B.; PAUL, I.A. Group housing of mice increases immobility and antidepressant sensitivity in the forced swim and tail suspension tests. European Journal of Pharmacology, v. 415, p. 197-201, 2001.
- KATZUNG, B. G. Farmacologia Básica & Clínica. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010, p. 425.
- NESTEROVA, Y.U.; POVETIEVA, T.N.; SUSLOV, N.I.; SEMENOV, A.A.; PUSHKARSKIY, S.V. Antidepressant Activity of Diterpene Alkaloids of Aconitum baicalense Turcz. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, v. 151, p. 406-409, 2011.
- ROMEIRO, L.A.S.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. Novas estratégias terapêuticas para o tratamento da depressão: uma visão da química. Química Nova, v. 26, n. 3, p. 347-358, 2003.
- SILVA, M.I.G. Investigação dos efeitos centrais e gastroprotetores do isopulegol em camundongos. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2009.
- STELLA, F. Depressão no Idoso: Diagnóstico, Tratamento e Benefícios da Atividade Física. Revista Motriz, v. 18, p. 91-98, 2002.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de pesquisa em Neuroquímica experimental - LAPNEX, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, Laboratório de Química de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (LAPROBIO) da UFS e aos professores Dr. Rivelilson Mendes de Freitas, Dr. Damião Pergentino de Sousa e Ms Jéssica Pereira Costa.

CS07 - Estudo da toxicidade, em camundongos, tratados com extrato aquoso do pó do mesocarpo de *Orbignya phalerata* Mart

Priscila de Sousa Vieira^{1*} (IC), Ana Paula dos Santos Correia Lima da Silva² (PG), José Carlos C. Lima da Silva Filho³ (IC), Lívio César Cunha Nunes¹ (PQ), Rivelilson Mendes de Freitas¹ (PQ).

1. Universidade Federal do Piauí – Curso de Graduação em Farmácia
2. Universidade Federal do Piauí – Doutorado RENORBIO
3. Faculdade das Atividades Empresariais de Teresina-PI – Curso de Sistema de Informação

* Autor principal

priscilla_sjp@hotmail.com

Palavras-chave: Babaçu. Mesocarpo. Toxicidade.

RESUMO

O extrato aquoso do pó (EPA) obtido do mesocarpo do babaçu (*Orbignya phalerata*) foi estudado a fim de investigar sua possível toxicidade. Verificou-se os efeitos da administração na forma aguda em doses repetidas (30 dias), subcrônica (90 dias) e crônica (120 dias), por meio dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, em camundongos Swiss adultos (2 meses de idade), com peso médio de 25 ± 5 g. Os protocolos experimentais e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEA/UFPI nº 044/09). Os animais (n=10/grupo) foram tratados por via oral (v.o) com o EAP do babaçu nas doses de 1, 2 e 3 g kg⁻¹ de peso corporal no decorrer de 30, 90 e 120 dias consecutivos. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre $< 5\%$. No perfil bioquímico, o tratamento com o EAP causou uma redução significativa da concentração de ureia no soro para o grupo de tratamento crônico. A fosfatase alcalina apresentou uma concentração inferior em quase todos os grupos tratados. A contagem diferencial de leucócitos totais, hemácias, eosinófilos e monócitos revelaram pequenas flutuações, embora, dentro dos limites de referência e sem indicativo de importância clínica. A administração aguda em doses repetidas, subcrônica e crônica do EAP não induziram nenhum efeito de risco em grande parte dos parâmetros bioquímicos e hematológicos. No entanto, novos estudos avaliando-se outros aspectos, são necessários, para justificar ainda mais o uso seguro do mesocarpo do babaçu.

INTRODUÇÃO

Os estudos toxicológicos têm a finalidade de avaliar a ideia errônea de que produtos fitoterápicos, por serem naturais, são isentos de efeitos tóxicos ou adversos, e que o uso popular de plantas medicinais serve como validação da eficácia destes medicamentos (LAPA, 2001; MARLIÉRE et al., 2008; SILVEIRA et al., 2008). A palmeira *Orbignya phalerata* Mart da família *Arecaceae* é popularmente conhecida como babaçu no Nordeste do Brasil, principalmente no Piauí e Maranhão. Esta palmeira é a espécie mais abundante do gênero (TEIXEIRA, 2008). A farinha do mesocarpo de babaçu é utilizada pela população como alimento e como medicamento. Dados etnobotânicos indicam que essa farinha pode ser utilizada no tratamento de feridas crônicas, úlceras gástricas e duodenais e inflamações diversas, tumores, obesidade entre outras doenças (CARVALHO FILHO, 2003). O pó do babaçu é encontrado com frequência em supermercados e outros estabelecimentos comerciais, sendo empregado como suplemento alimentar, porém sem a existência de trabalhos científicos que assegurem sua inocuidade ou riscos para o consumo humano.

Diante dessa contextualização o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da administração aguda em doses repetidas (30 dias), subcrônica (90 dias) e crônica (120 dias) do extrato aquoso do pó (EAP) obtido do mesocarpo de *Orbignya phalerata* Mart, através dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, em camundongos Swiss adultos. Fornecendo, assim, dados a respeito da toxicidade do EAP, já que a população da região de ocorrência dos babaçuais, principalmente Maranhão e Piauí, o utiliza amplamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudos toxicológicos do EAP do pó de mesocarpo de *Orbignya phalerata* Mart foram realizados em camundongos albinos Swiss, machos e fêmeas, com peso corporal variando entre 25 ± 5 g originários do Biotério do Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental (LAPNEX) da UFPI. Os protocolos experimentais e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEA/UFPI nº 044/09). Os animais (n=10/grupo), para cada grupo investigado, foram tratados por via oral (v.o) com o EAP do babaçu nas doses de 1, 2 e 3 g kg⁻¹ de peso corporal no decorrer de 30, 90 e 120 dias, consecutivos e com solução salina 0,9% (grupo controle). Em seguida, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico para a coleta do sangue, avaliando-se parâmetros hematológicos e bioquímicos. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre $< 5\%$. Durante o estudo toxicológico também foi determinada a Dose letal 50% (DL50). No estudo estatístico os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A dose tóxica é aquela capaz de produzir perturbação funcional acentuada no organismo tanto no homem quanto no animal experimental (SILVA, 2006). Nos estudos pré-clínicos dos fármacos, a dose letal mediana determinada em experimentos com animais é abreviada como LD50. (BRUNTON et al., 2007). Os resultados revelaram valores de DL50 para o EAP de *Orbignya phalerata* de 3.722,42 mg kg⁻¹.

Observou-se que o tratamento oral dos animais com o *Orbignya phalerata* Mart nas doses de 1, 2 e 3 g kg⁻¹ não alterou de forma significativa, os parâmetros hematológicos e bioquímicos.

No estudo hematológico dos animais tratados com o EAP, não foram detectadas alterações nos seguintes parâmetros analisados VCM, HCM, RDW e no número de plaquetas. A contagem diferencial de linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos revelou, embora, dentro dos limites de referência (BRITO, 1994), apresentaram pequenas flutuações, porém sem indicativo de importância clínica (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros hematológicos, após administração por via oral com o EAP de *Orbignya phalerata* em camundongos Swiss.

Parâmetros hematológicos	Grupo controle (n=10)	Tratamento Agudo em doses repetidas			Tratamento subcrônico			Tratamento crônico		
		EAP1 g/kg (n=10)	EAP2 g/kg (n=10)	EAP3 g/kg (n=10)	EAP1 g/kg (n=10)	EAP2 g/kg (n=10)	EAP3 g/kg (n=10)	EAP1 g/kg (n=10)	EAP2 g/kg (n=10)	EAP3 g/kg (n=10)
Hemácias (mm ³)	8,43 ± 0,48	8,60 ± 0,40	9,68 ± 0,30	8,77 ± 0,55	8,60 ± 0,40	8,20 ± 0,34	8,98 ± 0,54	8,60 ± 0,40	8,78 ± 0,34	7,97 ± 0,23
Hemoglobina (g/dL)	15,43 ± 0,69	15,21 ± 0,43	15,08 ± 0,42	14,97 ± 0,49	14,20 ± 0,43	13,80 ± 0,42	14,18 ± 0,49	14,20 ± 0,43	13,08 ± 0,42	13,71 ± 0,48
Hematócrito (%)	44,15 ± 0,30	45,90 ± 1,43	44,40 ± 1,02	45,30 ± 1,02	44,90 ± 1,41	44,12 ± 1,02	44,30 ± 1,12	43,90 ± 1,12	43,40 ± 1,02	44,80 ± 1,20
VCM (fL)	49,67 ± 0,04	49,10 ± 1,58	50,32 ± 1,46	49,19 ± 1,46	50,10 ± 1,58	49,80 ± 1,46	49,58 ± 1,46	49,10 ± 1,58	49,08 ± 1,46	48,82 ± 1,45
HCM (pg)	16,64 ± 0,03	16,10 ± 0,64	16,70 ± 0,55	16,79 ± 0,37	16,30 ± 0,64	16,80 ± 0,55	16,76 ± 0,44	16,30 ± 0,64	16,08 ± 0,55	16,31 ± 0,44
CHCM (g/dL)	36,50 ± 1,94	37,11 ± 1,27	36,32 ± 1,22	37,00 ± 0,92	37,00 ± 1,28	36,42 ± 1,23	36,71 ± 0,92	37,11 ± 1,27	40,22 ± 1,23	36,71 ± 0,92
RDW (%)	13,71 ± 1,44	13,60 ± 2,65	13,40 ± 2,25	13,8 ± 2,76	13,60 ± 2,25	13,40 ± 2,25	13,8 ± 2,76	13,60 ± 2,25	13,40 ± 2,25	13,8 ± 2,76
Plaquetas (mm ³)	292,4 ± 0,83	298,8 ± 25,70	290,9 ± 17,27	291,4 ± 17,74	294,8 ± 25,77	296,7 ± 21,69	291,2 ± 26,98	293,8 ± 25,91	290,1 ± 19,55	290,7 ± 28,99
Leucócitos totais (mm ³)	8,62 ± 0,03	8,20 ± 0,38	8,00 ± 0,33	8,06 ± 0,23	8,30 ± 0,38	8,10 ± 0,33	7,88 ± 0,36	8,20 ± 0,38	8,38 ± 0,33	7,87 ± 0,23
Neutrófilos (%)	18,66 ± 0,03	18,20 ± 1,74	18,64 ± 2,80	18,81 ± 2,80	18,20 ± 1,74	18,40 ± 2,80	17,18 ± 2,80	18,20 ± 1,74	18,68 ± 2,80	18,81 ± 2,80
Eosinófilos (%)	0,40 ± 0,07	0,43 ± 0,10	0,45 ± 0,11	0,41 ± 0,09	0,40 ± 0,10	0,41 ± 0,11	0,37 ± 0,09	0,40 ± 0,10	0,41 ± 0,00	0,35 ± 0,00
Linfócitos (%)	78,12 ± 0,31	76,71 ± 4,99	78 ± 3,75	78,70 ± 2,89	78,70 ± 4,99	77,80 ± 5,47	76,60 ± 5,47	77,70 ± 4,99	77,10 ± 5,47	78,20 ± 5,47
Monócitos (%)	2,34 ± 0,02	2,20 ± 0,53	2,24 ± 0,37	2,20 ± 0,49	2,80 ± 0,62	2,90 ± 0,49	2,70 ± 0,49	2,50 ± 0,65	2,50 ± 0,50	2,20 ± 0,62

Parâmetros hematológicos obtidos de camundongos machos Swiss, tratados durante 30, 90 e 120 dias por via oral com solução salina 0,9% (Controle, n=10) e com extrato aquoso do pó de *Orbignya phalerata* nas doses de 1g/kg (EPA 1, n=10), 2 g/kg (EPA 2, n=10), e 3 g/kg (EPA 3). Tabela 2. Parâmetros bioquímicos, após administração por via oral com o EAP de *Orbignya phalerata* em camundongos Swiss.

Parâmetros Bioquímicos	Grupo controle (n=10)	Tratamento Agudo em doses repetidas			Tratamento subcrônico			Tratamento crônico		
		EAP1 g/kg (n=10)	EAP2 g/kg (n=10)	EAP3 g/kg (n=10)	EAP1 g/kg (n=10)	EAP2 g/kg (n=10)	EAP3 g/kg (n=10)	EAP1 g/kg (n=10)	EAP2 g/kg (n=10)	EAP3 g/kg (n=10)
Glicose (mg/dL)	88,86 ± 6,94	89,80 ± 10,11	90,40 ± 10,33	90,40 ± 10,40	89,80 ± 10,11	90,40 ± 10,33	90,00 ± 10,40	88,76 ± 07,13	94,62 ± 14,54	94,23 ± 11,45
Ureia	57,29 ± 5,04	44,42 ± 8,16	49,53 ± 6,63	46,16 ± 5,23	44,30 ± 5,16	49,61 ± 6,55	41,12 ± 4,17	43,34 ± 8,11	49,70 ± 4,55	40,23 ± 6,34
Creatinina (mg/dL)	0,40 ± 0,09	0,40 ± 0,08	0,38 ± 0,09	0,38 ± 0,11	0,39 ± 0,10	0,37 ± 0,23	0,37 ± 0,13	0,41 ± 0,06	0,39 ± 0,10	0,37 ± 0,15
Ácido Úrico (mg/dL)	2,58 ± 0,23	2,70 ± 0,34	2,58 ± 0,27	2,50 ± 0,27	2,67 ± 0,24	2,67 ± 0,34	2,49 ± 0,35	2,75 ± 0,56	2,61 ± 0,34	2,67 ± 0,45
Triglicérides (mg/dL)	106,9 ± 10,91	106,6 ± 16,01	107,8 ± 14,61	107,0 ± 11,26	105,7 ± 13,23	106,6 ± 13,65	107,4 ± 13,16	108,9 ± 11,05	108,7 ± 15,45	106,1 ± 10,34
CT (mg/dL)	88,86 ± 6,04	86,60 ± 6,36	85,80 ± 6,98	85,00 ± 5,63	86,60 ± 6,36	85,80 ± 6,98	85,00 ± 5,63	85,34 ± 5,31	84,56 ± 3,91	87,19 ± 4,73
Proteínas totais (mg/dL)	6,87 ± 1,05	6,72 ± 0,79	6,92 ± 1,09	6,76 ± 1,19	6,78 ± 0,89	5,95 ± 0,84	6,66 ± 1,20	6,67 ± 0,23	6,78 ± 1,15	6,56 ± 1,12
AST (U/mL)	94,71 ± 13,70	98,80 ± 11,78	99,40 ± 9,09	90,00 ± 6,72	96,77 ± 10,76	96,66 ± 6,19	95,10 ± 5,62	96,67 ± 10,17	96,89 ± 8,07	91,10 ± 3,70
ALT (U/mL)	57,71 ± 9,63	58,40 ± 12,65	58,00 ± 12,50	57,80 ± 12,81	56,32 ± 10,65	55,12 ± 10,65	57,60 ± 12,44	57,46 ± 11,78	58,13 ± 11,45	57,91 ± 09,84
Fosfatase alcalina (UI)	157,3 ± 13,96	154,20 ± 20,59	157,4 ± 15,19	157,6 ± 16,20	255,20 ± 1,60	96,80 ± 0,68	120,1 ± 0,34	152,10 ± 19,49	97,5 ± 11,11	96,7 ± 12,20
Bilirubina total (mg/dL)	0,35 ± 0,12	0,32 ± 0,12	0,368 ± 0,12	0,34 ± 0,12	0,34 ± 0,15	0,37 ± 0,10	0,36 ± 0,13	0,34 ± 0,06	0,35 ± 0,10	0,35 ± 0,16
Bilirubina direta (mg/dL)	0,15 ± 0,03	0,16 ± 0,04	0,14 ± 0,03	0,14 ± 0,02	0,15 ± 0,05	0,15 ± 0,04	0,13 ± 0,05	0,15 ± 0,05	0,15 ± 0,07	0,15 ± 0,01

Parâmetros bioquímicos do soro de camundongos machos Swiss, tratados durante 30, 90 e 120 dias por via oral com solução salina 0,9% (Controle, n=10) e com extrato aquoso do pó (EPA) de *Orbignya phalerata* nas doses de 1g/kl (EPA 1, n=10), 2g/kg (EPA 2, n=10) e 3 g/kg (EPA 3).

O perfil bioquímico (Tabela 2) dos animais submetidos ao tratamento agudo permaneceu dentro dos valores de referência. O tratamento EAP causou uma redução significativa da concentração de ureia no soro nos demais tratamentos. A fosfatase alcalina apresentou uma concentração inferior em quase todos os grupos tratados com extrato aquoso do pó (EAP) de *Orbignya phalerata*. Apesar das alterações mencionadas acima, glicemia, colesterol, ácido úrico, triglicerídeos, colesterol total, proteínas totais, AST, ALT, bilirrubina total, bilirrubina direta e as concentrações de creatinina permaneceram inalteradas após o tratamento com o EAP *Orbignya phalerata* nas doses testadas.

CONCLUSÃO

A administração aguda em doses repetidas, subcrônica e crônica do EAP do mesocarpo de babaçu não induziram nenhum efeito de risco na maioria dos parâmetros hematológicos e bioquímicos estudados em camundongos Swiss adultos. No entanto, novos estudos investigando-se outros aspectos toxicológicos são necessários, para melhor avaliar a segurança do uso do mesocarpo do babaçu.

REFERÊNCIAS

- BRITO, A.S. Manual de Ensaio Toxicológicos in vivo. 3 ed. Campinas: Ed. Unicamp, 1994.
- BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. 11 ed. Porto Alegre: AMGH, 2007.
- CARVALHO FILHO, C. J. Influência das dietas rica em carboidrato sobre a produção de anticorpos auto-reativos em camundongos. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2003, p. 63.
- LAPA, A.J.; CADEN, S.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; LIMA, T.C.M. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. Salvador: Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE), 2001, p. 74.
- MARLIÉRE, L.D.P.; RIBEIRO, A.Q.; BRANDÃO, M.G.L.; KLEIN, C.H.; ACURCIO, F.A. Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil. Rev Bras Farmacogn 18 (Supl.) p. 754-760, 2008.
- SILVA, P. Farmacologia. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M.A.M.; ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. Rev Bras Farmacogn. v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.
- TEIXEIRA, M.A. Babassu: A new approach for an ancient Brazilian biomass. Biomass & Bioenergy, v. 32, p. 857-866, 2008.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio da empresa Ativa Vida Ltda, Fapepi, Geratec e ao Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental, em nome do prof. Dr. Rivelson Mendes de Freitas, pelo apoio e pela realização do estudo.

CS08 - Fotobiomodulação experimental na prevenção de enfisema pulmonar

Rafael Leite Dantas1* (IC), Lívio César Cunha Nunes2 (PQ)

1 Universidade Federal do Piauí - Mestrado em Ciências Farmacêuticas

2 Universidade Federal do Piauí - Mestrado em Ciências Farmacêuticas

* Autor principal

ozdantas@hotmail.com

Palavras-chave: Laser. Neutrófilos. Histológico.

RESUMO

Introdução: Com o aumento das doenças pulmonares tem-se investido em formas alternativas de tratamento, como a realizada pelo laser de baixa potência. **Objetivo:** Avaliar a fotobiomodulação na prevenção do enfisema pulmonar. **Metodologia:** Cânula foi utilizada como via de acesso para aplicação do laser. Utilizou-se cinco grupos de oito animais: grupo controle; grupo cânula; grupo laser; grupo DPOC (recebeu instilação de papaína) e grupo DPOC + laser. Para análise dos resultados foram realizados LBA e histopatológico. **Resultados:** Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). O LBA demonstrou um aumento significativo no número de neutrófilos no grupo DPOC quando comparado ao grupo controle e ao grupo DPOC+laser. No histopatológico o grupo DPOC apresentou elevado grau de hialinização, congestão e colabamento alveolar, o que não foi encontrado nos demais grupos. **Conclusão:** Os efeitos fotobiomoduladores do laser se mostraram eficazes na prevenção do enfisema pulmonar.

INTRODUÇÃO

O enfisema pulmonar é uma doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) que se caracteriza pela dilatação dos espaços aéreos distais aos bronquíolos terminais (WEST, 2010). Esta dilatação ocasiona progressiva limitação do fluxo aéreo, o que gera incapacidades físicas e piora da qualidade de vida (MACHADO, 2008).

A DPOC é hoje um grande desafio para a saúde pública (MENEZES, JARDIM et al., 2005). No mundo estima-se que é a quarta maior causa de morte (RABE, HURD et al., 2007). Na América Latina as mortes atribuídas à doença aumentaram 65% na última década (MENEZES, JARDIM et al., 2005). No Brasil não se conhece a sua real prevalência devido aos diferentes critérios diagnósticos (BAGATIN, JARDIM et al., 2006), mas nos EUA ela é a quarta maior causa de morte e é projetada para ser a terceira em 2020 (MAPEL, DUTRO et al., 2011).

A aparência histológica clássica do enfisema é a perda das paredes alveolares com conseqüente destruição de porções do leito capilar. As pequenas vias aéreas (inferiores a 2mm de diâmetro) se mostram estreitas, tortuosas e numericamente reduzidas. Além disso, elas possuem paredes finas e atrofiadas (MACHADO, 2008; WEST, 2010).

Uma hipótese atual para o desenvolvimento do enfisema é a liberação pelos neutrófilos de grandes quantidades de enzima lisossomal elastase. Esta liberação causa a destruição da elastina e do colágeno tipo IV, que são fundamentais para a estruturação e a integridade alveolar (WEST, 2010). A elastase tem efeito similar ao da enzima proteolítica extraída da fruta e seiva da papaia (*Carica papaya*), por este motivo a papaína é utilizada para o desenvolvimento experimental do enfisema pulmonar (GROSS, BABYAK et al., 1964; FUSCO, PÊGO-FERNANDES et al., 2002).

O fumo é um fator importante para o desenvolvimento do enfisema, pois estimulam os macrófagos a liberarem substâncias quimioatrativas de neutrófilos, como o C5a, e reduz a atividade dos inibidores da elastase. Além disso, exacerba a marginação de leucócitos no pulmão (WEST, 2010).

A neovascularização e a rápida epitelização são importantes na reestruturação do pulmão enfisematoso. Um dos meios atualmente conhecidos de se conseguir neovascularização e rápida epitelização é se utilizando o efeito fotobiomodulador do laser de baixa potência (BOURGUIGNON FILHO, FEITOSA et al., 2005; RABELO, VILLAVARDE et al., 2006; DALL AGNOL, NICOLAU et al., 2009; ROBERTS e SWIFT JR, 2011). Os fótons deste laser geram energia química e cinética no interior da célula com baixa produção de calor (ROCHA JÚNIOR, VIEIRA et al., 2007; PENG, JUZENIENE et al., 2008), o que aumenta a síntese de ATP (glicólise e fosforilação oxidativa) e conduz para normalização da função celular. Cálcio é liberado das mitocôndrias, devido à intensificação do seu gradiente protônico dentro do citoplasma, o que gera reparação, migração e proliferação celular, síntese de RNA, DNA e proteínas (OLIVEIRA JÚNIOR, EVANGELISTA DO SANTO et al., 2010).

Muitas doenças pulmonares são ocupacionais e relacionadas à poluição do ar. A utilização de compostos inorgânicos, como carvão mineral e sílica, em diversos setores industriais e a maior quantidade dos poluentes atmosféricos tem levado ao aumento das doenças pulmonares, como as ambientais e as obstrutivas (WEST, 2010). Diversos estudos vêm sendo realizados para que se obtenha êxito no tratamento deste tipo de enfermidade. Tem-se investido em exames diagnósticos mais precoces e em formas alternativas de tratamento. Uma forma de tratamento não medicamentoso que tem se mostrado promissora é a realizada pelo laser de baixa potência. Com o objetivo de se avaliar este tratamento na prevenção do enfisema pulmonar realizou-se este ensaio experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no laboratório de histopatologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Piauí (CCS/UESPI), no período de agosto de 2010 a março de 2011 e foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FACID, protocolo n°. 204/10.

Cânulas na traquéia foram utilizadas como via de acesso ao pulmão. Para determinar o tamanho da cânula e o melhor local para a incisão 2 animais foram sacrificados com tiopental -300 mg/Kg, ip para dissecação traqueal. Os procedimentos de anestesia foram realizados com ketamina -100 mg/kg, ip e xilazina -20 mg/kg, ip. Após a anestesia foi feita uma incisão longitudinal na região cérvico-ventral, assim a traquéia foi exposta e canulada. A cânula foi suturada interna e externamente para que o animal não realizasse a decanulação e nem causasse lesão de traquéia.

Foram utilizados 42 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*) machos, com 3 meses de vida e peso médio de 300g ± 20g provenientes do Biotério do CCS/UESPI. Foram formados cinco grupos de oito animais, divididos da seguinte forma: grupo controle; grupo cânula; grupo laser; grupo DPOC; grupo DPOC + laser. No grupo controle, os animais não receberam nada; no grupo cânula, os animais receberam apenas a cânula; no grupo laser, os animais foram apenas irradiados; no grupo DPOC, os animais receberam papaína; no grupo DPOC + laser, os animais foram irradiados após a instilação de papaína.

A indução do enfisema pulmonar foi realizada através de uma única instilação de solução de papaína. A dosagem foi estabelecida modificando-se o determinado por Fusco (FUSCO, PÊGO-FERNANDES et al., 2002) em seu modelo experimental. Foram instilados 0,05ml por animal em uma concentração que assegurasse 2,5mg/kg (cerca de 0.75mg de papaína por animal), pela traqueostomia, em infusão, por cerca de dois minutos.

Para a estratégia de tratamento do enfisema pulmonar foi utilizado laser 660nm MM OPTICS e dose de 7J/cm², o tempo foi calculado automaticamente pelo aparelho por meio de seletores de densidade de potência. Para a irradiação do laser foi utilizado fibra óptica plástica MMO 1 X 0.4mm. Nos grupos laser e DPOC+laser, o laser foi aplicado acoplado à cânula traqueal de modo que a fibra óptica flexível de sua extremidade ultrapassasse a sua angulação. Nos dois grupos os animais foram irradiados uma vez ao dia, pela manhã, durante cinco dias consecutivos iniciando 24h após a instilação da papaína. Este início rápido do tratamento objetivou prevenir alterações, na maioria irreversíveis, do enfisema avançado.

Para a quantificação dos neutrófilos realizou-se lavado broncoalveolar (LBA) no 6° dia do experimento. Quatro animais de cada grupo foram sacrificados e foi feita uma nova incisão longitudinal na região cérvico-ventral para exposição e canulação da traquéia com o tubo flexível de um escalpe. Foram ejetados 20 ml de PBS (Solução Salina Fosfatada Tamponada) no pulmão e aplicada uma massagem local, posteriormente foram aspirados 10 ml de secreção pulmonar. O LBA obtido foi centrifugado por 20 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o botão celular aspirado por pipeta para a realização do esfregaço, que foi corado com o método May Grnwald – Giensa. A contagem das células totais das lâminas foi realizada em câmara de Neubauer (DOS SANTOS ALVES, DE OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2010).

No mesmo dia do LBA foi realizada a necropsia dos pulmões dos quatro animais restantes de cada grupo. Para a conservação foi utilizado formol a 10%. Os pulmões tiveram seus lóbulos separados, cortados com espessura de 5µm, corados com hematoxilina e eosina (HE) e analisados em microscópio óptico. Para análise histopatológica considerou-se o grau de hialinização, congestão e colabamento alveolar.

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, em seguida, ao teste Duncan. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o GraphPad Software V. 4, GraphPad Instat-TM (2005). Os resultados foram expressos como a média +- erro padrão da média (EPM). Valores de p < 0,05 foram considerados significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados, em termos de neutrófilos no LBA e presença de alterações histopatológicas, estão demonstrados na figura 1 e na tabela 1.

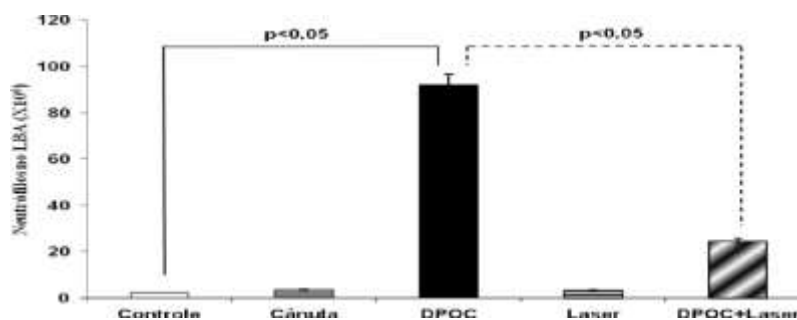


Figura 1: Contagem de neutrófilos no LBA de ratos. ANOVA seguida de Duncan.

Tabela 1: Análise histopatológica dos grupos estudados

Grupos Achados	Hialinização	Congestão	Colabamento alveolar
Controle	-	-	-
Cânula	-	-	-
DPOC	+++	+++	+++
Laser	-	-	-
DPOC + Laser	+	+	+

Legenda: - (Ausente); + (Discreto); ++ (Moderado); +++ (Acentuado).

Dados do LBA (figura 1) mostraram uma diferença significativa ($p < 0,05$) no número de neutrófilos quando se comparam os grupos DPOC, DPOC+laser e controle. Resultados semelhantes foram encontrados em Alves (DOS SANTOS ALVES, DE OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2010) ao realizar um estudo utilizando 30 ratos divididos em três grupos, dos quais dois foram expostos à fumaça de cigarro durante 45 dias e um deles tratados com laser 670nm.

Verifica-se que, em relação ao controle, o número de neutrófilos é bem mais abundante no DPOC, representando 920×20 , o que indica a presença de inflamação, e no grupo tratado com laser esse valor reduz para cerca de 250×20 , mostrando que o laser exerceu função antiinflamatória ao proporcionar a redução dessas células, pois entre os grupos DPOC e DPOC + laser, a redução foi significativa ($p < 0,05$). Os neutrófilos são as células mais encontradas no LBA de pacientes com DPOC (TARANTINO, 2002; RUFINO e SILVA, 2006).

A tabela 1 demonstra que o grupo DPOC apresentou acentuado grau de hialinização, congestão e colapamento alveolar. Em contrapartida, o grupo DPOC + laser apresentou apenas discretamente tais achados. Estes resultados se assemelham aos encontrados por Oliveira (OLIVEIRA JÚNIOR, EVANGELISTA DO SANTO et al., 2010) ao realizar o tratamento de ratos com DPOC utilizando laser 904nm, onde a análise histopatológica no grupo DPOC demonstrou um enfisema acentuado, áreas de atelectasias e destruição das paredes alveolares e a do grupo tratado mostrou uma regressão de enfisema acentuado para discreto.

Dados do LBA e da análise histopatológica demonstram, ainda, que a presença da cânula não ocasionou ação inflamatória significativa, pois os resultados encontrados são semelhantes aos do grupo controle. Outro resultado semelhante ao controle foi o encontrado pelo grupo laser. Isto ocorre porque é necessário que o tecido biológico esteja de alguma forma em desequilíbrio homeostático, ou seja, alguns autores relatam que o laser de baixa potência não tem efeito sobre células ou tecidos que não possuem algum tipo de alteração fisiopatológica (KARU, 2003).

A ação antiinflamatória do laser pode ser facilmente observada ao se analisar as fotos da análise histopatológica (figura 2). Esta resposta antiinflamatória ocorre porque o laser atua inibindo a ação dos IL-1 β e TNF- α , o que interrompe a quimiotaxia celular para o pulmão (JIMBO, NODA et al., 1998). Esta resposta do fotobiomodulador também foi verificada por vários outros autores (WALKER, 1983; EDUARDO, CECCHINI et al., 1993; BERTOLINI e NOHAMA, 2007; DE CASTRO CARVALHO, NICOLAU et al., 2010; DOS SANTOS ALVES, DE OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2010; ABREU, BATISTA et al., 2011).

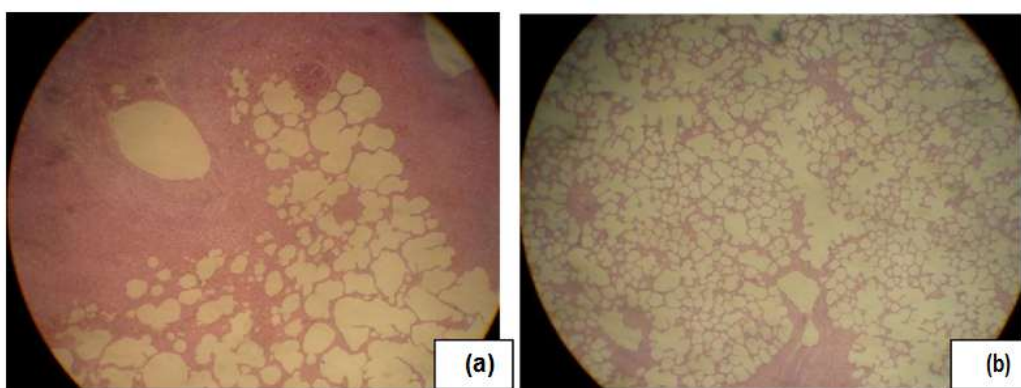


Figura 2: Lâminas com coloração de HE com aumento de 5X10. a - grupo DPOC (aumento dos espaços alveolares, colapamento alveolar, congestão, hialinização e presença de células inflamatórias); b – grupo DPOC+Laser.

CONCLUSÃO

Tendo por base as análises realizadas, verifica-se que os efeitos fotobiomoduladores do laser se mostraram eficazes na prevenção do enfisema pulmonar.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. M.; BATISTA, L. V.; PEREIRA, G. C. L.; KERPPERS, I. I.; OLIVEIRA, C. S.; FONSECA, L. A. Efeito do laser de baixa intensidade no trauma agudo medular-Estudo Piloto. *ConScientiae Saúde*, n. 1, p. 11-16, 2011.
- BAGATIN, E.; JARDIM, J. R. B.; STIRBULOV, R. Occupational chronic obstructive pulmonary disease. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 32, p. S35-S40, 2006.
- BERTOLINI, G. R. F.; NOHAMA, P. Avaliação da conformidade dos equipamentos laser de baixa potência e emissão contínua empregados em fisioterapia. *Fisioterapia em Movimento*, v. 20, n. 2, p. 13-23, 2007.
- BOURGUIGNON FILHO, A. M.; FEITOSA, R. C. A.; BELTRÃO, G. C.; PAGNONCELLI, R. M. Utilização do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização tecidual. Revisão de literatura. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, v. 46, n. 1, p. 37-43, 2005.
- DALL AGNOL, M. A.; NICOLAU, R. A.; DE LIMA, C. J.; MUNIN, E. Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. *Lasers in medical science*, v. 24, n. 6, p. 909-916, 2009.
- DE CASTRO CARVALHO, K.; NICOLAU, R. A.; MAIA, A. L. M.; ROXO, P. Estudo da resistência cicatricial cutânea de ratos tratados com fototerapia a laser. *ConScientiae Saúde*, n. 2, p. 179-186, 2010.
- DOS SANTOS ALVES, W.; DE OLIVEIRA JÚNIOR, G. C.; EVANGELISTA, L. A. Terapia com laser 670nm no tratamento da DPOC experimental em ratos. *ConScientiae Saúde*, n. 4, p. 610-617, 2010.
- EDUARDO, C. P.; CECCHINI, R. C. M.; CECCHINI, S. C. M. O papel coadjuvante do Nd: YAG laser na Endodontia. Caso clínico; The coadjuvant part of the Nd: YAG laser in Endodontics. *Clinical case. Rev. ABO Nac*, v. 1, n. 2, p. 102-4, 1993.
- FUSCO, L. B.; PÊGO-FERNANDES, P. M.; XAVIER, A. M.; PAZETTI, R.; RIVERO, D.; CAPELOZZI, V. L.; JATENE, F. B. Modelo experimental de enfisema pulmonar em ratos induzido por papaína. *J Pneumol*, v. 28, n. 1, p. 1-7, 2002.
- GROSS, P.; BABYAK, M. A. N. N.; TOLKER, E.; KASCHAK, M. Enzymatically produced pulmonary emphysema: a preliminary report. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, v. 6, n. 12, p. 481-484, 1964.
- JIMBO, K.; NODA, K.; SUZUKI, K.; YODA, K. Suppressive effects of low-power laser irradiation on bradykinin evoked action potentials in cultured murine dorsal root ganglion cells. *Neuroscience letters*, v. 240, n. 2, p. 93-96, 1998.
- KARU, T. Low power laser therapy. *Biomedical photonics handbook*, v. 48, p. 1-25, 2003.
- MACHADO, M. G. R. Bases da fisioterapia respiratória. *Terapia Intensiva e Reabilitação*, Rio de Janeiro, 2008.
- MAPEL, D. W.; DUTRO, M. P.; MARTON, J. P.; WOODRUFF, K.; MAKE, B. Identifying and characterizing COPD patients in US managed care. A retrospective, cross-sectional analysis of administrative claims data. *BMC health services research*, v. 11, n. 1, p. 43, 2011.

- MENEZES, A. M. B.; JARDIM, J. R.; PÉREZ-PADILLA, R.; CAMELIER, A.; ROSA, F.; NASCIMENTO, O.; HALLAL, P. C. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease and associated factors: the PLATINO Study in São Paulo, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 21, n. 5, p. 1565-1573, 2005.
- OLIVEIRA JÚNIOR, G. C.; EVANGELISTA DO SANTO, L. A.; SÁ, H. P.; NUNES, H. M.; ALVES, W. S.; CARVALHO, K. C. Efeito da laserterapia de baixa potência na inflamação pulmonar em rattus novergicus DOI: 10.5585/consaude. v9i4. 2310. *ConScientiae Saúde*, v. 9, n. 4, p. 659-666, 2010.
- PENG, Q.; JUZENIENE, A.; CHEN, J.; SVAASAND, L. O.; WARLOE, T.; GIERCKSKY, K. E.; MOAN, J. Lasers in medicine. *Reports on Progress in Physics*, v. 71, n. 5, p. 056701, 2008.
- RABE, K. F.; HURD, S.; ANZUETO, A.; BARNES, P. J.; BUIST, S. A.; CALVERLEY, P.; FUKUCHI, Y.; JENKINS, C.; RODRIGUEZ-ROISIN, R.; VAN WEEL, C. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease GOLD executive summary. *American journal of respiratory and critical care medicine*, v. 176, n. 6, p. 532-555, 2007.
- RABELO, S. B.; VILLAVARDE, A. B.; NICOLAU, R. A.; SALGADO, M. A. C.; MELO, M. D. S.; PACHECO, M. T. T. Comparison between wound healing in induced diabetic and nondiabetic rats after low-level laser therapy. *Photomedicine and Laser Therapy*, v. 24, n. 4, p. 474-479, 2006.
- ROBERTS, H. W.; SWIFT JR, E. J. PULPAL TEMPERATURE CHANGES DURING POWER BLEACHING PROCEDURES. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, v. 23, n. 2, p. 126-131, 2011.
- ROCHA JÚNIOR, A. M.; VIEIRA, B. J.; ANDRADE, L. C. F.; AARESTRUP, F. M. Effects of low-level laser therapy on the progress of wound healing in humans: the contribution of in vitro and in vivo experimental studies. *Jornal Vascular Brasileiro*, v. 6, n. 3, p. 257-265, 2007.
- RUFINO, R.; SILVA, J. R. L. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. *J Bras Pneumol*, v. 32, n. 3, p. 241-8, 2006.
- TARANTINO, A. B. Doenças pulmonares; Lung diseases. Guanabara Koogan, 2002. ISBN 852770773X.
- WALKER, J. Relief from chronic pain by low power laser irradiation. *Neuroscience letters*, v. 43, n. 2, p. 339-344, 1983.
- WEST, J. B. Fisiopatologia pulmonar 7ª. Artmed, 2010. ISBN 8520404006.

CS09 - Análise fitoquímica qualitativa e avaliação tóxica de frações do mesocarpo do babaçu (*Orbigny phalerata* M.)

Ronny Petterson dos Santos Araújo^{1*}(IC), Alisson Ferreira Dantas², Antonio Luiz Gonzaga Júnior², George Lailson da Silva Oliveira³, Nougá Cardoso Batista⁴, Lívio César Cunha Nunes², Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante²(PQ)

1. Universidade Federal do Piauí – Curso de Graduação em Ciências Biológicas
2. Universidade Federal do Piauí – Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
3. NOVAFAPI – Curso de Biomedicina
4. Universidade Estadual do Piauí – Coordenador Geral do Projeto Geração de Nova Tecnologias (GERATEC)

* Autor principal

ronnypetter@hotmail.com

Palavras-chave: *Orbignyaphalerata* M.. fitoquímica. *Artemia salina* L.. toxicidade.

RESUMO

O babaçu, *Orbignyaphalerata* M., é uma palmeira que exerce um papel importante para comunidades da região norte e nordeste brasileiro, além de possuir propriedades interessantes para a indústria farmacêutica. Tendo vista o potencial do babaçu, este estudo teve como objetivo realizar a análise fitoquímica qualitativa de frações do mesocarpo do babaçu além de observar seus possíveis efeitos tóxicos no teste de toxicidade aguda com *Artemia salina* L. As frações hidroalcoólica, acetato de etila e diclorometano do mesocarpo do fruto do babaçu foram utilizados para verificar a presença de taninos, flavonoides, alcaloides, saponinas, quinonas e cumarinas. A avaliação tóxica foi realizada através da determinação da Concentração Letal 50 (CL50) das frações pelo teste de toxicidade aguda com *A. salina*. A análise fitoquímica mostrou a presença de taninos, flavonoides, alcaloides, quinonas e cumarinas nas três frações demonstrando que as frações possuem a mesma classe de metabólitos secundários em sua constituição química. Através da avaliação tóxica pelo teste de toxicidade aguda com *A. salina* pode-se observar que a fração acetato de etila não possui efeitos tóxicos, enquanto que as frações hidroalcoólica e diclorometano exibiram baixa toxicidade aguda o que demonstra similaridade com resultados de outros estudos em camundongos. Portanto, pode-se concluir que as frações testadas possuem a mesma classe metabólitos secundários e exibem baixa toxicidade ou nenhum efeito tóxico sendo uma excelente fonte para obtenção novos fármacos, porém se faz necessário o uso de outros testes para a sua utilização segura e eficaz na produção de fármacos.

INTRODUÇÃO

O babaçu, *Orbignyaphalerata* M., é uma árvore pertencente à família *Arecaceae*, conhecida também por seu antigo nome *Palmae* cujo desempenha um papel importante para comunidades das regiões norte e nordeste brasileiro por ser uma fonte financeira e alimentícia (JANICK e PAULL, 2006; SOUZA et al., 2011). Esta palmeira possui propriedades de interesse a indústria farmacêutica, como antimicrobiana, antinociceptivos e cicatrizante (BALDEZ et al., 2006; CAETANO et al., 2002; PINHEIRO et al., 2012).

Visando o potencial do babaçu na indústria farmacêutica devido às propriedades e ampla utilização na medicina popular, este estudo teve como objetivo realizar a análise fitoquímica preliminar de frações do mesocarpo do fruto do babaçu, bem como avaliar seus efeitos tóxicos

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das frações do mesocarpo do fruto do babaçu

As frações extrativas foram obtidas através da preparação de extrato hidroalcoólico, seguido de filtração, concentração em evaporador rotativo e particionamento com n-hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol. Para os testes foram utilizados as frações hidroalcoólica, acetato de etila e diclorometano.

Análise Fitoquímica Preliminar

As frações hidroalcoólica, acetato de etila e diclorometano do mesocarpo do fruto do babaçu foram submetidas a testes preliminares para observar metabólitos secundários como taninos, flavonoides, alcaloides, saponinas, quinonas e cumarinas (BARBOSA, 2001; MATOS, 2009).

Teste de toxicidade aguda com *A. salina*

Os efeitos tóxicos das frações do mesocarpo do fruto do babaçu foram avaliados no teste de toxicidade aguda com *A. salina* de acordo com Meyer et al. (1982), com modificações. Os ovos de *A. salina* foram colocados para eclodir em solução de água do mar mais água mineral (1:1) até a liberação de suas larvas por 48 horas. Dez *A. salina* foram transferidas para tubos contendo as concentrações de 500, 250, 150, 100 e 50 µg/mL das frações hidroalcoólica, acetato de etila e diclorometano. Como controle foi utilizado a solução de água do mar e água mineral (1:1). Após 24 horas, os exemplares mortos foram quantificados. Os testes foram realizados em triplicatas. Os resultados obtidos no teste de toxicidade aguda com *A. salina* foram avaliados pelo Programa SPSS, versão 17:0. A Concentração Letal 50 (CL50) foi determinada por análise proibit.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise fitoquímica preliminar mostrou a presença de taninos, flavonoides, alcaloides, quinonas e cumarinas em todas as frações testadas. Entretanto, não foi observada a presença de saponinas nas frações utilizadas (Tabela 1). Portanto, as frações hidroalcoólica, acetato de

etila e diclorometano do mesocarpo do fruto do babaçu possuem a mesma classe de metabólitos secundários.

Os metabólitos secundários de plantas são micromoléculas originadas de macromoléculas essenciais para sobrevivência do organismo, denominadas de metabólitos primários (von POSER e MENTZ, 2010). Estas micromoléculas possuem baixo peso molecular, são encontrados em concentrações relativamente baixas e geralmente apresentam estrutura complexa, além de desempenharem atividades biológicas importantes para as plantas, como antibióticos, antifúngicos e antivirais, e serem utilizadas como fonte para a obtenção de medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (FUMAGALI et al., 2008; PINTO et al., 2002; von POSER e MENTZ, 2010).

Os resultados obtidos no teste de toxicidade aguda com *A. salina* demonstraram que a CL50 da fração hidroalcoólica foi de 752,70 µg/mL, enquanto a CL50 da fração acetato de etila foi de 1.055,00 µg/mL e a CL50 da fração diclorometano foi de 506,41 µg/mL. Pode-se afirmar que a fração acetato de etila não é tóxica, pois a CL50 desta fração foi de 1.055,00 µg/mL e valores de CL50 encontrados neste teste acima de 1.000 µg/mL são considerados menos ativos e não tóxicos (dos SANTOS JÚNIOR et al., 2010). As frações hidroalcoólica e diclorometano apresentaram CL50 abaixo de 1.000 µg/mL, 752,70 e 506,41µg/mL, respectivamente, portanto, estas frações possuem baixa toxicidade e são mais ativas que a fração acetato de etila. Na ordem crescente de toxicidade a fração diclorometano < fração hidroalcoólica < fração acetato de etila (Figura 1).

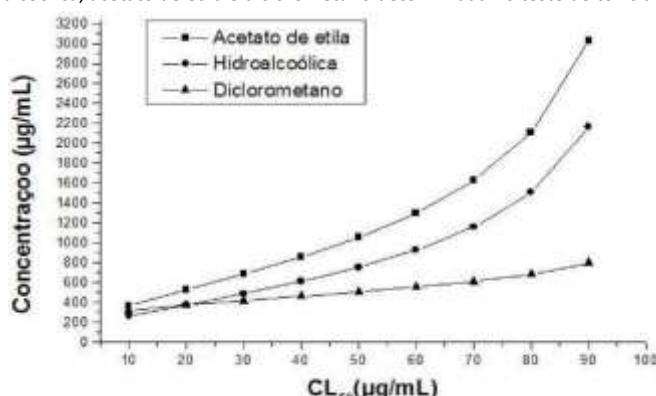
O teste de toxicidade aguda *A. salina* é uma ferramenta útil para observar toxicidade aguda de extratos vegetal e mostra uma boa correlação com testes de toxicidade aguda em camundongos (PARRA et al., 2001). Isto é demonstrado pela similaridade dos resultados encontrados com dados obtidos que relatam baixa toxicidade aguda em camundongos para extrato obtido do mesocarpo do fruto do babaçu (BARROQUEIRO et al., 2011).

Tabela 1 – Metabólitos secundários detectados nas frações do mesocarpo do fruto do babaçu.

Metabólitos Secundários	Fração Hidroalcoólica	Fração Acetato de Etila	Fração Diclorometano
Taninos	+	+	+
Flavonoides	+	+	+
Alcaloides	+	+	+
Saponinas	-	-	-
Quinonas	+	+	+
Cumarinas	+	+	+

+ classe de metabólito secundário presente - classe de metabólito secundário ausente

Figura 1– CL₅₀ das frações hidroalcoólica, acetato de etila e diclorometano determinada no teste de toxicidade aguda com *A. salina*.



CONCLUSÃO

Portanto, pode-se concluir que as frações hidroalcoólica, acetato de etila e diclorometano do mesocarpo do babaçu apresentam as mesmas classes de metabólitos secundários: taninos, flavonoides, alcaloides, quinonas e cumarinas. Concluiu-se também que as frações hidroalcoólica e diclorometano do mesocarpo do babaçu demonstraram baixa toxicidade aguda, enquanto que a fração acetato de etila não exibiu toxicidade aguda observada no teste toxicidade aguda em *A. salina*. Deste modo as frações testadas configuram-se como uma excelente fonte para a obtenção de novos fármacos, entretanto é necessária a utilização de outros testes tóxicos e/ou genotóxicos que permitam o seu uso seguro e eficaz na produção de novos fármacos.

REFERÊNCIAS

BALDEZ, R. N.; MALAFAIA, O.; CZECZKO, N. G.; MARTINS, N. L. P.; FERREIRA, L. M.; RIBAS, C. A. P. M.; JÚNIOR, G. S.; del CLARO, R. P.; dos SANTOS, L. de O. M.; NETO, L. G.; de ARAÚJO, L. R. R. Análise da cicatrização do cólon com uso do extrato aquoso da *Orbignyaphalerata* (Babaçu) em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. v. 21, p. 31-38. 2006.

BARBOSA, W. L. R. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. *Revista Científica da UFPA*. v. 4, p. 12-18. 2001.

BARROQUEIRO, E. S. B.; BARROQUEIRO, F. S. B.; PINHEIRO, M. T.; MACIEL, M. C. G.; BARCELLOS, P. S.; SILVA, L. A.; LOPES, A. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; GUERRA, R. N. M. Evaluation of acute toxicity of babaçu mesocarp in mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 21, p. 710-714. 2011.

CAETANO, N.; SARAIVA, A.; PEREIRA, R.; CARVALHO, D.; PIMENTEL, M. C. B.; MAIA, M. B. S. Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como anti-inflamatório. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 12, p. 132-135. 2002.

DOS SANTOS JÚNIOR, H. M.; OLIVEIRA, D. F.; de CARVALHO, D. A.; PINTO, J. M. A.; CAMPOS, V. A. C.; MOURÃO, A. R. B.; PESSOA, C.; de MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. *Journal of Natural Medicines*. v. 64, p. 231-238. 2010.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. de F. P. S.; VIDOTI, G. J.; de OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 18, p. 627-641. 2008.

JANICK, J.; PAULL, R. E. *The Encyclopedia of Fruit & Nuts*. Cambridge: ND-CABI Publishing, 2008. MATOS, F. J. de A. *Introdução à Fitoquímica Experimental*. Fortaleza: Edições UFC. 2009. 150p.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*. v. 45, p. 31-34. 1982.

PARRA, L. A.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*. v. 8, p. 395-400. 2001.

PINHEIRO, M. M. G.; BOYLAN, F.; FERNANDES, P. D. Antinociceptive effect of the *Orbignyaspeciosa* Mart. (Babassu) leaves: Evidence for the involvement of apigenin. *Life Sciences*. 2012.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. da S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. de A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*. v. 25, p. 45-61. 2002.

SOUZA, M. H. S. L.; MONTEIRO, C. A.; FIGUEREDO, P. M. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; GUERRA, R. N. M. Ethnopharmacological use of babassu (*Orbignyaphalerata* Mart) in communities of babassu nut breakers in Maranhão, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 133, p. 1-5. 2011.

VON POSER, G. L.; MENTZ, L. A. Diversidade Biológica e Sistemas de Classificação. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; de Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC. 2010

AGRADECIMENTOS

Agrademos a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI) pelo apoio financeiro.

CS10 - Toxicidade aguda do estragol em camundongos

Thallita Castelo Branco de Andrade1* (PG), Antonio Luiz Gomes Junior 1(PG), Giselle Zayra da Silva Oliveira1(PG), Marcello Holanda de Andrade2(IC), Thiago Ferreira Lim3 (IC), Rivelilson Mendes de Freitas4 (PQ), Sidney Gonçalves de Lima4 (PQ).

1. Universidade Federal do Piauí – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
2. UniNovafapi – Curso de Graduação em Medicina
3. Universidade Federal do Piauí – Curso de Graduação em Farmácia
4. Universidade Federal do Piauí – Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

* Autor principal

E-mail: thallitacastelo@hotmail.com

Palavras-chave: Camundongos. Estragol. *Cróton zehntneri*. Toxicidade.

RESUMO

O estragol é um dos principais componentes do óleo essencial de *Cróton zehntneri* (OECz). Na literatura já foram relatadas algumas atividades para este constituinte como antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante dentre outras, o que confere a esse composto uma possível utilização como fármaco. Com o objetivo de avaliar a toxicidade aguda do estragol foram administrados em camundongos (n= 12) ,via oral, dose única em concentrações crescentes (3 – 5 g/kg) para a avaliação de seu “Screening Hipocrático”. No período de 30 minutos de análise do “Screening Hipocrático” evidenciou efeito depressor sobre os parâmetros atividade geral, resposta ao toque, reflexo de endireitamento e tônus do corpo. Manifestações estas que revertem espontaneamente nas primeiras 24 h de observação. Os resultados obtidos revelaram um possível efeito tóxico do estragol nestas concentrações administradas.

INTRODUÇÃO

Cróton zehntneri é uma planta subarborescente e caducifolia, nativa do Nordeste brasileiro que pertence à família das Euforbiáceas e ao gênero *Cróton* (segundo maior gênero da família Euphorbiaceae) (BATATINHA et al, 1995), o qual é muito importante na flora nordestina pela larga ocorrência e dispersão nos cerrados e matas dos tabuleiros litorâneos, matas pluviais e, principalmente, na caatinga do Nordeste.

Conhecido popularmente como “canela de cunhã”, “canelinha” ou “canela brava”, é utilizado na forma de chás e infusões para tratar distúrbios digestivos e transtornos psicossociais. Por apresentar um forte e agradável odor de anis, o extrato de seus galhos e folhas é utilizado como aromatizante e edulcorante de doces e aguardente de cana (CRAVEIRO et al., 1981; LEAL-CARDOSO e FONTENELES, 1999). Apresenta óleos essenciais e constituintes ativos como terpenóides, flavonóides e alcalóides sendo com frequência utilizado na medicina popular possuindo propriedades terapêuticas comprovadas.

O óleo essencial do *Cróton zehntneri* (OECz) apresenta como principais constituintes os derivados de fenilpropanos; anetol (principalmente o trans-anetol), estragol e eugenol, também presentes com bastante frequência nos óleos essenciais de outras plantas (CRAVEIRO et al., 1978; CRAVEIRO et al., 1981). Foi verificado que o teor desses constituintes varia de acordo com a localidade onde a planta é coletada (CRAVEIRO et al., 1981). Desta forma, o *Cróton zehntneri* foi classificado em três quimiotipos: quimiotipo anetol, aquele que contém um considerável percentual de anetol, embora não seja o principal constituinte (anetol 28% e estragol 75% do peso do óleo); quimiotipo eugenol (eugenol 68,5% do peso do óleo) e estragol (estragol 80% do peso do óleo) onde o teor de anetol é muito baixo.

Os óleos essenciais, presentes em diversas partes das plantas e produzidos através de seu metabolismo, vêm apresentando alto potencial farmacológico, além de serem de extração fácil e economicamente viável. As atividades biológicas desses óleos se devem à ação isolada e/ou conjunta de seus constituintes químicos. Para o estragol já foram descritas atividades biológicas, tais como antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante dentre outras, o que confere a esse constituinte uma possível utilização como fármaco. Acrescenta-se a esta importância, a similaridade da molécula de estragol à molécula de eugenol, que vem sendo utilizado como molécula de partida para a síntese de novos fármacos.

O estragol caracteriza-se por ser um éter monoterpênico, designado 4-2-(propenil)metoxibenzeno. Possui alguns sinônimos como: metil-chavicol, p-alilanisol, chavicol metiléter, 4-metoxialilbenzeno (DE VINZENCI et al., 2000). Considerando suas propriedades físico-químicas, é

uma substância que se apresenta líquida a temperatura ambiente, de aspecto oleoso, incolor ou levemente amarelado. Não é muito estável principalmente quando exposto ao ar, umidade, luz, calor e metal (SIMÕES et al.,1999).

O metil-chavicol possui ação depressora fugaz sobre o Sistema Nervoso Central, com alterações de alguns reflexos comportamentais; discreta potencialização do tempo de repouso promovido pelo pentobarbital além dos efeitos anestésico, miorelaxante (DALLMEIR; CARLINI,1981; ALBUQUERQUE et al., 1981). O presente trabalho objetiva avaliar a toxicidade aguda do estragol, bem como determinar o intervalo da dosagem que causa letalidade em camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Serão utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss, albinos, machos, pesando entre 25 a 30 g, com aproximadamente 2 meses de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias - CCA da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

Os animais serão mantidos sob condições monitoradas de temperatura equivalente a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com livre acesso a ração tipo pellets (Purina®) e água, mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 6h00 às 18h00. Todos os experimentos propostos serão previamente submetidos à avaliação do Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI.

Administração das Drogas

As substâncias selecionadas para o estudo serão administradas por via oral nas seguintes concentrações 3, 4 e 5 g/kg. A preparação da solução de uso manterá proporção de 1:1 (estragol : tween 80). Nos experimentos de "Triagem farmacológica", todos os animais serão observados diariamente durante 14 dias e será registrado o número de animais mortos dia/dia, para avaliação de eventuais efeitos de toxicidade aguda.

Toxicidade aguda

Para a determinação da toxicidade aguda do estragol foram utilizados camundongos separados em grupos de 12 animais por tratamento, mantidos em jejum prévio de 12 h antes dos ensaios. Neste experimento será avaliado o "Screening Hipocrático", conforme metodologia descrita por MALONE & ROBICHAUD (1962).

"Screening Hipocrático"

Simultaneamente após a administração do estragol, procedeu-se a observação das unidades experimentais no tempo de 0 e 30 minutos, com o objetivo de quantificar-se os efeitos destes sobre os parâmetros: a) Estado de consciência e disposição (aparência geral, frênilo vocal, irritabilidade); b) coordenação motora (atividade geral, resposta ao toque, resposta ao aperto de cauda, contorção abdominal, marcha, reflexo de endireitamento); c) tônus muscular (tônus das patas, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia); d) reflexos (auricular, corneal); e) atividade do sistema nervoso central (tremores, convulsões, estimulações, fenômeno de "Straub", sedação, hipnose, anestesia); f) atividade do Sistema Nervoso Autônomo (lacrimação, ptosis, micção defecação, piloereção) .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estragol é um dos principais constituintes do óleo essencial de *Cróton zehntneri*, sua possível toxicidade foi o objeto de estudo do presente trabalho. Os experimentos foram conduzidos utilizando-se modelo animal de toxicidade pela administração via oral, dose única, de solução de estragol. Foram administradas três doses em diferentes concentrações (3, 4 e 5 g/kg), após administração observou-se que o número de óbitos e o tempo de mortalidade (Tabela 1) foi praticamente constantes nas três doses. Quando observado os efeitos pós administração (Tabela 1) nota-se que todos os grupos apresentaram sintomas de toxicidade, o que demonstrou que nas três concentrações o estragol apresenta possível efeito tóxico ao modelo animal de camundongos.

Dose de ES	Camundongos		Efeitos	
	n/dose	L/T	Tempo de mortalidade (h)	Sintomas de toxicidade
3g/kg	12	9/12	>24 e <96	Ataxia, hiperventilação, sedação
4g/kg	12	10/12	>24 e <72	Ataxia, Sedação, hiperventilação
5g/kg	12	10/12	>0,5 e <24	Ataxia, sedação, hiperventilação e piloereção

ES = Estragol; n/dose= número de animais por dose; L/T= Letalidade por número de animais tratados

Na análise do "Screening Hipocrático" 30 minutos após administração do estragol foram observados alterações nos parâmetros estado de consciência e disposição (atividade geral); sistema motor e muscular (resposta ao toque, reflexo de endireitamento e tônus do corpo), que revelaram-se diminuídos (Tabela 2). Tais manifestações foram reversíveis desaparecendo após as primeiras 24h. Dando prosseguimento às análises, os animais foram monitorados do primeiro ao 14º dia após os tratamento no que refere-se a evolução dos parâmetros fisiológicos (consumo hídrico e de ração; peso corporal e produção de excretas), não constatando-se diferenças significantes entre os diversos grupos tratados (Tabela 3).

Tabela 2. Parâmetros relativos ao "Screening Hipocrático", após administração do estragol via oral (n= 12) em dose única.

Parâmetros avaliados		Dose	Tempo	
			0	30min
Estado de consciência	Atividade geral	3g/kg	4	2
		4g/kg	4	2
		5g/kg	4	2
Sistema motor e muscular	Resposta ao toque	3g/kg	4	1
		4g/kg	4	2
		5g/kg	4	3
	Reflexo de endireitamento	3g/kg	4	3
		4g/kg	4	3
		5g/kg	4	1
Tônus do corpo	3g/kg	4	3	
	4g/kg	4	3	
	5g/kg	4	2	

"Score" numérico da tabela : 4: normal; 3: levemente reduzido; 2: moderadamente reduzido; 1: intensamente reduzido; 0: ausente (De acordo com Brito, 1994).

Tabela 3. Comparação dos parâmetros fisiológicos analisados durante 14 dias entre os grupos experimentais de camundongos.

Dose (g/kg)	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)	Peso corporal (g)	Excretas (g)
3	48,57 ± 1,103	41,79 ± 1,347	25 ± 0	43,5 ± 3,427
4	46 ± 0,7983	43,57 ± 1,429	25 ± 0	33,21 ± 2,84
5	45,57 ± 0,7391	38,57 ± 0,9705	25 ± 0	38,5 ± 3,241

Os resultados do consumo de água e ração, evolução de peso corporal e produção de excretas estão representados pela média ± erro, (n = 12), durante 14 dias.

CONCLUSÃO

Os resultados preliminares do trabalho demonstram um possível efeito tóxico do estragol nas concentrações administradas, necessitando-se de exames bioquímicos e histológicos para melhor confirmação.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE A.A.C.; SORENSON A.L.; LEAL-CARDOSO J.H. Effects of essential oil of *Croton zehntneri*, and of anethole and estragole on skeletal muscles. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 49, n. 1, p. 41- 49, 1995.
- BATATINHA M.J.; DE SOUZA-SPINOSA H.; BERNARDI M.M. *Croton zehntneri*: possible central nervous system effects of the essential oil in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 45, n. 1, p. 53-57, 1995. BRITO, A.S. "Manual de Ensaios Toxicológicos in vivo", Ed. Unicamp, Campinas, págs.15-22, 1994.
- CRAVEIRO A.A.; ANDRADE C.H.S.; MATOS F.J.A.; ALENCAR J.W. Anise-like flavor of *Croton aff zehntneri* Pax. et Hoffm. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 26, p. 772-773, 1978.
- CRAVEIRO, A.A.; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; Machado, M.I.L. Óleos essenciais de plantas do nordeste. Fortaleza: UFC, 1981.
- DALLMEIER, K.; CARLINI, E.A. Anaesthetic, hypothermic, myorelaxant and anticonvulsant effects of synthetic eugenol derivatives and natural analogues. *Pharmacology*, v. 22, p. 113-127, 1981.
- DE VICENZI, M.; SILANO, M.; MAIALETTI, F.; SCAZZOCCHIO, B. Constituents of aromatic plants: II. Estragole. *Fitoterapia*, v. 71, p.725-729, 2000.
- LEAL-CARDOSO, J.H.; FONTENELES, M. C. Pharmacological effects of essential oils of plants of the northeast of Brazil. *An Ac Bras Cienc*, v. 71, n. 2, p. 207-213, 1999.
- MALONE, M.H., ROBICHAUD, R.C. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia*, v. 25, p. 320-332, 1962.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 1999.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal do Piauí pelo suporte científico e técnico para realização deste trabalho. Ao Prof. Rivelilson Freitas pelos conhecimentos transmitidos, e aos mestrandos Antonio Luis e Amanda pelo auxílio para realização deste trabalho.

CV01 - Ensaio pré-clínico do TG1 isolado do bacuri

Aldenora Maria Ximenes Rodrigues¹ (IC), Patricia Régia Pereira dos Santos¹(PQ), Joaquim Soares da Costa Júnior¹(PQ), Rivelilson Mendes de Freitas¹ (PQ), Chistiane Mendes Feitosa¹(PQ)

¹Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina - PI, Brasil.

* Autor principal

aldenora_amxr@hotmail.com

Palavras-chave: 1,3-diésteril-2-oleil-glicerol. Bioquímica. Hematologia. Histologia. Toxicidade aguda.

RESUMO

O composto 1,3-diésteril-2-oleil-glicerol (TG1) corresponde a um triglicerídeo isolado do extrato hexânico da semente de *Platonia insignis* Mart, conhecido como bacuri. Até o momento não há relatos de estudos desse composto na literatura. O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade aguda do TG1 após administração via oral para determinação do efeito sobre os parâmetros comportamentais, bioquímicos, hematológicos e histopatológicos no hipocampo, corpo estriado e tecido hepático de ratos Wistar adultos tratados com TG1 na dose de 30 mg kg⁻¹. O estudo revelou que os parâmetros comportamentais não apresentaram alterações significativas. Durante o tratamento não foi observada nenhuma morte entre os animais. Os ratos tratados com TG1 apresentaram alterações apenas nos índices hematimétricos hemoglobina corpuscular média (HCM) e na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) nas análises hematológicas, quando comparados com grupo controle. As análises bioquímicas da aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina, ácido úrico tiveram seus níveis reduzidos, conferindo preservação dos rins e fígado dos animais na dose testada (p<0,05). Neste estudo, os animais tratados com TG1 não mostraram comprometimento das áreas cerebrais: corpo estriado e hipocampo. Estes resultados indicam que o tratamento com TG1 não produz alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas cerebrais e hepáticas em ratos o que caracteriza uma baixa toxicidade. Esses dados necessitam de futuras pesquisas para comparar os resultados em outras vias, bem como para realizar análises anatomopatológicas dos animais tratados com TG1, assegurando o uso seguro deste triglicerídeo pela indústria farmacêutica e alimentícia.

INTRODUÇÃO

O composto 1,3-diésteril-2-oleil-glicerol (TG1) corresponde a um triglicerídeo isolado do extrato hexânico da semente de *Platonia insignis* Mart. É um derivado da trioleína, solúvel em solventes apolares. Possui fórmula molecular C₅₈H₁₁₂O₆. Sua composição química é definida como C (76,93%), H (12,47%), O (10,60%), e peso molecular 856 g/mol.

A trioleína corresponde a um triacilglicerol de *Persicæ semen* (Rosaceae), recentemente apontada como promissora na terapêutica antitrombótica (Chaves et al., 2010). Esse triacilglicerol compõe substratos em técnicas para seleção de microorganismos lipofílicos, zimograma que consiste na detecção qualitativa da atividade de lipase secretada em meio sólido contendo ágar, meio de cultivo e substrato composto com tributirina, trioleína, óleo de oliva, Tween-80 (Messias et al., 2011).

Diante desse potencial farmacológico e da necessidade da realização da avaliação toxicológica de espécies vegetais é de grande interesse tanto científico quanto comercial a determinação da toxicidade da trioleína em ensaios pré-clínicos, uma vez que os resultados obtidos podem servir tanto ao conhecimento como ao desenvolvimento de um futuro fitoterápico a partir desse triacilglicerol isolado de uma espécie vegetal

popularmente utilizada pela população de nosso estado com finalidade terapêutica e alimentícia. Recentemente a Anvisa publicou o Guia para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-clínica de Fitoterápicos (RE Nº 90) (Craveiro et al., 2008). E nesse estudo foram seguidos os padrões estabelecidos por esse guia para a avaliação da toxicidade aguda do triacilglicerol em estudo.

Após revisão da literatura sobre composto 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) foi verificado que não há disponíveis estudos toxicológicos sobre esse composto, justificando a necessidade e a importância da realização do presente estudo. Porém há relatos recentes sobre a citotoxicidade a partir do extrato hexânico (EH) do qual foi isolado o composto TG1. Em estudos de toxicidade frente à *Artemia salina* leach, o EH e a fração acetato de etila apresentaram efeitos moderadamente citotóxicos, enquanto que a fração diclorometano foi fortemente citotóxica. Além disso, os extratos e as frações de *P. insignis* podem se genotóxicos aos fibroblastos pulmonares de hamster chinês (cél.s.V79) (Costa Júnior et al., 2012). Diante disso, é importante um estudo mais detalhado sobre as propriedades toxicológicas dessa espécie, bem como de compostos obtidos a partir de estudos fitoquímicos.

Dessa forma, esse estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos, bem como realizar análises histopatológicas em áreas cerebrais como hipocampo e corpo estriado, e tecido hepático de ratos adultos tratados por via oral com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1). Além disso, durante o ensaio pré-clínico também foram avaliados os parâmetros comportamentais em ratos adultos para melhor avaliar sua segurança.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados, por experimento, Ratos Wistar machos adultos com peso variando entre 200 a 250 g e 2 meses de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Os animais receberam água e dieta (Purina®) ad libitum e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura (25 ± 2 °C). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí (nº 004/2012).

Determinação dos Parâmetros comportamentais em Ratos

No protocolo experimental da triagem farmacológica comportamental, foram utilizados dois grupos de 10 ratos. Esse protocolo visa avaliar o comportamento dos animais frente à administração de substâncias isoladas de espécies vegetais e/ou sintéticas. O grupo controle foi tratado via oral com solução de Tween 80 a 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (veículo; n=10) durante 30 dias consecutivos. E no segundo grupo, os animais os animais foram tratados com TG1 na dose de 30 mg kg⁻¹ emulsionado no veículo durante 30 dias consecutivos. Em seguida, os animais foram colocados em gaiolas com ração e água ad libitum e observados durante as primeiras 72 horas e por um período de 30 dias para observação dos parâmetros comportamentais (Almeida et al., 1999; Almeida, 2006).

Estudo da toxicidade aguda em parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos tratados com do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1)

Nesse protocolo experimental, dois grupos de dez ratos foram tratados da seguinte forma. O primeiro grupo foi tratado por via oral com TG1 na dose de 30 mg kg⁻¹ em veículo durante 30 dias consecutivos. O grupo controle foi tratado com veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) durante 30 dias consecutivos.

Após 30 dias do tratamento agudo, os animais foram anestesiados com 0,3 mL de pentobarbital sódico (40 mg kg⁻¹, i.p.) e em seguida foi feita à coleta de sangue por rompimento do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro. O sangue foi acondicionado em dois tipos de tubo, um com anticoagulante HB (Laborlab®) para determinação dos parâmetros hematológicos e o outro, sem anticoagulante, para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos.

Para análise bioquímica, o material foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos e, em seguida, determinados os parâmetros glicose, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) colesterol total, triglicerídeos, fosfatase alcalina (ALKP), bilirrubinas total e direta e ácido úrico. Os ensaios foram realizados em aparelho automatizado Vitros 250 com sistemas comerciais da Johnson & Johnson®.

A contagem de eritrócitos, leucócitos totais, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados imediatamente após a coleta por meio do analisador automático de células hematológicas Advia 120/hematology (Siemens).

Avaliação histopatológica em cérebros e tecido hepático e ratos tratados com do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1).

Para esse protocolo experimental, dois grupos de seis ratos foram tratados da seguinte forma. O primeiro grupo foi tratado por via oral com TG1 na dose de 30 mg kg⁻¹ em veículo durante 30 dias consecutivos. O grupo controle foi tratado com veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) durante 30 dias consecutivos.

Após 30 dias de tratamento, todos os animais foram eutanasiados por anestesia com pentobarbital sódico (50 mg kg⁻¹, i.p.). Seus cérebros e fígado foram removidos e fixados em formalina a 10% por 72 h para a realização das análises histopatológicas. Cortes sagitais, feitos em intervalos de 1 mm, foram obtidos a partir de um corte inicial próximo aos corpos mamilares. Para o estudo microscópico, seções de 10 µm foram feitas, coradas em hematoxilina - eosina (H & E), e analisadas com auxílio de um microscópio óptico em um aumento de 40 e 100X. As áreas cerebrais e do fígado foram observadas e classificadas de acordo com as descrições do Atlas de Paxinos e Watson (1986). O grau de lesão foi expresso através de uma escala percentual de 0 (nenhum) a 100 (total) para cada hipocampo, corpo estriado e fígado analisados de acordo com o método descrito anteriormente.

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças entre os grupos foram determinadas por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida, quando detectada diferença, pelo teste t-Student-Newman-Keuls como post hoc teste. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que a administração via oral de forma aguda com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) em ratos Wistar adultos durante 30 dias consecutivos produz piloereção que pode ser um indicativo clínico sugestivo de toxicidade. De forma geral, nesse estudo o tratamento com TG1 não produziu efeitos tóxicos mais severos em outros parâmetros comportamentais observados durante 30 dias, sugerindo que o TG1 pode ser usado de forma segura, uma vez que demonstrou baixa toxicidade durante o ensaio pré-clínico. Aspectos quanto ao estado de consciência e disposição, coordenação motora, tônus muscular, reflexos, atividade do sistema nervoso central e autônomo foram preservados. Complementando esses achados durante o período de observação os animais não perderam massa corporal, e não houve alteração no consumo de ração e água. Esse achado pode reforçar inicialmente a hipótese de que o composto pode ser usado de forma segura na indústria farmacêutica e alimentícia, uma vez que é usado regularmente pela população do estado do Piauí e outras regiões do Nordeste brasileiro com essas duas finalidades (Jahn & Günzel, 1997).

O tratamento dos animais com a dose de 30 mg kg⁻¹ (v.o) do TG1 alterou apenas o HCM e CHCM nos parâmetros hematológicos, em comparação com o grupo controle (Tabela 1). Os demais parâmetros analisados permaneceram dentro dos valores de referência e não demonstram importância clínica. A tabela 2 apresenta os valores obtidos da avaliação dos parâmetros bioquímicos em ratos submetidos aos ensaios toxicológicos, por via oral com TGI durante 30 dias. Os valores de ácido úrico, triglicerídeos, AST e fosfatase alcalina dos ratos tratados com o TG1, diminuíram em relação aos valores desses analitos quando comparados aos obtidos entre os animais do grupo controle. A bilirrubina total e direta aumentaram de forma significativa em comparação com o grupo controle. Por outro lado, foi visto um aumento no nível de ALT, embora essa

alteração não tenha sido significativa. Ao passo que os analitos como a glicose, ureia, creatinina e colesterol total não sofreram alteração em comparação aos valores de referência.

Tabela 1. Resultados dos parâmetros hematológicos de ratos Wistar tratados com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) por via oral durante 30 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle (n=10)	TG1 (n=10)
Hemácias (mm ³)	7,71 ± 0,19	7,51 ± 0,20
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	12,60 ± 0,27	13,01 ± 0,72
Hematócrito (%)	41,21 ± 0,94	39,96 ± 0,79
VCM (fL)	53,70 ± 0,81	54,49 ± 0,95
HCM (pg)	16,44 ± 0,35	18,01 ± 0,69*
CHCM (g dL ⁻³)	30,62 ± 0,26	34,09 ± 0,85*
Plaquetas (mm ³)	585,3 ± 79,87	552,9 ± 27,8

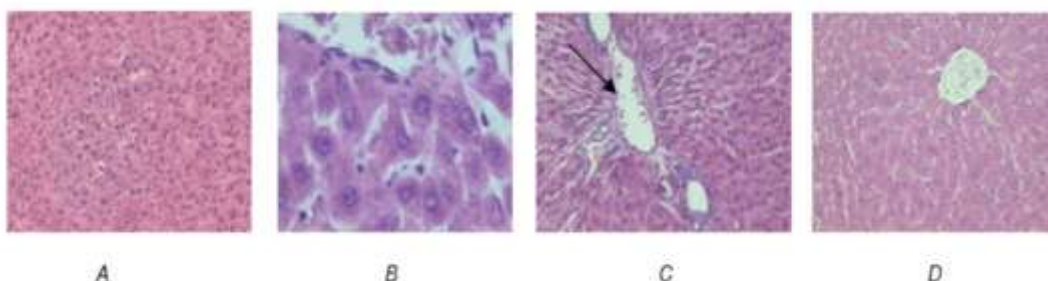
*p<0,05, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste t- Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Tabela 2. Resultados dos parâmetros bioquímicos de ratos Wistar tratados com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) por via oral durante 30 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle (n=10)	TG1 (n=10)
Glicose (mg dL ⁻¹)	149,50 ± 8,92	141,5 ± 5,42
Uréia (mg dL ⁻¹)	45,70 ± 1,55	47,14 ± 1,27
Creatinina (mg dL ⁻¹)	0,51 ± 0,06	0,41 ± 0,03
Acido úrico (mg dL ⁻¹)	9,06 ± 0,55	1,04 ± 0,18*
Triglicerídeos (mg dL ⁻¹)	71,1 ± 11,08	59,4 ± 8,23
Colesterol Total (mg dL ⁻¹)	75,60 ± 8,64	77,17 ± 9,21
AST (U mL ⁻¹)	256,20 ± 16,96	151,5 ± 14,63*
ALT (U mL ⁻¹)	77,00 ± 1,35	95,0 ± 10,76
Fosfatase alcalina (U L ⁻¹)	625,8 ± 27,21	232,1 ± 21,23*
Bilirrubina total (mg dL ⁻¹)	0,39 ± 0,06	0,80 ± 0,03*
Bilirrubina direta (mg dL ⁻¹)	0,14 ± 0,02	0,32 ± 0,01*

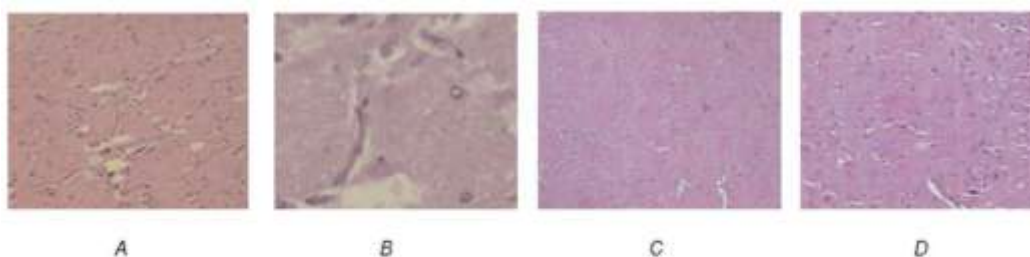
*p< 0,05, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste t- Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

A figura 1 apresenta as alterações histopatológicas no tecido hepático de ratos adultos. Na análise histopatológica do fígado pode ser verificado um efeito vascular importante e presente em todos os fragmentos avaliados. Esse efeito pode ser descrito por uma intensa congestão vascular (provavelmente por aumento da pressão), bem como pelas discretas áreas de esteatose em microgotas. No geral, a arquitetura do fígado foi detectada de forma preservada. Além disso, observa-se uma discreta poliploidia nas células hepáticas, que é comum em um órgão como o fígado, que possui enorme capacidade de regeneração. Já o grupo tratado com veículo não apresentou nenhuma alteração histológica.



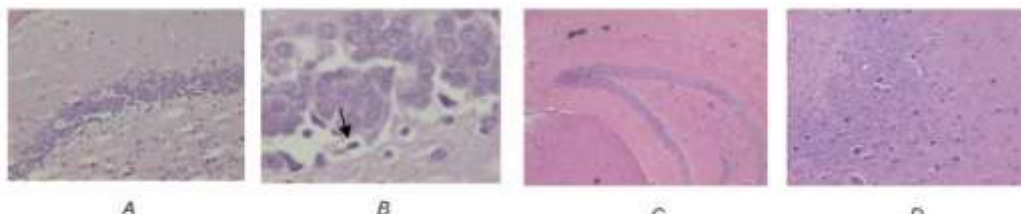
Legenda da figura 1: A, B e C - intensa congestão vascular, seta: áreas de esteatose em microgotas. D - Ausência de alterações histopatológicas no fígado de ratos adultos tratados com TG1 durante 30 dias consecutivos.

A figura 2 mostra o estudo histopatológico no corpo estriado de ratos adultos. Nesse estudo não foi observada nenhuma alteração histopatológica no corpo estriado dos ratos tratados com TG1 e veículo durante 30 dias com doses repetidas.



Legenda da figura 2: A e B - Ausência de alterações histopatológicas no corpo estriado. C e D - Alterações histopatológicas no hipocampo.

A figura 3 mostra o estudo histopatológico no hipocampo de ratos adultos. Nesse estudo foi verificado apenas no hipocampo algumas células com núcleos picnóticos. Dessa forma, o uso do TG1 não causou alterações às áreas cerebral estudadas, revelando segurança quanto ao seu uso.



Legenda da figura 3: A e B - Alterações histopatológicas no hipocampo. Seta - células com núcleos picnóticos. C e D - Ausência de alterações histopatológicas no hipocampo.

CONCLUSÃO

O tratamento agudo com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) na dose de 30 mg kg⁻¹ não alterou de forma geral o padrão comportamental dos ratos, e não produziu alterações hematológicas, e histopatológicas significativas nas áreas cerebrais e hepáticas analisadas. A redução dos níveis da AST e ALP pode sugerir até mesmo certa proteção hepática, que deverá ser melhor investigada em modelos animais de hepatotoxicidade. O aumento da bilirrubina total e direta não chega a caracterizar uma toxicidade, provavelmente apenas uma alteração fisiológica. Tanto as áreas cerebrais, como o fígado foram mantidas de forma preservadas durante o tratamento. Diante disso, é de grande importância a continuação dos estudos com TG1, vislumbrando um possível agente terapêutico no tratamento de doenças, particularmente as neurodegenerativas.

REFERÊNCIAS

- Almeida, R. N. Psicofarmacologia: fundamentos práticos. 1ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- Almeida, R. N. et al. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. Revista Brasileira de Farmacognosia, 1999; 80:72-6.
- Chaves, D. A. S. et al. Metabólitos Secundários de origem vegetal: Uma Fonte Potencial de Fármacos Antitrombóticos. Química Nova, 2010; 33:172-80.
- Costa, J. S. et al. Investigation of Biological Activities of Dichloromethane and Ethyl Acetate Fractions of *Platonia insignis* Mart. Seed. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. 2012 – in press.
- Craveiro, A. C. S. et al. Toxicidade aguda do Extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2008; 18:739-43.
- Jahn, A. I.; Günzel, P. K. H. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? Reproductive Toxicology, 1997; 11:171-78.
- Messias, J. M. et al. Lipases Microbianas: Produção, Propriedades e aplicações biotecnológicas. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, 2011; 32 (2): 213-34.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Universidade Federal do Piauí - UFPI, ao laboratório de pesquisa em neuroquímica experimental – LAPNEX pelo auxílio na operacionalização deste estudo.

CV02 - Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do nerolidol

José Damasceno Nogueira Neto¹; Oskar Almeida Silva²; Francisco Rodrigo de Azevedo Oliveira³; Damião Pergentino de Sousa⁴, Rivelilson Mendes de Freitas⁵

¹Mestrando do Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil, * scenonogueira@hotmail.com;

²Acadêmico de química do Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil, oskar_almeida@hotmail.com;

³Mestrando do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil, rodrigooliveira@hotmail.com;

⁴Professor do Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Sergipe, CEP 49100-000, Brasil. ⁵Professor do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil, rivelilson@pq.cnpq.br;

Palavras-chave: Antioxidante. Nerolidol. Óxido Nítrico. Peroxidação lipídica. Radical Hidroxila.

RESUMO

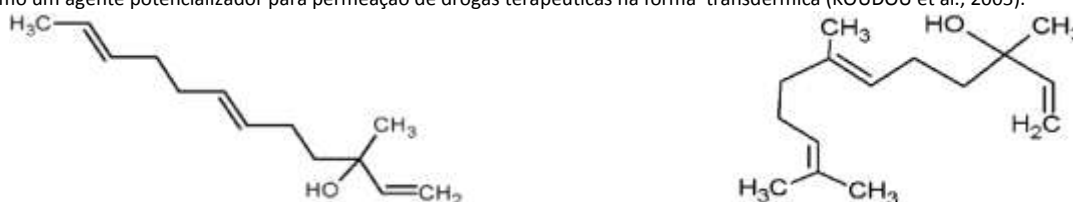
O presente estudo avaliou o potencial antioxidante do nerolidol contra a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), radical hidroxila e produção de óxido nítrico. Nerolidol (0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg/mL) preveniu a peroxidação lipídica induzida por 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH), inibindo a formação de TBARS de maneira semelhante ao composto Trolox, um análogo sintético hidrofílico do α-tocoferol, que é muito utilizado como padrão antioxidante. Além disso, o nerolidol reduziu a produção do radical hidroxila, assim como a produção

de óxido nítrico, possivelmente devido a uma propriedade antioxidante *in vitro*, um achado que pode ser explorado para a proteção de alvos moleculares *in vivo* (DNA, lipídios, carboidratos e proteínas). O nerolidol apresentou potencial antioxidante *in vitro* por meio da capacidade de remoção de radicais hidroxilas e do óxido nítrico bem como na prevenção da formação de TBARS. Estudos estão em andamento para caracterizar melhor o potencial antioxidante *in vitro* deste composto.

INTRODUÇÃO

O cérebro e outros órgãos estão expostos a radicais livres e as espécies reativas derivadas do oxigênio (EROS). Estas espécies participam de reações essenciais e são constantemente formadas podendo se tornar prejudiciais (SIES, 1993). O consequente desequilíbrio entre os sistemas antioxidante de defesa pode favorecer ao aparecimento de lesões devido ao estresse oxidativo. Tem sido relatado que em algumas situações ocorre um aumento na produção de radicais livres que ultrapassa a capacidade de reparo das defesas antioxidantes disponíveis (MANDELKER, 2008) culminando em um aumento dos níveis de peroxidação lipídica e conteúdo de nitrito (FREITAS et al., 2004; FERREIRA et al., 2009). Os radicais livres são átomos, moléculas ou íons que apresentam um elétron desemparelhado, reativo e instável, o qual, para alcançar a estabilidade, tende a se ligar a outro elétron (SOUZA; FERREIRA, 2007). Já é sabido que EROs podem estar envolvidas em muitas doenças, podendo estar associadas a vários tipos de doenças, como por exemplo, arteriosclerose (XI et al., 2007), ansiedade, depressão (LEITE et al., 2008).

O desenvolvimento de novos produtos para esta finalidade tem sido importante objeto de estudo, tendo em vista a terapêutica farmacológica atual para o desenvolvimento e produção de novos compostos. Neste sentido, vários compostos de origem vegetal encontrados em abundância na natureza têm sido estudados, dentre eles o nerolidol, um sesquiterpeno observado em diversos óleos essenciais de plantas medicinais como nerol (*Citrus aurantium* var. *Sinensis*), gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), lavanda (*Lavandula angustifolia* Miller) e capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf). O nerolidol (Figura 1) é usado como agente aromatizante pelas indústrias alimentícias e apresenta um grande interesse para a indústria de cosméticos em virtude de ser um fixador natural, sendo atualmente tem sido utilizado em testes de penetração dérmica como um agente potencializador para permeação de drogas terapêuticas na forma transdérmica (KOUDOU et al., 2005).



A - cis-3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol B - trans-3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol Figura 1: Estrutura química dos isômeros cis (A) e trans(B) do nerolidol.

MATERIAL E MÉTODOS

Drogas

As drogas utilizadas foram 2-desoxirribose, 2,2'-azobis(2-amidinopropano), reagente de Griess, peróxido de hidrogênio, tampão fosfato, nitroprussiato de sódio, TBA (ácido tiobarbitúrico), ácido tricloroacético, bem como Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxílico) e nerolidol constituído dos isômeros cis- e trans-nerolidol e com 98% de pureza foram adquiridos da Sigma Aldrich (EUA).

Avaliação do potencial antioxidante do nerolidol na remoção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este teste foi utilizado para quantificar a peroxidação lipídica (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990). Este método adaptado foi usado para medir a capacidade antioxidante do nerolidol usando gema de ovo homogeneizado como substrato rico em lipídios (GUIMARÃES et al., 2010). Os resultados foram expressos em porcentagem de TBARS formadas apenas por AAPH sozinho (controle).

Avaliação do potencial antioxidante do nerolidol na remoção de radicais hidroxila

A formação do radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) na reação de Fenton foi quantificada usando a degradação oxidativa da 2-desoxirribose (LOPES et al., 1999). Os resultados foram expressos em função do coeficiente de absorvidade molar do TBARS.

Avaliação do potencial antioxidante do nerolidol na remoção de óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico foi gerado a partir da decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio (NPS) em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4). Uma vez gerado, o NO interage com o oxigênio para produzir íons nitrito, que foram medidos pela reação de Griess (BASU; HAZRA, 2006). Os resultados foram expressos em porcentagem de nitrito formado por NPS sozinho. Os dados obtidos foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e feita análise de Variância (ANOVA) seguidos pelo teste de Dunnett ou t-Student-Newman-Keuls como post hoc teste. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Os dados foram analisados com o GraphPad Prism versão 5,01 software (1992-2007, GraphPadSoftware Inc.).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação dos efeitos antioxidantes *in vitro* do nerolidol sobre o conteúdo de nitrito formado.

Foi observado um aumento na produção de nitrito significativo de 571.59% quando comparado o grupo NPS em relação ao controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%; $p < 0,05$). Em relação à produção de nitrito, foram registradas em todas as concentrações testadas de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do nerolidol, demonstraram efeito significativo em relação ao NPS (meio de produção deste radical livre), com diminuição de 44,59, 52,20, 56,58, 59,56 e 63,28%, respectivamente ($p < 0,05$; Ilustração 2). Já o trolox (controle positivo) reduziu em 60,66% a produção de nitrito em relação ao nitroprussiato de sódio (NPS), o meio reacional. Resultado semelhante foi obtido no estudo realizado com óleo essencial da *Canarium schweinfurthii* Engl. (Burseraceae) (BLOXTON et al., 2002; KOUDOU et al., 2005). Em nossos estudos *in vitro* também foi possível determinar a concentração inibitória 50% (CI50) do nerolidol de 1,104 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra a formação do radical nitrito com margem de variação na concentração efetiva de 0,7308 a 1,667 $\mu\text{g}/\text{mL}$ com 95% de intervalo de confiança.

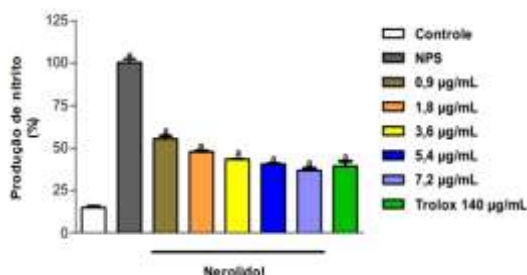


Ilustração 2: Avaliação do potencial antioxidantes in vitro do nerolidol sobre o conteúdo de nitrito. Grupo controle - Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (na ausência de uma fonte geradora de nitrito (sem nitroprussiato de sódio (NPS)); o grupo NPS reflete a produção de nitrito pela decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio, considerado 100% da produção de nitrito. O efeito de diferentes concentrações de nerolidol contra o meio reacional (contendo NPS) foi determinado pelo método de Griess. Os valores representam a média ± EPM dos experimentos em duplicata (n=5). *p<0,001 versus controle (ANOVA e t-Student-Neuman-Keuls como post hoc teste); ap<0,001 versus NPS (ANOVA e t-Student-Neuman-Keuls como post hoc teste).

Avaliação dos efeitos antioxidantes in vitro do nerolidol sobre a formação do radical hidroxila

Em relação à formação do radical hidroxila, todas as concentrações testadas de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg/mL do nerolidol, demonstraram efeito significativo em relação ao meio responsável pela produção deste radical livre, com diminuição de 40,39, 47,44, 48,41, 49,5 e 52,9%, respectivamente, em relação ao sistema (Ilustração 3). O Trolox 140 µg/mL produziu a remoção do radical hidroxila em 78,1% em relação ao sistema. Após os testes antioxidantes in vitro foi possível estabelecer uma CI50 de 3,89 µg/mL contra a formação do radical hidroxila com uma margem de variação de 2,477 a 6,11 µg/mL (intervalo de confiança de 95%).

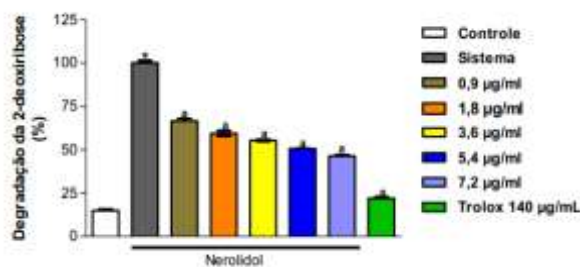


Ilustração 3: Avaliação do potencial antioxidantes in vitro do nerolidol sobre a formação do radical hidroxila. Atividade antioxidante contra o radical hidroxila quantificada usando a degradação oxidativa in vitro da 2-desossirribose, que produz malonaldeído (MDA) por condensação com ácido tiobarbitúrico (TBA). O sistema de produção do MDA corresponde a degradação da 2-desossirribose na presença do FeSO4 e H2O2. Outros grupos representam o meio reacional na presença de diferentes concentrações de nerolidol (0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg/mL). Os valores representam a média ± EPM dos experimentos em duplicata (n=5). *p<0,001 versus controle (ANOVA e t-Student-Neuman-Keuls como post hoc teste); ap<0,001 versus sistema (ANOVA e t-Student-Neuman-Keuls como post hoc teste).

Avaliação dos efeitos antioxidantes in vitro do nerolidol sobre a produção de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)

As concentrações de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg/mL do nerolidol produziram, respectivamente, uma diminuição de 63,41, 66, 67,14, 68,72 e 73,22% na produção de TBARS em relação ao AAPH (Ilustração 4). Já o trolox 140 µg/mL, controle antioxidante, causou uma diminuição de 55,59% na produção de TBARS em relação ao AAPH. Em nossos estudos in vitro pode ser verificado que a concentração inibitória 50% (CI50) do nerolidol é de aproximadamente 0,4508 µg/mL contra a formação de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) com margem de variação na concentração efetiva de 0,2538 a 0,8007 µg/mL com 95% de intervalo de confiança. Este resultado sugere que o nerolidol pode exercer um efeito antioxidante que protege as biomoléculas lipídicas essenciais para o funcionamento da membrana celular (SERAFINI et al., 2011). Resultados semelhantes foram obtidos em outro experimento com derivados do nerolidol, uma vez que demonstraram uma diminuição significativa semelhante na concentração de TBARS formado (PACÍFICO et al., 2008).

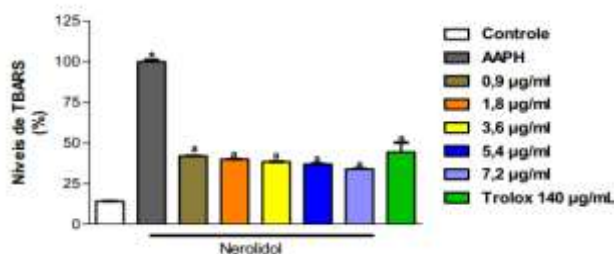


Ilustração 4: Avaliação do potencial antioxidante in vitro do nerolidol sobre a produção de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). O controle significa a peroxidação lipídica basal apenas na presença do veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%); O grupo AAPH sozinho é considerado com dano oxidativo com a produção de 100% de TBARS. Os valores representam a média ± EPM dos experimentos em duplicata (n=5). *p<0,001 versus controle (ANOVA e t-Student-Neuman-Keuls como post hoc teste); ap<0,001 versus AAPH (ANOVA e t-Student-Neuman-Keuls como post hoc teste).

CONCLUSÃO

Portanto, os resultados obtidos no presente estudo, demonstram que o nerolidol apresenta potencial antioxidante pelos métodos in vitro utilizados. Mais estudos são necessários para elucidar os possíveis mecanismos de ação que medeiam à atividade antioxidante do nerolidol in vitro.

REFERÊNCIAS

- Basu S, Hazra B. Evaluation of nitric oxide scavenging activity, in vitro and ex vivo, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. *Phytotherapy Res.* v.20; p.896-900, 2006.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth Enzymol;* v.186; p.407-21, 1990.
- Ferreira PMP, Militão GCG, Freitas RM. Lipoic acid effects on lipid peroxidation level, superoxide dismutase activity and monoamines concentration in rat hippocampus. *Neurosci Lett;* v.464:p.131-34, 2009.
- Freitas RM, Sousa FCF, Vasconcelos SMM, Viana GSB, Fonteles MMF. Pilocarpine-induced seizures in adult rats: lipid peroxidation level, nitrite formation, GABAergic and glutamatergic receptor alterations in the hippocampus, striatum and frontal cortex. *Pharmacol Biochem Beh;* v.78:p.327-32, 2004.
- Frizzo CD, Dellacassa E, Serafini LA, Cassel E. Extração Supercrítica do Óleo Essencial de Planta Nativa do Gênero Baccharis. In: XIX Interamerican congress of chemical engineering, XII congresso brasileiro de engenharia química, I brazilian congress of phase equilibrium and fluid properties for chemical process design; Águas de São Pedro – SP, 2000.

- Guimarães AG, Oliveira GF, Melo MS, Cavalcanti SC, Antonioli AR, Bonjardim LR, Silva FA, Santos JPA, Rocha RF, Moreira JCF, Araújo AA, Gelain DP, Quintans-Júnior LJ. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*; v.107: p.949-57, 2010.
- Koudou J, Abena AA, Ngaissona P, Bessiére JM. Chemical composition and pharmacological activity of essential oil of *Canarium schweinfurthii*. *Fitoterapia*; v.76: p. 700-3, 2005.
- Leite MP, Fassin JRJ, Baziloni EMF, Almeida RN, Mattei R, Leite JR. Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. *Rev Bras Farmacogn*; v.18: p.661-66, 2008.
- Lopes GKB, Schulman HM, Lima MH. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*; v.1472; p.142-52, 1999.
- Mandelker L. Cellular effects of comom antioxidants. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*; v.38:p.199-211, 2008.
- Pacifico S, Abrosca B, Golino A, Mastellone C, Piccolella S, Fiorentino A, Monaco P. Antioxidant evaluation of polyhydroxylated nerolidols from redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) leaves. *Food Science Technol*; v.41; p.1665-71, 2008.
- Reed TT. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free Radic Biol Med*; v.51; p.1302-19, 2011.
- Serafini MR, Santos RC, Guimarães AG, Santos JPA, Santos ADC, Alves IA, Gelain DP, Nogueira PCL, Quintans-Júnior LJ, Bonjardim LR, Araújo AAS. *Morinda citrifolia* Linn Leaf Extract Possesses Antioxidant Activities and Reduces Nociceptive Behavior and Leukocyte Migration. *J Med Food*; v.20; n.10; p.1-8, 2011.
- Souza JDS, Ferreira WM. O papel da vitamina e na nutrição e reprodução animal - meios de defesa contra os radicais livres. *Rev Eletr Nutr*; v.4: p.456-61, 2007.
- Xi H, Akishita M, Nagai K, Yu W, Hasegawa H, Eto M, Kozaki K, Toba K. Potent free radical scavenger, edaravone, suppresses oxidative stress-induced endothelial damage and early atherosclerosis. *Atherosclerosis*; v.191; p.281-9, 2007.

AGRADECIMENTOS

CNPq, CAPES, FAPEPI, UFPI.

CV03 - *Spray-dried*: complexo bacuri e ciclodextrina

Juliana Lima Nascimento*1(M), Antônia Maria das Graças Lopes Citó2 (PQ), Daniel Dias Arcanjo Rufino3 (D), Joaquim Soares da Costa Júnior4 (P), Márcio dos Santos Rocha5 (M), Ytallo Samuel Barros6 (IC)

1. Universidade Federal do Piauí – Mestranda em Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas
2. Universidade Federal do Piauí – Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas/ Orientador
3. Universidade federal do Piauí – Doutorado em Biotecnologia-UFPI
4. Instituto Federal do Piauí – Professor Departamento de Química-IFPI
5. Universidade Federal do Piauí – Mestre em Ciências Farmacêuticas-UFPI
6. Universidade Federal do Piauí – Bolsista PIBITI/CNPq

* Autor principal

jhu_lima@hotmail.com

Palavras-chave: *Platonia insignis* Mart.. β-ciclodextrina. Complexo de inclusão. *Spray-dried*

RESUMO

Platonia insignis Mart. (Clusiaceae) popularmente conhecida como “bacuri” tem sua origem no Pará na Ilha de Marajó, sendo encontrada também no Piauí e outros estados. A banha do bacuri é obtida do óleo extraído das sementes e possui alta porcentagem de ácidos palmítico e oléico, sendo muito utilizada na medicina popular como cicatrizante, antiinflamatória, antidiarreica, dermatites, dores de ouvido e picada de insetos. A grande maioria dos fármacos antiinflamatórios apresentam efeitos adversos e eficácia reduzida por dificuldades na biodisponibilidade do medicamento, que muitas vezes impedem o tratamento adequado da inflamação. A busca por melhora na eficácia de formulações a base desse extrato, motivou o desenvolvimento deste projeto que complexou o extrato hexânico da *Platonia insignis* Mart. com a β-ciclodextrina; através de dois métodos: pulverização a seco, obtida através do *spray-dried* e mistura física, os quais obtiveram complexação satisfatória que possibilitam uma alternativa no desenvolvimento de fitofármacos.

INTRODUÇÃO

O Brasil detém a maior diversidade biológica do mundo, contando com uma rica flora, despertando interesses de comunidades científicas internacionais para o estudo, conservação e utilização racional destes recursos (SOUZA; FELFILI, 2006). O bacurizeiro pertence à família Clusiaceae, subfamília Clusioideae, gênero *Platonia* e a espécie é classificada como *Platonia insignis* Mart. (BRAGA, 1976). É uma espécie frutífera e madeireira, com centro de origem na Amazônia Oriental Brasileira, mas precisamente no Estado do Pará. Rompendo as fronteiras brasileiras, é encontrado nas Guianas, Peru, Bolívia, Colômbia e Equador. Assume importância econômica nos Estados do Pará, Maranhão, Tocantins e Piauí, onde se concentram densas e diversificadas populações naturais, em áreas de vegetação secundária. É uma planta perene de porte médio a alto, com altura entre 15 m e 25 m, podendo atingir nos indivíduos mais desenvolvidos altura superior a 30 m e diâmetro na altura do peito (DAP) em torno de 1,00 m. O bacuri é um fruto do tamanho de uma laranja, redondo, com casca grossa e de cor amarelo-citrina, contendo polpa viscosa e muito saborosa (FONSECA, 1954).

Nos últimos anos, o bacurizeiro tem sido frequentemente citado como espécie promissora, pelas amplas possibilidades que apresenta como espécie de uso múltiplo (MORAES,1994; PRANCE, 1992; VILLACHICA, 1996) podendo vir a se constituir, em breve, em nova alternativa de cultura perene para a Amazônia. A graxa ou banha de bacuri, fabricada pela população a partir do óleo extraído das sementes é usada de forma sistemática principalmente por sua ação anti-inflamatória. Esta ação, segundo estudos anteriores (FORTES LUSTOSA,2012), deve-se principalmente a uma substância presente na banha em abundância, a Garcienilliptona, GFC (Figura 01). Outro fato relatado pela população com muita veemência é o seu uso para o tratamento de queimaduras. O óleo das sementes é usado para fazer sabão, tratar doenças de pele e fazer remédios cicatrizantes para ferimentos de animais (SANTOS-JÚNIOR ,2010; SHANLEY, MEDINA , 2005). A inflamação pode ser definida como o conjunto de alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas em resposta a estímulos agressivos ao organismo, uma vez que sua principal função é eliminar a infecção ou reparar os danos e assim retornar ao estado de homeostase (BARTON, 2008). Fármacos com ação antiinflamatória estão entre os agentes terapêuticos mais utilizados no mundo, porém apresentam algumas limitações com relação à sua potência, eficácia e efeitos adversos (PARENTE, 2001; Farmacopéia Brasileira, 4ª edição, 1996). Deste modo, há uma crescente busca por descobertas de produtos naturais com atividade antiinflamatória, reduzindo os custos dos medicamentos e com menores efeitos adversos.

O óleo da semente de bacuri, portanto, apresenta um forte potencial para ser utilizado no desenvolvimento de um fitoterápico com atividade antiinflamatória e cicatrizante.

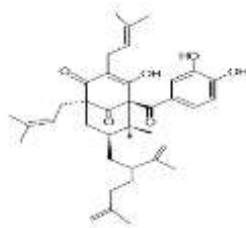


Figura 01: Estrutura química da GFC

Buscando melhoria na eficácia do produto à base do extrato, este foi incorporado à molécula de β -ciclodextrina, a fim de aumentar a biodisponibilidade do produto. As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos solúveis em água que possuem a capacidade de formar complexos de inclusão reversíveis com moléculas apolares (Figura 02). Na área farmacêutica, este excipiente funcional tem sido explorado principalmente no incremento da biodisponibilidade e estabilidade de medicamentos e na redução de seus efeitos colaterais. Também pode ser destacada sua utilização para mascarar odores e sabores desagradáveis de certos fármacos, para reduzir ou eliminar irritações oculares ou gastrointestinais, na prevenção de interações e incompatibilidades e na conversão de fármacos líquidos em produtos sólidos (PARENTE, 2001).

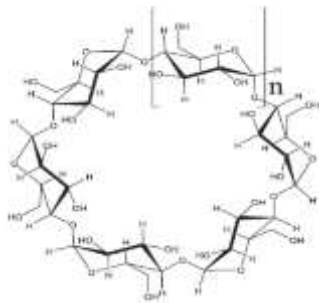


Figura 02: Estrutura da ciclodextrina

O encapsulamento molecular ocorre através da captura das moléculas hóspedes (extrato) para dentro da cavidade interna da ciclodextrina. A capacidade da ciclodextrina de formar complexos de inclusão depende da geometria da molécula hospede relacionada com a geometria da ciclodextrina e das interações termodinâmicas entre os diferentes componentes do sistema (a ciclodextrina, solvente, molécula hospede) (K.G., 2005). Os complexos de inclusão podem ser produzidos por diferentes métodos. A seleção do método apropriado depende das propriedades do composto ativo, a cinética de formação de complexos, etc. Entre os vários métodos de preparação, a técnica de suspensão é a mais utilizada. Suspensão de ciclodextrina (frio, quente, neutra ou ácida), em conjunto diretamente com a molécula hospede ou a sua solução intensamente agitada. Após atingir o equilíbrio, a água é removida ou por meio de filtração e de evaporação, ou por outras técnicas mais convenientes, por exemplo, liofilização, secagem por pulverização (E.M., 2004).

MATERIAL E MÉTODOS

O material botânico, semente do bacuri, foi obtido na Central de Abastecimento do Piauí-CEAPI, localizada em Teresina-Piauí, no período de março de 2012. As sementes dos frutos foram extraídas e secas a temperatura de 55 °C e moídas. Duzentos e vinte e nove gramas (229 g) do pó seco foram extraídos com hexano em Soxhlet durante 8 horas. O extrato foi concentrado a vácuo em rotaevaporador.. Em seguida, foi realizado em triplicata o doseamento da substância marcadora, GFC, utilizando metodologia similar a reportada na Farmacopéia Brasileira, 4ª edição, 1996, para a determinação do paracetamol. Foi utilizado espectrofotômetro Varian Cary 300 na região do ultravioleta visível (UV-vis) na faixa de 200 a 400 nm. 4 mg de extrato hexânico foi dissolvido em 10 ml de etanol, sendo realizado o espectro de varredura em células de quartzo com percurso óptico de 1 cm, volume equivalente a 4 ml a temperatura ambiente, para determinação do (Amáx). Foi utilizado como referência a substância GFC isolada e purificada, através de cromatografia em coluna de gel de sílica do extrato hexânico das sementes de *P. insignis* Mart. e identificada por ressonância magnética nuclear de Hidrogênio e Carbono e espectrometria de massas (COSTA JÚNIOR, 2011)

O complexo de inclusão foi realizado tanto por pulverização a seco pelo método de spray-dried quanto por mistura física. Na primeira metodologia foi utilizado 2,09 g do extrato hexânico solubilizado a 20 ml de álcool etílico. A esta solução, foi acrescentado 8 g da β -ciclodextrina. Homogeneizou-se toda a solução em um agitador mecânico por 30 minutos. Posteriormente, foi injetada no aparelho de spray-dried de bancada, B-290 BUCHI; com uma pressão de entrada de 0,9 Bar, com um fluxo da amostra de 7 ml/min., temperatura de entrada de 105 °C, temperatura de saída 62 °C e temperatura da amostra de 60 °C. Em seguida, foi realizado a complexação extrato-ciclodextrina por mistura física, onde 2,02 g do extrato foram misturados a 8,00 g da β -ciclodextrina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a extração hexânica a banha de bacuri foi obtida com rendimento total de 42,98%. O teor de GFC da banha de bacuri foi determinado utilizando a curva analítica da GFC (substância de referência) e a equação da reta. Através do método de espectrofotometria, foi determinado, em triplicata, que a concentração de GFC no extrato foi de $7,7 \pm 0,38\%$, sendo a GFC uma das principais substâncias prováveis com ação anti-inflamatória. Este resultado indica uma provável atividade antiinflamatória satisfatória neste extrato, visto que, em estudos anteriores (FORTES LUSTOSA, 2012) foi obtido eficácia em medicamentos a base deste extrato no tratamento do processo inflamatório, utilizando esta substância como marcadora, sendo que o doseamento apresentou uma concentração inferior da Garcinielliptona comparada ao que foi obtido neste projeto. O processo de complexação por spray-dried poderá, portanto, permitir uma melhora na eficácia do fitofármaco obtido através do extrato hexânico de *Platonia insignis* Mart., uma vez que a complexação de um composto na ciclodextrina apresenta vantagens como aumento da biodisponibilidade, redução de efeitos colaterais, diminuição da dose administrada, e conseqüentemente, melhora na ação do fitofármaco.

CONCLUSÃO

O extrato hexânico das sementes de *Platonia insignis* Mart. Apresentou razoável teor da substância marcadora GFC, sugerindo provável atividade antiinflamatória, uma vez que esta substância deve ser a principal responsável por esta atividade. Aliado a isso, deve haver uma melhora na atividade de um provável fitofármaco obtido a partir da fração hexânica das sementes de *Platonia insignis* Mart. em complexação com a molécula de β -ciclodextrina, possibilitando o desenvolvimento de um fitoterápico como alternativa promissora no tratamento de inúmeras enfermidades.

REFERÊNCIAS

- BARTON, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 118, n. 2, p. 413-420, 2008.
- BRAGA, R. Plantas do nordeste especialmente do Ceará. Mossoró: ESAM, 1976. 540 p
- COSTA JÚNIOR, J. S.; FERRAZ, A. B. F.; FILHO, B. A. B.; FEITOSA, C. M.; CITÓ, A. M. G. L.; FREITAS, R. M.; SAFFI, J. Evaluation of antioxidant effects in vitro of *Garcinielliptona FC (GFC)* isolated from *Platonia insignis* Mart. *Journal of Medicinal Plants Research.*, v. 5, n. 2, 293-299 p., 2011.
- E. M. Martin Del Valle, *Process Biochem.*, 39, 1033, 2004. -FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1996. pt.2, p.16.1
- FIORUCCI, S.; et al. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? *Biomechanical Pharmacology*, v. 62, p. 1433, 2001.
- FONSECA, E. T. da. Frutas do Brasil. Rio de Janeiro: _____. p. 77-78, 1954.
- FORTES LUSTOSA, A.K. Avaliação do potencial farmacológico da manteiga de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e de forma farmacêutica de uso tópico com ela desenvolvida. Teresina:PI, 2012. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas-PPGCF, UFPI, Teresina, 2012.
- K. G. H. Desai and H. J. Park, *Dry Technol.*, 23 1361.9, 2005
- LÍVIA, C.L.; SÁ, B.; CUNHA, F. Ciclodextrina: Importante excipiente funcional. *Latin American Journal of Pharmacy*, 2008.
- MORAES, V.H. de F.; et al. Native fruit species of economic potential from brazilian Amazon. *Angewandte Botanik*, v.68, p. 4752, 1994.
- PARENTE, L. Pros and cons of selective inhibition of cyclooxygenase-2 versus dual lipoxygenase/cyclooxygenase inhibition: is two better than one? *The Journal of Rheumatology*, v. 28, p. 2375-2382, 2001.
- PRANCE, G.T. The resource of useful tree species: identificação of priorities for domestication: Amazonian tree diversity and the potential for supply of non timber forest products. In: LEAKEY, R.R.B.; NEWTON, A.C. Tropical trees: the potential for domestication and the rebuilding of forest resources the proceedings of a Conference as part of the IUFRO Centennial year. London: IUFRO/Edinburgh Centre for Tropical Forests/ITE, p.7-15 (ITE Symposium, 29. ECTF Symposium, 1).1992.
- SANTOS-JÚNIOR, R. Q.; et al. Estudo histológico da cicatrização de feridas cutâneas utilizando a banha de bacuri (*Platonia insignis* Mart.). *ConScientiae Saúde*, v. 9, n. 4, p. 575-581, 2010.
- SHANLEY, P., MEDINA, G. Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica. Pará: Belém. 2005, p. 54. -SOUZA, C.D.; FELFILI, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, Brasil. *Acta Botanica Brasílica*, v. 20, n. 1, p. 135-145, 2006.
- VILLACHICA, H. et al. Frutales y hortalizas promissoras de la Amazônia. Lima: Tratado de Cooperación Amazônica. Secretaria Pró-Tempore, (Publicaciones, 44). p. 152-156, 1996.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos a Universidade Federal do Piauí-UFPI, Instituto Federal do Piauí-IFPI e a todos que contribuíram neste projeto.

CV04 - Pensamento do ciclo de vida e os plásticos

Elaine Aparecida da Silva^{1*} (Bolsista CAPES), José Machado Moita Neto² (Orientador)

1. Universidade Federal do Piauí – Doutoranda em Desenvolvimento e Meio Ambiente
2. Universidade Federal do Piauí – Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente elaine@ufpi.edu.br

Palavras-chave: Avaliação do Ciclo de Vida. Indústria de Plásticos. Reciclagem.

RESUMO

O Pensamento no Ciclo de Vida está associado à ideia de avaliar, de forma global, aspectos ambientais, sociais e econômicos correspondentes a produtos, processos e serviços e com isso identificar oportunidades de melhorar o seu desempenho. Uma das maneiras de aplicá-lo, considerando os aspectos ambientais, é através da metodologia Avaliação do Ciclo de Vida (ACV). Estudos de ACV compreendem o ciclo de vida completo de um produto, desde a extração e processamento de matérias-primas até a destinação final, por exemplo. A reciclagem é uma possibilidade de ampliar o aproveitamento de um material que está no fim de sua vida útil. Contudo, muitos aspectos devem ser considerados ao avaliar os reais impactos dessa prática ao ambiente. No caso dos plásticos, a reciclagem pode demandar um maior de fluxo de matéria e energia do que o seu desenvolvimento inicial. Dessa forma, o objetivo desse trabalho é avaliar os impactos ambientais gerados durante o ciclo de vida de sacolas de polietileno e de polietileno reciclado através da metodologia de Avaliação do Ciclo de Vida (baseada nas normas ABNT NBR ISO 14040 e 14044) e desenvolver uma metodologia simplificada que possa ser utilizada pelas indústrias de pequeno e médio porte e seja harmonizada qualitativa e quantitativamente com as normas brasileiras.

INTRODUÇÃO

Os problemas ambientais são cada vez mais divulgados e, conseqüentemente, deixaram de ser abordados somente por especialistas para ser refletidos e considerados por toda a sociedade. Diante disso, torna-se necessário desenvolver e tornar efetiva a utilização de mecanismos que auxiliem a compreensão dos impactos ambientais associados ao que consumimos, tais como a Avaliação do Ciclo de Vida (ACV). A aplicação dessa metodologia parte de um conceito mais amplo, que é o do Pensamento do Ciclo de Vida, onde é feita uma abordagem global sobre o ciclo de vida de processos, produtos e atividades.

A ACV ou *Life Cycle Assessment (LCA)*, como é conhecida mundialmente, é definida como a “compilação e avaliação das entradas, saídas e dos impactos ambientais potenciais de um sistema de produto ao longo do seu ciclo de vida” (ABNT NBR ISO 14040, 2009). Muitos nomes têm sido utilizados para esse conceito: eco-equilíbrio/ecuilibrio ecológico (Alemanha, Suíça, Áustria e Japão), análise do perfil dos recursos e ambiente (Estados Unidos), perfil ambiental e avaliação do berço ao túmulo (ROY et al., 2009).

A estrutura metodológica da ACV é padronizada pela *International Organization for Standardization (ISO)*, da série ISO 14000 e as suas similares brasileiras ABNT/ISO são:

1. ABNT NBR ISO 14.040:2009 – Gestão Ambiental – Avaliação do ciclo de vida – Princípios e estrutura;
2. ABNT NBR ISO 14.044:2009 – Gestão Ambiental – Avaliação do ciclo de vida – Requisitos e orientações.

Mesmo os cidadãos bem informados encontram limitações para conhecer os impactos ambientais que antecedem e sucedem o consumo dos produtos e serviços que utilizam. Dessa maneira, a vantagem da ACV entre as demais metodologias e técnicas de gestão ambiental é que esse tipo de estudo pode ser compreendido da fase de retirada de matéria-prima da natureza à destinação pós-consumo (berço ao túmulo). Sendo assim, os seus resultados podem indicar ações que resultem na melhoria da qualidade ambiental. Arvanitoyannis (2008) afirma que a ACV pode ser ferramenta para aqueles que gostariam de fazer escolhas ambientalmente adequadas; pois, frequentemente, essa avaliação fornece informações confiáveis.

A aplicação da ACV é, atualmente, voluntária. As empresas têm aderido a sua utilização como uma estratégia de negócio para mercados que são cada vez mais exigentes quanto ao atendimento dos princípios da sustentabilidade. Outro motivador é a importância do atendimento às

exigências da legislação ambiental.

No Brasil, o termo “ciclo de vida” foi citado pela primeira vez na Lei nº 12.305/2010, que institui a Política Nacional dos Resíduos Sólidos (PNRS), sendo definido como a “série de etapas que envolvem o desenvolvimento do produto, a obtenção de matérias-primas e insumos, o processo produtivo, o consumo e a disposição final” (Brasil, 2010). Na referida lei, todos os envolvidos na cadeia produtiva, de negócios e de consumo são responsabilizados compartilhadamente pelo ciclo de vida dos produtos.

A mesma lei traz a obrigatoriedade de que, a partir de 2014, somente os rejeitos (materiais que não tem possibilidade de recuperação e tratamento) sejam encaminhados para aterros sanitários. Logo, para os resíduos sólidos deverão ser encontradas alternativas com a finalidade de reduzir a demanda por matérias-primas e evitar que sejam descartados resíduos que ainda possuem possibilidade de reaproveitamento.

Uma parcela substancial dos resíduos gerados pela sociedade civil são os plásticos. Sua diversidade, difícil degradação no ambiente e crescente aumento no consumo tem mobilizado a comunidade científica e a sociedade na construção de alternativas de reaproveitamento deste material pós-descarte. A importância dos plásticos para a sociedade atual não permite vislumbrar a abolição de seu uso. Algumas de suas aplicações em saneamento e saúde, por exemplo, não encontram materiais melhores, mesmo ambientalmente. Inclusive, o consumo aparente per capita de resinas termoplásticas é adotado como um indicador de qualidade de vida (ABDI, 2008).

De acordo com a Associação Brasileira de Desenvolvimento Industrial - ABDI (2009), os tipos de polímeros mais consumidos são os polietilenos, polipropilenos, poli (cloreto de vinila), poliestirenos, poliésteres e poliuretanos. Grande parte dos plásticos transformados pela indústria é destinada ao setor de embalagens, que por terem baixo tempo de ciclo de vida e, portanto, grande descartabilidade, logo se transformam em resíduos sólidos, configurando uma das principais preocupações ambientais da atualidade.

Na PNRS não são apontadas alternativas específicas para todos os tipos de resíduos sólidos. Apenas alguns setores estão obrigados a estruturar a logística reversa para reaproveitamento dos resíduos na própria cadeia produtiva, em outras cadeias produtivas, tratamento ou disposição final ambientalmente adequada (agrotóxicos, seus resíduos e embalagens; pilhas e baterias; pneus; óleos lubrificantes, seus resíduos e embalagens; lâmpadas fluorescentes, de vapor de sódio e mercúrio de luz mista; produtos eletroeletrônicos e seus componentes). Nos § 1º e 2º do art. 33, são apontados essa obrigatoriedade e fica claro que o sistema previsto deve ser estendido a produtos comercializados em embalagens plásticas, metálicas ou de vidro, e aos demais produtos e embalagens, considerando a viabilidade técnica e econômica da logística reversa, bem como o grau e a extensão do impacto à saúde pública e ao meio ambiente dos resíduos gerados (BRASIL, 2010).

No caso dos resíduos plásticos, dentre as possibilidades disponíveis, está a reciclagem secundária ou mecânica, que consiste na reciclagem do plástico pós-consumo. Pesquisa anterior (Silva e Moita Neto, 2011) permitiu verificar o desenvolvimento dessa prática em indústrias de Teresina e identificar quais fatores facilitam e dificultam o estabelecimento da logística reversa no setor industrial.

Nas indústrias de plásticos visitadas, a matéria-prima virgem é comprada de outros estados (Bahia, Recife, São Paulo e Rio Grande do Sul) para a produção de embalagens e o filme de polietileno pós-consumo, comprado de sucateiros de Teresina, é reciclado e transformado em sacolas. A limpeza e transformação do filme pós-consumo em resina reciclada e, posteriormente, em embalagem através do processo de extrusão são realizadas nas próprias indústrias (SILVA e MOITA NETO, 2011).

Em geral, avalia-se que o uso de material reciclado traz mais respeito ao ambiente. Uma razão para isso é que não há retirada de nova matéria-prima da natureza. No entanto, outros fatores como a quantidade de água e energia utilizada para realizar a limpeza e transformação desses materiais também devem ser considerados. Diante disso, o objetivo desse trabalho é avaliar o desempenho ambiental de sacolas plásticas de polietileno obtidas a partir de resinas virgens e de resinas recicladas através da metodologia ACV; além de propor uma metodologia simplificada que facilite a disseminação desta importante ferramenta ambiental.

O trabalho “Pensamento do ciclo de vida e os plásticos” pretende investigar ainda se a reciclagem de polietileno é a melhor opção para o município de Teresina diante das atuais condicionantes econômicas, sociais, ambientais, jurídicas e tecnológicas. Vale considerar que todos esses fatores compreendem e ultrapassam o tripé da sustentabilidade (Ambiental, Social, Econômico) ou Triple Bottom Line (TBL).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram adquiridas as normas relativas à ACV (ABNT NBR ISO 14040:2009 e 14044:2009) e a licença gratuita e provisória da versão educacional do software GaBi – Ganzheitlichen Bilanzierung (Engenharia do Ciclo de Vida) da PE Internacional, com validade até setembro de 2013. O software GaBi é uma ferramenta simplificada para a completa avaliação do ciclo de vida.

De acordo com as normas ABNT NBR ISO 14040:2009 e 14044:2009, a ACV é desenvolvida em quatro fases: (1) definição de objetivo/escopo, (2) análise de inventário, (3) avaliação de impacto e (4) interpretação. Para facilitar a coleta de dados foi elaborado um template com todos os elementos das normas.

Os dados apresentados a seguir correspondem à fase de definição de objetivo e escopo:

- Objetivo do estudo: comparar o desempenho ambiental de sacolas de polietileno tipo camiseta obtidas a partir de matéria-prima virgem e reciclada a fim de identificar a carga ambiental de cada uma.
- Unidade funcional: 1000 sacolas de polietileno e polietileno reciclado.
- Fronteiras do sistema: compreende as atividades de aquisição de matéria-prima, produção, uso e destino final das sacolas. Tal sistema é classificado como cradle to grave (do berço ao túmulo), mas poderá ser redefinido ao longo do estudo, conforme a disponibilidade de informações para realizar uma pesquisa consistente.
- Tipos de dados: os dados primários serão coletados nas indústrias de Teresina e os secundários, através de revisão de literatura. Estes últimos correspondem às informações de produção da resina de polietileno virgem.
- Cobertura temporal: os dados estão sendo coletados desde junho de 2012 com previsão de término em maio de 2013.

Ainda serão definidos os procedimentos de alocação; categorias de impactos relevantes para a região; metodologia de avaliação de impacto e interpretação subsequente a ser usada; requisito dos dados; suposições; limitações; requisitos da qualidade dos dados iniciais; tipo de análise crítica, se aplicável; e tipo e formato do relatório requerido para o estudo.

Partindo da relação das indústrias que utilizam o polietileno como matéria-prima principal em seus processos, iniciou-se a fase de inventário, em que é feita a coleta de dados e procedimentos de cálculo para quantificar as entradas e as saídas pertinentes do sistema estudado.

Na fase de avaliação dos impactos ambientais serão utilizados os resultados da análise do inventário e incluídos elementos como: correlação de dados de inventário por categorias de impacto (classificação), modelagem dos dados de inventário dentro das categorias de impacto (caracterização) e possível agregação dos resultados em casos muito específicos e somente quando significativos (ponderação) (ABNT NBR ISO 14040, 2009).

A última fase, de interpretação dos resultados, é um procedimento para identificar, qualificar, verificar, avaliar, estruturar e conferir confiança à informação contida nos resultados da análise de inventário e/ou da avaliação de impactos ambientais. Nesta fase, serão identificados os aspectos ambientais mais relevantes e apresentadas algumas recomendações e conclusões (ABNT NBR ISO 14040, 2009).

RESULTADOS ESPERADOS

A investigação do ciclo de vida das sacolas de polietileno e de polietileno reciclado, baseada nas normas ABNT NBR ISO 14040 e 14044 (2009) permitirá:

- O conhecimento dos fluxos de matéria e energia dos dois processos de produção;

- A identificação e avaliação dos impactos ambientais associados à produção, uso e destino final de artefatos a partir de matéria-prima virgem e reciclada;
- A identificação das categorias de impacto mais relevantes para a região;
- O conhecimento dos cenários existentes e, também, a proposição de novos cenários visando à melhoria do desempenho ambiental dos produtos na fase de produção, uso e destino final;
- A proposição de uma metodologia simplificada de ACV, que esteja dentro das possibilidades de custos e utilização pelas indústrias de pequeno e médio porte e seja harmonizada qualitativa e quantitativamente com as normas brasileiras, visando a sua disseminação.

CONCLUSÃO

Além de realizar a avaliação do ciclo de vida de embalagens de resina virgem e reciclada, serão apontadas a possibilidade de reutilização e de novas tentativas de reciclagem (downcycling) para ambos e de cenários diferentes de descarte desses materiais, com a finalidade de apontar o cenário mais favorável ambiental e economicamente.

O maior desafio é desenvolver e tornar efetiva a utilização de uma ACV simplificada que esteja dentro das possibilidades de custos e de utilização das indústrias de pequeno e médio porte e esteja harmonizada com a metodologia existente. Isso porque, elas representam a realidade da maioria das indústrias brasileiras e estão entre as que mais impactam negativamente o meio ambiente, por não terem colaboradores qualificados para as questões ambientais, falta de fiscalização e de incentivos do governo para tornarem os seus processos sustentáveis.

REFERÊNCIAS

- ABDI. Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. Panorama setorial: plásticos. Brasília: Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2008.
- _____. Caracterização da cadeia petroquímica e da transformação de plásticos. São Paulo: Copacabana Consultoria e Treinamento, 2009.
- ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO 14040: Gestão ambiental: Avaliação do ciclo de vida: Princípios e estrutura. Rio de Janeiro, 2009.
- _____. NBR ISO 14044: Gestão ambiental: Avaliação do ciclo de vida: Requisitos e orientações. Rio de Janeiro, 2009.
- ARVANITTOYANNIS, I. S. ISO 14040: Life cycle assessment (LCA) – principles and guidelines. In: Waste management for the food industries. Amsterdam: Academic Press, p. 97-126, 2008.
- BRASIL. Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/12305.htm. Acesso em: 23 out. 2012.
- ROY, P., NEI, D., ORIKASA, T., XU, Q., OKADOME, H., NAKAMURA, N., SHIINA, T. A review of life cycle assessment (LCA) on some food products. Journal of Food Engineering, Tsukuba, v. 90, n.1, p. 1-10, 2009.
- SILVA, E. A. da; MOITA NETO, J. M. Logística reversa nas indústrias de plásticos de Teresina-PI: um estudo de viabilidade. Polímeros, São Carlos, v. 21, n. 3, p. 246-251, 2011.

AGRADECIMENTOS

Elaine Aparecida da Silva agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida que está ajudando na realização deste trabalho.

CV05 - Acupuntura auricular no tratamento de pessoas com sintomatologia do estresse

Lívia Betania da Costa ^{1*} (IC), Nayra Lisbeth Ferreira Lima¹ (IC), Osmar Ferreira da Silva Filho² (PQ)

1. Faculdade Aliança – Curso de Bacharelado em Biomedicina
2. Faculdade Aliança – Professor do Curso de Bacharelado em Biomedicina

* Autor principal

liviabetania_costa@hotmail.com

Palavras-chave: Estresse. Medicina Tradicional Chinesa. Acupuntura Auricular.

RESUMO

O estresse é considerado como uma resposta a um conjunto de fatores que provocam desordens ou conflitos ao indivíduo, desgastando a saúde física e mental de milhões de brasileiros. Para a Medicina Tradicional Chinesa (MTC) o corpo humano é um organismo integral, onde todos os órgãos se relacionam entre si, concepção esta que difere da Medicina Ocidental. Dentro da MTC encontramos a acupuntura auricular como terapia complementar que utiliza o pavilhão auricular como forma de tratamento nas enfermidades físicas e psíquicas, estimulando pontos de reflexo que correspondem aos pontos vitais do indivíduo. O presente estudo objetivou verificar a eficácia da acupuntura auricular na redução da sintomatologia do estresse, em 20 voluntários adultos que foram selecionados por um questionário e se enquadraram nos critérios de inclusão. Estes foram submetidos a 06 sessões de acupuntura auricular, com um intervalo de quatro dias. Após o tratamento os indivíduos foram reavaliados com o mesmo questionário pré - tratamento. Os resultados gerais mostraram que dos 20 participantes 85% obtiveram uma melhora significativa e 15% continuaram a sentir alguns dos sintomas que circundam o estresse. Conclui – se que o tratamento com acupuntura auricular foi útil na redução da sintomatologia do estresse, podendo ser observado seus efeitos imediatos.

INTRODUÇÃO

O termo estresse foi utilizado pela primeira vez na área de saúde em 1936 pelo médico endocrinologista Selye, para determinar um conjunto de reações do organismo a situações diversas como luta ou fuga, distúrbio no sistema digestivo, hipertensão, cansaço físico. Selye retratou que o estresse seria oriundo de processos fisiológicos podendo ser de natureza física, química, biológica ou psicossocial (RODRIGUES; GASPARINI, 1992). Na visão da medicina tradicional chinesa, o estresse é relacionado com os fatores de estilo de vida se correlacionando com as compensações da separação do self superior (energia de equilíbrio, entre o ser humano e a natureza). Por exemplo, excesso de trabalho mental pode danificar o baço; excesso de sexo pode deteriorar os rins e falta de exercício pode resultar em Deficiência e Estagnação de energia (ROSS, 2003).

De acordo com Yamamura (2001), a Acupuntura Auricular é uma técnica muito conhecida e praticada no ocidente, tendo como objetivo primordial a harmonização dos Zang/Fu (órgãos e vísceras) por meios de estímulos de pontos distribuídos em todo pavilhão auricular, equilibrando o Yin e o Yang dos órgãos e vísceras. Ao se efetuar a sensibilização desses pontos com agulhas de acupuntura o cérebro recebe um impulso que desencadeia uma série de fenômenos físicos, relacionados com a área do corpo, produzindo a cura (SOUZA, 2007).

No entanto, este estudo objetivou na realização do tratamento da sintomatologia do estresse. Contribuindo assim com resultados para que possam ser utilizados na divulgação e aplicação de abordagens terapêuticas complementares, em especial a acupuntura auricular, no tratamento de indivíduos estressados.

MATERIAL E MÉTODOS

Tratou-se de uma pesquisa de natureza quantitativa e qualitativa, visto que será utilizado um estudo clínico com análise de intervenção terapêutica pré e pós - tratamento. De acordo com Rodrigues (2007), uma pesquisa é de natureza quantitativa quando se tem necessidade de obtenção de maiores informações sobre o objetivo de conferir hipóteses, abordando várias técnicas de coletas de dados, como por exemplo, entrevistas, gráficos, tabelas e outros, que utilizem dados estatísticos. Foi utilizada uma abordagem qualitativa, por julgar que este estudo necessite de dados subjetivos, relacionados ao contexto social dos sujeitos que vivenciam a realidade proposta, ou seja, que estão mais suscetíveis à exposição de eventuais situações que o exponha a fatores estressantes (NEVES, 1996).

Este estudo foi realizado após aprovação em comitê de Ética e Pesquisa da UESPI n.º 093/11. Durante os meses de Novembro e Dezembro de 2011, atendeu-se 29 pacientes selecionáveis através de questionário, onde 20 apresentavam com a sintomatologia do estresse. Após assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, e informados dos procedimentos utilizados no tratamento. O tratamento foi realizado sobre supervisão do orientador, onde realizou-se anamnese verificando pulsologia, inspeção da língua e pavilhão auricular, com auxílio do apalpador de pontos atingindo o diagnóstico energético de cada indivíduo. Iniciou-se a punção realizando antissepsia da orelha com algodão e álcool 70%. Utilizou-se agulhas permanentes e/ou sementes de mostarda, dependendo do diagnóstico de cada paciente. Este procedimento foi repetido por seis atendimentos com intervalo de quatro dias entre as sessões.

As agulhas utilizadas foram estéreis e descartáveis, registradas no Ministério da Saúde sob o registro 1039038-0001, de acordo com os preceitos de biossegurança na acupuntura. As agulhas permanentes foram fixadas com microporo, inseridos nos pontos selecionados para tratamento, de tal modo a permanecer na orelha por um período de quatro dias até a próxima sessão. O mesmo procedimento foi utilizado nas sementes de mostarda, sendo que o próprio paciente estimulou as sementes com a ponta dos dedos fazendo uma leve pressão nos pontos. Os pontos de escolha para realização deste estudo foram: Shenmen, Rim, Simpático, Baço, Tronco Cerebral, Sanjiao e Ansiedade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 20 selecionados para a pesquisa apresentou-se uma amostra bastante variada, não havendo uma seleção por sexo, idade ou condições sócio econômicas. A totalidade dos participantes se queixava de dores na cabeça e coluna, sendo que 90% desses indivíduos se queixavam de ansiedade e ainda outras queixas demonstradas na tabela 1 consideradas importantes. Os dados foram trabalhados em hipóteses, onde foi utilizado o método estatístico qui-quadrado para calcular a eficiência da pesquisa, partindo do pressuposto que H0 o tratamento não é eficiente e que H1 o tratamento é eficiente.

A tabela 1 demonstra o resultado da pesquisa antes e pós - tratamento, indicando a porcentagem de melhora dos indivíduos que se enquadram na sintomatologia do estresse, sinais como suor em excesso, Insônia, ansiedade, disfunções gastrointestinais, dores de coluna e dores de cabeça. Dos 20 pacientes, 50% (10 pacientes) apresentavam Suor em excesso antes do tratamento, após o tratamento com acupuntura auricular houve uma melhora significativa de 60% no quadro dos pacientes.

De acordo com AUTEROCHÉ; NAVAILH (1992) o suor em excesso indica uma deficiência de Qi do pulmão, este órgão é responsável pelo comando da respiração, governar o Qi, dirigir a difusão – purificação – descida, além de regular a via da água. O pulmão é um órgão que segundo a MTC se encontra ligado à pele, com a deficiência da energia circulante os poros cutâneos se abrem provocando assim uma transpiração excessiva e espontânea (MACIOCIA, 2007).

De acordo com o gráfico 01, dos 20 pacientes participantes da pesquisa 14 pacientes (70%) apresentavam insônia antes do tratamento. Estes pacientes apresentavam picos variados de insônia como mostra o gráfico acima, sendo que 28,5% (04 pacientes) apresentavam insônia entre 22:00 e 00:00h, 57,1% (08 pacientes) apresentavam insônia entre 00:00 e 03:00h e 14,3% (02 pacientes) apresentavam insônia entre 03:00 e 05:00h. Após o tratamento somente 02 pacientes ainda apresentavam insônia, utilizando o teste qui-quadrado observou-se uma melhora de 85% como demonstra a tabela 01.

Tabela 01: Queixas demonstradas pelos voluntários consideradas importantes antes e depois do tratamento com acupuntura auricular.

Sintomas	Tratamento		
	Antes	Após	Redução (%)
Suor em Excesso	10	4	60,0*
Insônia	14	2	85,7*
Ansiedade	18	4	77,7*
Disfunções Gastrointestinais	12	3	75,0*
Dores na Coluna	20	4	80,0*
Dores de Cabeça	20	2	90,0*

* Redução significativa teste qui-quadrado (p<0,05)

Fonte: Autoras

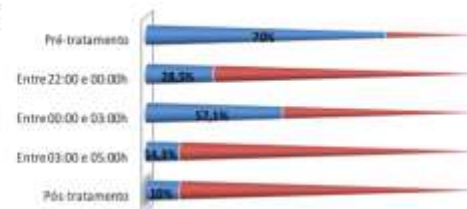


GRÁFICO 01: Predominância da Insônia Pré-tratamento e horários de pico em pacientes acometidos pelo estresse e Pós-tratamento destes pacientes submetidos ao tratamento com acupuntura auricular.

Fonte: Autoras.

Para Maciocia (2007) a insônia está diretamente ligada com a deficiência de energia do baço, fígado e coração. A deficiência ou insuficiência do sangue do coração leva ao empobrecimento do organismo em nutrientes expressando-se em insônia, acontece que o Shen (energia vital) não permanece mais na sua moradia causando insônia. A Deficiência do Sangue normalmente origina-se da deficiência do Qi do Baço, uma vez que o Baço é o responsável pela produção do sangue, se o sangue estiver deficiente afetará o baço e o coração no controle da mente e do pensamento afetando a memória. Essa deficiência indica a sensação de irritabilidade mental e intranquilidade originada da def. de Yin do coração levando o indivíduo a ter insônia ou acordar duas vezes à noite levando uma demora no adormecer (GIAPONESI; LEÃO, 2007). De acordo com a Medicina Tradicional Chinesa a insônia ocasionada entre 00:00h e 03:00h, maior pico como mostra o gráfico 1, corresponde ao horário de energia no fígado. O que nos faz lembrar a sequência de geração e controle citada na figura 02, na qual nos mostra as relações entre os cinco elementos para manter o equilíbrio do corpo e da mente. Quando estimulamos o auriculoponto fígado consequentemente acalmou-se o elemento madeira, equilibrando o fluxo de sangue do fígado e por consequência o do coração refletindo no sono e sonhos do indivíduo (MACCIOCIA, 2007).

Dos 20 pacientes antes do tratamento com acupuntura auricular 90% (18 pacientes) apresentavam ansiedade. E após o tratamento somente 20% (04 pacientes) ainda apresentavam-se ansiosos, a tabela 1 mostra uma redução no quadro da ansiedade de 77.7% aos pacientes submetidos à acupuntura auricular.

A principal causa da ansiedade ocorre pelo trabalho excessivo, onde a deficiência de Yin gera calor fazendo com que o indivíduo aparentemente possa apresentar-se ágil, ativo e alegre, porém pode estar sofrendo inevitavelmente de ansiedade descontrolada (GIAPONESI; LEÃO, 2007). Ao estimularmos os pontos auriculares rim e fígado, conseguimos equilibrar as polaridades (YIN/YANG), restabelecendo a energia nos órgãos tratados e devolvendo o equilíbrio mental aos sujeitos da pesquisa.

Antes do tratamento 60% (12) da totalidade de pacientes apresentavam alguma disfunção gastrointestinal, descritas: 25% (05) apresentavam gastrite e 35% (07) constipação. Após o tratamento somente 15% (03) ainda apresentavam sintomas gastrointestinais. Constipação:

Deficiência de Yin do estômago. Quando o yin do estômago está deficiente o estômago deixa de produzir fluidos suficientes para umedecer as fezes tornando-as secas. Pode ser ocasionada por dieta irregular ou hábitos incorretos de alimentação (MACCIOIA, 2007). Gastrite: (Deficiência de Qi do baço e estômago). É causada pelo enfraquecimento de dois Zang: baço e estômago, ocasionando as suas funções e recepção de transporte deficiente confirmando-se pela presença de uma disfunção gastrointestinal a gastrite (AUTEROCHÉ; NAVAILH, 1992).

De acordo com o gráfico 02, dos pacientes submetidos ao tratamento 100% (20) chegaram com dores na coluna, sendo que 45% (09 pacientes) sentiam dor na região cervical, 10% (02 pacientes) na região torácica e 45% (09 pacientes) na região lombar. Após o tratamento somente 20% (04 pacientes) apresentavam dores na coluna. Constatou-se uma redução da dor ao término do tratamento de 80%.

Para AUTEROCHÉ; NAVAILH (1992) com a deficiência do Yang do rim a região lombar fica frágil e não pode aquecer o corpo levando a dor na região lombar da coluna. O Rim encontra-se deficiente não possuindo o Qi suficiente para aquecer e forçar a região da coluna, ocasionando assim a dor (MACCIOIA, 2007).

Como demonstra o gráfico 03, 100% dos pacientes tratados chegaram dizendo sentir dores de cabeça, sendo que 90% (18 pacientes) sentiam dor na região frontal e 10% (02 pacientes) na região occipital. Após o tratamento somente 10% (ou seja, 02 pacientes) dos pacientes apresentavam dores de cabeça, de acordo com o teste estatístico aplicado pode-se notar uma redução significativa de 90% (18 pacientes) na dor de cabeça apresentada durante o tratamento.

A dor de cabeça segundo a Medicina Tradicional Chinesa é ocasionada pelo desequilíbrio do Yin e o Yang do fígado, no qual o Yin se encontra deficiente e o Yang em excesso. Ocorrendo a manifestação de dor em qualquer região da cabeça. As dores de cabeça podem ser classificadas em cefaléias e enxaqueca constituindo uma das queixas mais frequentes na clínica diária estando diretamente ligadas a fatores que destacam o acometimento de energias perversas como o vento e calor, além do vazio do Qi e principalmente do Shen dos Rins (YAMAMURA, 2001).

Estudos comprovam que pacientes com dores de cabeça submetidos ao tratamento com acupuntura auricular obtiveram uma melhora relevante quanto ao sintoma, além de relatarem uma baixa incidência de efeitos colaterais quando comparados com tratamentos médicos (FILSHIE; WHITE, 2002).

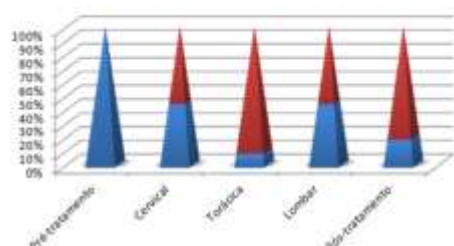


GRÁFICO 02: Predominância de dores na coluna pré- tratamento dividido por regiões e resultados obtidos com o pós-tratamento com acupuntura auricular.

Fonte: Autoras.

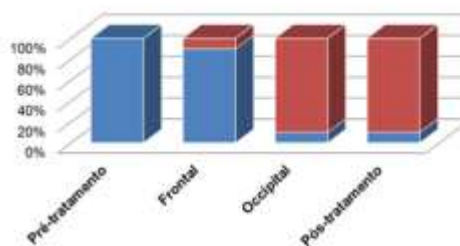


GRÁFICO 03: Visualização das dores de cabeça Pré-tratamento de acordo com as regiões afetadas e resultado do Pós-tratamento com acupuntura auricular.

Fonte: Autoras.

O gráfico 04 retrata o resultado do estudo pré e pós-tratamento. Verificando, portanto uma diferença expressiva na sintomatologia dos pacientes antes e depois da pesquisa. Antes 100% dos indivíduos se encontravam estressados, já que era critério de inclusão, no entanto ao término do estudo ocorreu uma redução de 85% (gráfico 05), mostrando uma redução significativa principalmente nos sintomas envolvendo dor de cabeça, coluna e ansiedade. Em contrapartida, vale ressaltar que os resultados foram trabalhados logo após o término do trabalho, não se sabe ao certo quanto tempo vai durar o efeito da acupuntura nos sujeitos da pesquisa, se obtiveram a cura ou se necessitam de uma manutenção periódica.

Diante dos resultados gerais (gráfico 05) se conclui que 17 pacientes (85%) obtiveram uma redução significativa quando submetidos ao tratamento com Acupuntura Auricular e apenas 03 pacientes (15%) continuaram com alguns dos sintomas que circundam o estresse. Os pontos de escolha para realização deste estudo foram: SHENMEN, SIMPÁTICO, RIM, FÍGADO, BAÇO, TRONCO CEREBRAL, SANJIAO e

ANSIEDADE. Os resultados desse estudo mostraram que com a utilização de pontos auriculares que possuem o poder de acalmar, sedar, distribuir e dispersar energia, foi possível uma redução nos sintomas que envolvem os seguintes padrões: estagnação de Qi do fígado (esgotamento emocional), deficiência de sangue (insônia), deficiência do Qi do baço (distúrbios gastrointestinais), estagnação do Qi do Coração e Pulmão (insônia, angústia).



Gráfico 04: Resultado gráfico dos indivíduos com a sintomatologia do estresse antes e pós-tratamento com acupuntura auricular.

Fonte: Autoras.

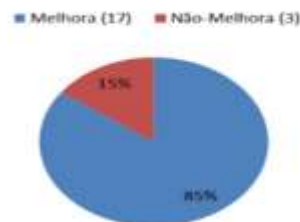


Gráfico 05: Resultado geral do tratamento de indivíduos com a sintomatologia do estresse submetidos à acupuntura auricular.

Fonte: Autoras.

Para Giaponesi; Leão (2007), o questionamento feito sobre acupuntura é de como elevar esta técnica cientificamente para chegar aos parâmetros aceitos por profissionais de saúde do ocidente, sem fugir, dos preceitos dessa terapia. Para as autoras o futuro da acupuntura no ocidente depende da comprovação de sua eficácia e segurança dos pacientes submetidos ao tratamento. Porém salienta-se adquirirmos conhecimento mais profundo sobre a Medicina Tradicional Chinesa, juntamente com a acupuntura, para que não sejam ignorados os séculos em que os resultados clínicos vêm sendo demonstrados com eficácia.

CONCLUSÃO

A acupuntura auricular mostrou resultados satisfatórios no tratamento de indivíduos com a sintomatologia do estresse na amostra analisada. Fornecendo informações que possam contribuir para a utilização desta técnica para o tratamento de pessoas com distúrbios emocionais.

Evidenciou-se uma melhora significativa no quadro clínico dos participantes da pesquisa. Reforçando ainda mais a importância do envolvimento da acupuntura auricular como subsídio no tratamento do estresse, além de promover ao indivíduo uma sensação de bem estar geral quando submetido à acupuntura auricular como uma terapia complementar.

REFERÊNCIAS

- AUTEROCHE, B.. Diagnostico na medicina chinesa. SAO PAULO: Andrei,1992. FILSHIE, Jacqueline. Acupuntura médica. SAO PAULO: Roca, 2002.
- GIAPONESI, A. L. L.; LEÃO, E. R. Auriculoterapia para Estresse em Equipe de Enfermagem do Centro de Terapia Intensiva de um Hospital Geral. São Paulo: [s.n.] 2007.
- MACIOCIA, Giovanni. Os fundamentos da medicina chinesa: Um texto abrangente para acupunturistas e fisioterapeutas. Tradução Ednea Iara Sousa Martins. São Paulo: Roca, 2007.
- NEVES, José Luís. Pesquisa qualitativa – Características, usos e possibilidades. Caderno de pesquisas em administração. São Paulo. V1, nº3, p.1-5, 2º sem.1996.
- RODRIGUES, Willian Costa. Metodologia Científica. FAETE/IST. Paracambi: [s.n.], 2007.
- RODRIGUES, A. L.; GASPARINI, A. C.C.F. Uma perspectiva psicossocial em psicossomática: estresse e trabalho. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1992.
- ROSS, Jeremy. Combinações dos pontos de acupuntura: A chave de êxito clínico: Tradução Maria Inês Garbino Rodrigues. São Paulo: Roca, 2003.
- SOUZA, Marcelo Pereira. Tratado de auriculoterapia. Brasília: Copyright, 2007. Yamamura Y. Acupuntura tradicional: a arte de inserir. 2ª ed. São Paulo: Roca; 2001.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas, professores, funcionários da Faculdade Aliança e do curso de Biomedicina. Em especial ao professor Osmar Filho, por sua idoneidade, dedicação, compreensão e carinho durante todos estes períodos, seu esforço nas correções e indicações de livros e revistas especializados. Agradecemos também a “DEUS”, por nos ceder seus conhecimentos, pois só ele os possui e a cada dia descobrimos por pequenas janelas, seus majestosos e brilhantes horizontes a qual, pousos têm oportunidade de usufruir. Estamos gratas a professora Adriana Saraiva que, por sua postura crítica, abrangeu não só a busca de precisão idiomática, como também a verificação dos conteúdos programados na disciplina TCC I no curso de Biomedicina.

CV06 - Análise microbiológica e físico-química da água de uma faculdade particular de Teresina – PI

Guilherme Antônio Lopes de Oliveira¹ (IC), Aldenora Maria Ximenes Rodrigues² (IC), Maiza Lacerda Barbosa³ (IC), Wallek Gomes Moreno⁴ (PQ), Francialza Veras Viana Lopes⁵ (PQ), Débora de Alencar Franco Costa⁶ (PQ), Lyssa Cavalcante de Carvalho⁷ (PQ), Adriana Saraiva dos Reis^{8*} (PQ)

1.Faculdade Aliança, Graduando do curso de Biomedicina

2.Faculdade Aliança, Graduando do curso de Biomedicina

3.Faculdade Aliança, Graduando do curso de Biomedicina 4.Faculdade Aliança, Pesquisador Docente do Curso de Biomedicina

5.Faculdade Aliança, Pesquisador Docente do Curso de Biomedicina

6.Faculdade Aliança, Pesquisador Docente do Curso de Biomedicina

7.Faculdade Aliança, Pesquisador Docente do Curso de Biomedicina

8.Faculdade Aliança, Pesquisador Docente do Curso de Biomedicina e-mail: adrianasaraivareis@hotmail.com

* Autor principal

Palavras-chave: Análise de água. Alimentos. Microbiológico.

RESUMO

As características microbiológicas da água interferem diretamente na qualidade dos alimentos e conseqüentemente à saúde humana. Esta pesquisa objetivou avaliar a qualidade, para consumo humano, da água coletada em uma lanchonete e de bebedouros de uma faculdade particular em Teresina-PI, levando em consideração a manutenção e limpeza de caixas d'água e o saneamento básico do local. Após um planejamento determinou-se que a pesquisa será realizada em uma lanchonete e em quatro bebedouros de uma faculdade. Serão analisadas 5 amostras de águas. As análises microbiológicas serão padronizadas de acordo com a metodologia Colilert para as análises de coliformes termotolerantes. Monitorar a qualidade da água disponibilizada a alunos em uma faculdade de Teresina-PI, assim como a usada em estabelecimentos que fornecem alimento é de extrema importância, visto que a qualidade da água usada para o consumo direto e preparação de alimentos está diretamente ligada a doenças transmitidas pela falta de saneamento básico e conseqüentemente pela contaminação por coliformes.

INTRODUÇÃO

Água e saúde são duas coisas indispensáveis para o ser humano, porque não dizer para a vida de qualquer ser vivo, pois este recurso único e renovável, de qualidade, é o que garante a saúde e a manutenção da vida (AMORIM, 2001).

É indiscutível que um dos grandes problemas que envolvem esse recurso seja sem dúvida sua escassez. São muitos os fatores que levam a esta situação, como por exemplo, o aumento populacional, a industrialização, ocupações irregulares, sobre tudo, próximos de rios e mananciais e principalmente a falta de consciência ambiental por parte da população, resultando no comprometimento das águas (JAQUES, 2005 apud MURAKAMI, 2007).

A água mesmo depois do tratamento convencional está sujeita a contaminação, principalmente quando armazenadas em reservatórios domiciliares, como caixas d'água contaminadas por falta de higiene e limpeza. Em situações de águas de poço, essa situação se agrava ainda mais se o local sofre com contaminação do solo ou fica próximo de locais de degradação do mesmo, ou ainda, se recebe contaminação por falta de saneamento, que possa levar ao comprometimento dessas águas.

Em estabelecimentos de alimentação, como lanchonetes, a água é utilizada em várias operações, limpeza, sanificação e como matéria prima, sendo assim, as características físico-químicas e microbiológicas da água interfere diretamente na qualidade destes alimentos e conseqüentemente à saúde humana. (PEGORARO, 2006).

A água mesmo depois do tratamento convencional está sujeita a contaminação, principalmente quando armazenadas em reservatórios domiciliares. Garantir a qualidade deste recurso é garantir a saúde da população, portanto, esta pesquisa objetivou avaliar a qualidade, para consumo humano, de águas de bebedouros e lanchonetes de uma Faculdade particular de Teresina-PI, levando em consideração a manutenção e limpeza de caixas d'água e o saneamento básico do local.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram coletadas na torneira da lanchonete que é utilizada no preparo de alimentos e nos 5 bebedouros da Faculdade. As análises microbiológicas foram padronizadas de acordo com a metodologia Colilert para as análises de coliformes termotolerantes. Para a coleta foi

realizada a assepsia das torneiras. Logo após, deixou-se à água correr por 3 a 5 minutos, esta foi fechada e flambada, deixando novamente a água correr por mais 3 a 5 minutos. Para o teste microbiológico com Colilert nos 6 balões foi acrescentado 2 gotas de tiosulfato de sódio a 10% para neutralizar o cloro e coletou-se 100 ml de água, as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas e encaminhadas para o laboratório de microbiologia da Faculdade. As amostras foram mantidas a temperatura de 35°C/24h. Após isso, foram levadas para observação através de luz UV para detectar a presença de E. coli.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A qualidade da água é definida em função de valores máximos permitidos para parâmetros físicos, químicos e biológicos determinados pelas normas do Ministério da Saúde (MS) e da OMS. A portaria de Nº 2.914, de 2011 do MS, estabelece os procedimentos relacionados a qualidade da água para consumo humano, e o seu padrão de potabilidade. A alcalinidade da água para consumo humano, situa-se entre 20 a 30 mg de bicarbonato de cálcio por litro (CaCO₃.L-1).

Nas amostras verificaram-se a alcalinidade normal, menor que 30 mg CaCO₃.L-1. As concentrações de cloreto das amostras não apresentaram aumento em relação o valor de referência de 250 mg.L-1. Nenhuma das amostras apresentou alterações no parâmetro dureza, os valores encontrados obedecem ao valor determinado de 500 mg CaCO₃.L-1. No parâmetro amônia todas as amostras obtiveram valor igual de 0,25 mg de nitrogênio amoniacal (N-NH₃.L-1), o MS preconiza valor abaixo de 1,5 mg N-NH₃.L-1. Com relação à cor nenhuma das amostras apresentaram discordância com o valor de referência de até 15 uH. As concentrações de ferro apresentaram-se nos seus valores normais com média menor que 0,25 mg.L-1. Para águas destinadas ao consumo humano o valor do pH varia de 6 e 8,5, segundo o MS. Todas as amostras estavam dentro do padrão. Não houve presença de coliformes totais e termotolerantes em nenhuma das amostras.

CONCLUSÃO

Monitorar a qualidade da água usada para consumo é de extrema importância para a saúde. Os parâmetros físico-químicos das águas coletadas não apresentaram poluição de acordo com o MS. Com relação às concentrações de coliformes totais e termotolerantes, foram ausentes nas amostras.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, M.C.C. Avaliação da qualidade Bacteriológica das Águas de Cisternas: estudo de caso no município de Petrolina – PE. III Simpósio Brasileiro de Captação de Água de Chuva no Semi-Árido, 2001.
- MURAKAMI, Marcela Ferreira. Caracterização Físico-química e Microbiológica de Diferentes Amostras de uma Precipitação Coletada e Armazenada após Passagem por Telhado. Rio Claro: Monografia do curso de Engenharia Ambiental – Universidade Estadual Paulista, 2007.
- PEGORARO, S.R. Qualidade da Água Utilizada em Sistema de Alimentação. Cascavel: Monografia do curso de Nutrição – Faculdade Assis Gurgacz, 2006.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Faculdade Aliança e ao Funpesq (Fundação de Incentivo à Pesquisa) por permitir a realização dessa pesquisa.

CV07 - Avaliação toxicogenética do fruto Noni (*Morinda citrifolia*)

Germano Pinho de Moraes¹ (IC), Antonio Luiz Gomes Júnior² (IC), Márcia Fernanda Correia Jardim Paz¹ (IC), Simone da Costa e Silva Carvalho³ (IC), Kátia da Conceição Machado³ (IC), Débora Cássia Vieira Gomes² (IC), Rodrigo Mendes de Carvalho⁴, Alisson Ferreira Dantas, Jaqueline Nascimento Picada¹ (PQ), Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante^{2,5} (PQ).

1. Universidade Luterana do Brasil – Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada
2. Universidade Federal do Piauí – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
3. Faculdade NOVAFAPÍ – Curso de Graduação em Biomedicina
4. Biomédico
5. Faculdade NOVAFAPÍ – Professora das disciplinas de Genética, Citogenética e Biologia Molecular
marciafernanda@uol.com.br

Palavras-chave: *Morinda citrifolia*. Teste Cometa. Micronúcleo. Mutagenicidade, Genotoxicidade.

RESUMO

Morinda citrifolia Linn (Noni) é uma planta que vem sendo utilizada há mais de 2000 anos pelos povos polinésios para combater diversas enfermidades, como por exemplo, alergia, artrite, câncer, diabetes, asma, entre outras. No Brasil, o Noni começou a ser utilizado como suplemento alimentar e já está disseminado em vários estados brasileiros. No entanto, suas propriedades fitoterápicas ainda não possuem comprovação científica, muito menos, estudos toxicológicos e genotóxicos. Assim, este estudo objetivou a avaliação genotóxica e mutagênica da *M. citrifolia* em ratos. Os frutos da planta foram coletados no município de Altos-PI. Foram utilizados 50 *Rattus norvegicus albinus* adultos, com massa corporal de 200 a 250 g. Os animais foram distribuídos nos grupos experimentais (n=10); 5 machos e 5 fêmeas: controle negativo (água destilada), controle positivo (25 mg/kg de ciclofosfamida, i.p.) e 3 doses de extrato de Noni (10 mg/kg; 5 mg/kg e 2,5 mg/kg). Ao final dos 15 dias de tratamento, os animais foram anestesiados para retirada de amostras de sangue, medula óssea e fígado. Para a avaliação de atividades mutagênicas e genotóxicas, foram utilizados os teste de micronúcleos e cometa, respectivamente. Danos significativos ao DNA foram observados em fígado e medula óssea, pelo aumento de índice e frequência de danos e um aumento na frequência de micronúcleos foi evidenciado em medula óssea e sangue periférico. Os resultados demonstraram que o extrato do fruto do Noni foi genotóxico e mutagênico de forma dose-dependente, sugerindo riscos potenciais para a saúde humana e a necessidade de se estabelecer doses seguras.

INTRODUÇÃO

O Noni, planta originária do sudeste asiático foi descoberta a 4000 a.C. Atualmente, está sendo cultivado e produzido na América Central e no Brasil. É uma planta exótica Pertence à família botânica Rubiácea com o nome científico de *Morinda citrifolia*. O fruto é ovalado, com o tamanho variando de uma bola de tênis a uma de futebol, pesando entre 30 a 800 gramas. O fruto contém muitas sementes (de 80 a 100), tem um forte odor quando colhida, sendo por vezes descrita como fruta de queijo ou fruta do vômito (NELSON; ELEVITCH, 2006). Em sua composição encontra-se carboidratos, proteínas, vitaminas A, C, E e vitaminas do complexo B; minerais como cálcio, potássio, fósforo, zinco, cobre, ferro e magnésio. Apresenta também ômega 6, óxido nítrico, betacaroteno, escopoletina, aminoácidos, selênio, terpenos, xeronina e damnacantal (LEVAND apud LAVAUT, 2003).

Como planta medicinal, os possíveis benefícios são: anti-inflamatório, analgésico, antibiótico, antifúngico, antiviral, antihistamínico, hipotensivo e anticâncer (WANG et al., 2002); estimula a apoptose, necrose de células neoplásicas, efeito imunomodulador, inibição do oncogene RAS, inibição de tirosino-quinases e efeito anti-angiogênico (HIRAZUMI; FURUSAWA, 1999).

A exposição continuada às substâncias químicas com caráter tóxico possibilita ao material genético danos estruturais e funcionais, os quais são importantes para a promoção de mutagênese e a posterior carcinogênese, processo que demanda bastante tempo e exposição segundo sua complexidade (HOYOS et al., 1992). Uma vez lesado o DNA, as células respondem utilizando diferentes estratégias de ação, tais como morte por citotoxicidade ou apoptose, modulação da expressão gênica controlando o ciclo celular, e reparação do material genético por via livre ou sujeita a erro, sendo a segunda responsável pela fixação das mutações. Normalmente é a combinação destes fatores que compõem a resposta aos danos genéticos (TUROLA; NASCIMENTO, 2006)

A ocorrência destes danos ao DNA observados e mensurados por técnicas específicas constituem uma prova concreta da ocorrência do efeito genotóxico. Dessa forma é de grande apreço científico obter maior elucidação das substâncias quanto aos seus mecanismos de ação sobre o material genético e como estes podem ser modulados, promovendo às populações o que seja saudável e de melhor proveito.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação do extrato do fruto

Os frutos da planta *M. citrifolia* foram coletados no município de Altos, Estado do Piauí, Brasil, à latitude de 05° 02'20" S, longitude de 42° 27'39" O. A identificação botânica foi realizada no Núcleo de Referência em Ciências Ambientais do Trópico Ecotonal do Nordeste – TROPEN, Teresina – PI com número de exsicata 21644. Os frutos foram picados, dessecados em estufa de circulação forçada de ar, durante oito dias, a uma temperatura máxima de 45 °C (± 1). Após essa etapa, o material foi triturado em moinho, tipo Willis, obtendo-se um pó. O extrato aquoso foi obtido através da mistura de 500 mg de pó do Noni para 500 mL de água destilada, obtendo-se a concentração de 1 mg/mL, 250 mg para 500 mL (concentração de 0,5 mg/mL) e 125 mg para 500 mL (concentração de 0,25 mg/mL). Assim, foram obtidos as seguintes doses respectivamente: 10 mg/kg, 5 mg/kg e 2,5mg/kg. Todas as soluções foram mantidas em geladeira para o consumo dos ratos por 15 dias.

Grupos experimentais

No estudo foram utilizados 50 ratos albinos da espécie *Rattus norvegicus albinus*, adultos, com massa corporal de 200 a 250g, provenientes da colônia do Biotério da Faculdade de Saúde, Ciências Humanas e Tecnológicas do Piauí – NOVAFAPI, Teresina – Piauí. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (5 animais/caixa) com dieta de manutenção (Labina-Purina®) e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos em área climatizada com temperatura ambiente de 25°C e fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro. O estudo foi do tipo analítico experimental, sendo os animais distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos (n=10, sendo 5 machos e 5 fêmeas): grupo controle negativo (G1 - água destilada 1ml/100g por 15 dias), 3 grupos tratados com diferentes doses de extrato aquoso de Noni: (G2 = Noni 10 mg/kg (1mg/mL); G3 = Noni 5 mg/kg (0,5mg/mL); G4 = Noni 2,5 mg/kg (0,25mg/mL) 1ml/100g por 15 dias) e grupo controle positivo (G5 -25 mg/kg de ciclofosfamida, i.p por 2 dias).

O projeto foi, previamente ao início dos experimentos, submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde, Ciências Humanas e Tecnológicas do Piauí – NOVAFAPI, Teresina-PI, obtendo aprovação com o número: 0039/10.

Após tratamento os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com solução composta por quetamina na dose de 40 mg/Kg e de xilazina, na dose de 5 mg/Kg de peso corporal. Em seguida foi coletado o sangue da veia caudal para realização do teste cometa e coleta de medula óssea e fígado para realização do teste cometa e de micronúcleo. O procedimento padrão, descrito em MAVOURNIN *et al.* (1990), foi utilizado para a coleta da medula óssea dos animais. Para obtenção da suspensão celular do fígado foi realizada uma maceração do órgão com tampão fosfato de sódio (PBS) com pH 7,4, seguida de centrifugação (3000 rpm por 5 minutos), em seguida descartar o sobrenadante, agitar levemente o sedimento, adicionar, 5 ml PBS e agitar novamente. Repetir o procedimento anterior por mais 2 vezes. Em seguida descartar o sobrenadante deixando aproximadamente 1 ml no tubo, agitar a suspensão de células.

Teste Cometa

A versão alcalina do Teste Cometa foi utilizada conforme descrito em TICE et al. (2000). Alíquotas de 5 µl da amostra de sangue e 10 µl das amostras da suspensão celular de fígado foram misturados com 95 µl e 90 µl de agarose “low melting” 0,75% respectivamente e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal a 1,5%; estas lâminas foram mergulhadas em uma solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10 com adição de 1% Triton X-100 e 10% DMSO na hora do uso), por no mínimo 1 hora até no máximo 72 horas a 4°C, para o rompimento das membranas celulares. A lise celular permitiu a migração dos fragmentos de DNA que foi realizada após a incubação das lâminas em tampão alcalino (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH > 13) por 20 minutos e subsequente aplicação de uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0,90 V/cm) por 15 minutos às células lisadas sobre as lâminas para microscopia em uma cuba de eletroforese de DNA. As lâminas foram neutralizadas logo após a eletroforese com tampão Tris 0,4 M, pH 7,5 e coradas com solução de prata. Os resultados foram expressos em índice de danos (ID) e frequência de danos (FD). O ID foi obtido pela avaliação visual das classes de dano (de 0 a 4), extraindo-se um índice que expressa o dano geral sofrido por uma população de células (50 células por lâmina em duplicata), onde, a classe de dano versus o número de células com aquele dano. A FD foi calculada baseada no número de células sem cauda menos 100 que é o total de células avaliadas.

Teste de Micronúcleos

O Teste de Micronúcleo em medula óssea de camundongos foi um dos testes utilizados para a avaliação mutagênica do fruto em estudo, no qual foram analisados eritrócitos policromáticos (PCEs), procurando avaliar a frequência de micronúcleos (MNPCs) em 2000 células. Para o teste de micronúcleo em sangue periférico foram colhidas gotas de sangue da cauda dos ratos e realizado o esfregaço sanguíneo em duplicata por animal, sendo estes esfregaços fixados em metanol e ácido acético (3:1) por 15 minutos e após 24 horas foi realizada a coloração utilizando corante de Giemsa (Merck) em tampão fosfato 0.2M, pH 5,8 (proporção de 1:9). Após 7 minutos nesta solução de coloração, as lâminas foram enxaguadas em água destilada, secas e guardadas em caixas de lâminas até a análise, onde foram analisados a frequência de micronúcleos em 2000 células.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação genotóxica da *M. citrifolia* em *Rattus norvegicus* foi realizada em fígado e medula óssea pelo teste cometa, avaliando índice de danos e frequência de danos. Noni apresentou genotoxicidade em fígado pelo ID e FD nas doses maiores em machos e fêmeas. Na dose 2,5 mg/kg houve aumento significativo de ID e FD somente para os machos (Tabela 1). Entretanto, em medula óssea, independente do gênero, somente a dose 10 mg/kg foi genotóxica e a dose 5 mg/kg, mostrou dados significativos (p<0,001) para ID e FD somente para os machos. Na menor dose testada, não foram observados aumentos significativos para ID e FD em medula óssea para machos e fêmeas (Tabela 2).

Tabela 1. Genotoxicidade do Noni em fígado de *Rattus norvegicus*, avaliada com o Teste Cometa

Tratamento	ID ^a			FD ^a		
	Machos	Fêmeas	Grupo	Machos	Fêmeas	Grupo
CN	29,6 ± 3,4	36,80 ± 12,28	33,20± 5,1	19,00 ± 6,96	20,6 ± 9,5	19,80 ± 1,31
CPA (25 mg/Kg)	115,0 ± 14,0***	144,8 ± 18,6***	129,9 ± 21,1*	62,80 ± 7,4***	73,80 ± 5,3***	68,30 ± 7,77*
Noni (2,5 mg/Kg)	63,6 ± 7,5**	49,80 ± 4,60	56,40± 9,33	41,60 ± 4,6**	26,00 ± 4,6	33,80 ± 11,03
Noni (5 mg/Kg)	57,0 ± 8,4*	107,6 ± 14,2***	82,00± 35,4	37,20 ± 5,9**	61,20 ± 4,1***	49,20 ± 16,97
Noni (10 mg/Kg)	136 ± 23,9***	119 ± 21,9***	127,5± 12,0**	78,00 ± 4,5***	70,40 ± 7,3***	74,02 ± 5,62**

a Média ± Desvio Padrão. CN (sem tratamento); CPA (ciclofosfamida a 25 mg/Kg ip.). Ratos tratados durante 15 dias com extrato aquoso de Noni. Dados relativos a 72 horas após o último dia do tratamento. ANOVA (Tukey's Multiple Comparison Test). Significância para ***P<0,001, **P<0,01 e *P<0,05 em relação ao controle negativo.

Tabela 2. Genotoxicidade do Noni em medula óssea de *Rattus norvegicus* avaliada com o Teste Cometa

Tratamento	ID ^a			FD ^a		
	Machos	Fêmeas	Grupo	Machos	Fêmeas	Grupo
CN	14,8 ± 6,5	36,8 ± 8,92	25,8 ± 15,6	12,0 ± 5,7	17,6 ± 3,2	14,8 ± 3,96
CPA (25 mg/Kg)	86,0 ± 13,7***	91,0 ± 6,8***	88,5 ± 3,5**	29,8 ± 8,7**	74,6 ± 9,9***	52,2 ± 31,7*
Noni (2,5 mg/Kg)	37,60 ± 12,7	25,80 ± 12,2	26,7 ± 1,3	18,4 ± 8,3	12,0 ± 7,3	15,2 ± 4,5
Noni (5 mg/Kg)	121,0 ± 17,9***	63,6 ± 21,2	92,6 ± 41,0	44,6 ± 4,4***	26,8 ± 5,5	35,7 ± 12,6
Noni (10 mg/Kg)	227,4 ± 23,96***	192,8 ± 17,7***	240,1 ± 66,9**	78,4 ± 5,7***	68,0 ± 8,6***	73,2 ± 7,4*

a Média ± Desvio Padrão. CN (sem tratamento); CPA (ciclofosfamida a 25 mg/Kg ip.). Ratos tratados durante 15 dias com extrato aquoso de Noni. Dados relativos a 72 horas após o último dia do tratamento. ANOVA (Tukey's Multiple Comparison Test). Significância para ***P<0,001, **P<0,01 e *P<0,05 em relação ao controle negativo.

Na avaliação por grupo considerando a média e desvios padrão de machos e fêmeas, apenas na dose 10 mg/kg houve aumento significativo tanto no ID (127,5 ± 12,02) quanto na FD (74,02 ± 5,62) em comparação com o controle negativo (ID: 33,20 ± 5,09 e FD: 19,80 ± 1,31) em fígado (Tabela 3). Resultado similar foi observado na medula óssea (Tabela 2).

Segundo Collins (2008) o ensaio cometa é um excelente teste de genotoxicidade podendo revelar quebras simples, quebras duplas nas fitas do DNA, além de cross-links e sítios álcali-lábeis. Sendo usualmente trabalhado para biomonitoramento ambiental, ocupacional e mais recentemente para processos oxidativos do DNA, condicionado por espécies químicas de poder oxidativos extrínsecos (ingeridos na dieta) ou intrínsecos (gerado pelo processo de respiração celular) (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999).

Teste Cometa *in vivo* é bastante usado na avaliação genotóxica com várias aplicabilidades em vários tecidos e com muita sensibilidade para detectar baixos níveis de danos ao DNA com pequenos números de células nas amostras biológicas (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005). Na versão alcalina pode detectar diferentes tipos de danos ao DNA em células eucarióticas, tratadas *in vivo* ou *in vitro*, com agentes genotóxicos com aplicações para o monitoramento humano e seus resultados podem ser correlacionados com os de outros biomarcadores de danos ao DNA (ALBERTINI et al., 2000).

Em nosso estudo, houve um aumento de genotoxicidade em células do fígado e medula óssea na maior dose testada (Tabelas 1 e 2 respectivamente). Esses resultados diferem dos encontrados em um estudo realizado por Westendorf et al. (2007), no qual foi verificado diminuição de danos ao DNA em células do fígado de ratos que foram expostos ao extrato aquoso do fruto do Noni nas doses de 100 mg/kg e 1000 mg/kg. Os danos 1 e 2 foram mais evidentes, porém, não houve diferença entre os danos dos grupos tratados com o controle negativo. Estes autores concluíram que o suco concentrado do Noni apresentou um efeito protetor no estresse oxidativo endógeno.

Na análise de MN em reticulócitos de sangue periférico, os animais machos e fêmeas não apresentaram aumento do número e frequência de MNs estatisticamente significante em relação ao controle negativo na menor dose (2,5mg/Kg). Na dose de 5mg/Kg houve um aumento significativo do número de reticulócitos micronucleados em machos (4,4) e fêmeas (4,8) e na maior dose (10mg/Kg) o número de micronúcleos foi mais expressivo em ambos os grupos quando comparados com o CN, sendo que os machos apresentaram a média de 7,8 reticulócitos micronucleados e, as fêmeas a média de 8,4 reticulócitos micronucleados em 2000 células analisadas (Tabela 3). O aumento de MN em EPC de medula óssea ocorreu de forma dose-dependente, pois houve um incremento do número e frequência, de acordo com o aumento da dose testada. Todas as doses mostraram um aumento significativo de MN em relação ao controle negativo, exceto a de 2,5 mg/kg em fêmeas (Tabela 3).

Tabela 3. Avaliação da mutagenicidade em sangue periférico e medula óssea de *Rattus norvegicus* em tratamento com Noni com o Teste de Micronúcleos

Tratamentos	Sangue periférico MN/RET ^a		Medula MN/EPC ^a	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
CN	1,2 ± 0,8	2,0 ± 0,7	2,8 ± 0,8	1,8 ± 0,4
CPA (25 mg/Kg)	13,0 ± 1,5***	11,0 ± 1,6***	11,0 ± 1,0*** **	10,2 ± 1,3***
Noni (2,5 mg/Kg)	2,4 ± 0,5	2,8 ± 0,8	5,2 ± 0,8**	2,6 ± 0,5
Noni (5 mg/Kg)	4,4 ± 1,1**	4,8 ± 0,8**	7,4 ± 1,1***	5,8 ± 0,8***
Noni (10 mg/Kg)	7,8 ± 1,4***	8,4 ± 1,1***	9,6 ± 1,1***	9,6 ± 1,1***

a Média ± Desvio Padrão em 2.000 células. ANOVA (Dunnet's Multiple Comparison Test). Significância para ***P<0,0001, **P<0,01, em relação ao controle negativo. Legenda: CN – Controle Negativo; CPA – Ciclofosfamida; MN – micronúcleos; RET – reticulócito; EPC – eritrócito policromático.

Entretanto, trabalho realizado por Edwards (2002) que avaliou a atividade clastogênica do suco do Noni em ratos através do teste de micronúcleos mostraram que o Noni não possuiu ação tóxica, nem clastogênica. Edwards (2002) utilizou cerca de 10 g do suco do Noni desidratado por kilo do animal via gavagem. Após o período do experimento, foi retirada a medula óssea dos fêmures e examinada em microscópio óptico, no qual avaliou-se a frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos. Os resultados não evidenciaram um aumento do número e frequência de eritrócitos micronucleados, não caracterizando, portanto, uma ação clastogênica, nem evidência tóxica no grupo que consumiu o suco do Noni.

Os resultados para mutagenicidade apontam que o Noni, nas duas maiores doses, induz mutagenicidade pelo aumento na frequência de micronúcleos em medula óssea e em sangue periférico (Tabela 5 e 6). Estudos confirmam que a frequência de MN elevada, tanto no sangue periférico como em medula óssea, aumenta o risco de desenvolvimento de neoplasias, isto porque o câncer se baseia no acúmulo de mutações no material genético. Os micronúcleos são originados de alterações cromossômicas que podem ser resultantes de efeitos aneugênicos e/ou clastogênicos. Os efeitos aneugênicos são aqueles em que há um dano no fuso mitótico, fazendo com que um ou mais cromossomos inteiros sejam liberados e permaneçam desligados do fuso durante o ciclo celular. Os clastogênicos são aqueles que atingem a estrutura do cromossomo, originando fragmentos, que não se incluem nas células filhas formadas ao final do ciclo celular. Esses eventos originam a estrutura conhecida como micronúcleo (HOLLAND et al, 2008).

No geral, os resultados mostraram que os efeitos hepatotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do Noni ocorreram de forma dose-dependente. Entretanto, mais testes de toxicidade e de genotoxicidade do Noni precisam ser realizados, a fim de aprofundar os conhecimentos acerca destes efeitos e estabelecer doses seguras, sem riscos ao material genético.

CONCLUSÃO

Os resultados encontrados, neste trabalho, usando os Testes Cometa e de Micronúcleos fornecem informações claras de que o Noni apresenta riscos de instabilidade genética associados aos componentes químicos capazes de causar hepatotoxicidade e genotoxicidade. Nossos resultados apresentaram uma relativa significância estatística de maior sensibilidade das células hepáticas dos ratos machos no teste cometa, provavelmente devido ao maior stress durante o procedimento em uma ação sinérgica do metabolismo e da administração do suco do noni. Esta evidência salienta a necessidade de programas de saúde pública que orientem sobre o consumo de plantas medicinais que ainda não tenham

REFERÊNCIAS

- ALBERTINI, R.J. et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat. Res.* n. 463. v. 11. p. 111–172, 2000.
- BRENDLER-SCHWAAB S., et al. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagen.* n. 4. v. 20, p. 245–254, 2005.
- COLLINS, A.R. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mut Rev.* p. 1–9, 2008.
- EDWARDS, C. N. Tahitian Noni Juice - Mouse Micronucleus Test. Scantox Biologisk Laboratorium, Lille Skensved, Denmark (Lab nº 47053). ELKINS, R. Noni (*Morinda citrifolia*) la hierba preciada del pacífico sur. Pleasant Grove: Woodland. 1997. (2002).
- HIRAZUMI, A; FURUSAWA, E. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni) with antitumour activity. *Phytoter. Res.* v. 13, 1999.
- HOLLAND, N., et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat. Res.* v. 659. p. 93-108, 2008.
- HOYOS, L. S. et al. Evaluation of the genotoxic effects of a folk medicine, *Petiveria alliacea* (anamu). *Mutat. Res. Colombia.* v. 280, n. 1, p. 29–34, jul. 1992.
- LAVAUT, N. E. G; LAVAUT, J. A. G. *Morinda citrifolia* Linn.: potencialidades para su utilización en la salud humana. *Revista Cubana de Farmácia.* v. 37, 2003.
- NELSON, S. C; ELEVITCH, C. R. Noni: the complete guide for consumers and growers. Honolulu, Hawaii. Permanent Agriculture Resources, 2006.
- TICE, R. R., et al. Report from working group on the in vivo mammalian bone marrow chromosomal aberration test. *Mutat Res.* v. 312. p. 305-312, 2000.
- TUROLLA, M. S. R; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas,* v. 42, n. 2. p. 289 – 306, 2006.
- WANG MY, et al. Protective effects of *Morinda citrifolia* on plasma superoxides (SAR) and lipid peroxides (LPO) in current smokers. *Free Rad Biol and Med,* v.117, p. 729-734, 2002.
- WESTENDORF, J.; EFFENBERGER, K.; IZNAGUEN, H.; BASAR, S. Toxicological and Analytical Investigations of Noni (*Morinda citrifolia*) Fruit Juice. *J Agricult and Food Chem,* v. 55, p. 529-537, 2007.
- ROJAS, E; LOPEZ, M. C; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. México. *J Chromat B.* v. 722. n. 1–2, p. 225–254, 1999.

CV08 - Efeitos do Garcinielliptone FC da *Platonia insignis* Mart sobre a performance reprodutiva de ratas Wistar

Mirna Luciano de Gois da Silva^{1*} (PG), Priscila de Sousa Vieira² (IC), Ana Paula dos Santos Correia Lima da Silva¹ (PG), Joselma Sousa Lacerda² (IC), Rivelilson Mendes de Freitas² (PQ).

1. Universidade Federal do Piauí – Doutorado RENORBIO
2. Universidade Federal do Piauí – Curso de Graduação em Farmácia priscilla_sjp@hotmail.com

* Autor principal

Palavras-chave: *P. insignis*. Garcinielliptone. Fertilidade. Toxicidade reprodutiva.

RESUMO

O Garcinielliptone FC (GFC) é uma substância extraída da semente do bacuri (*Platonia insignis* Mart), com a qual se investigou os efeitos sobre o ciclo reprodutivo e desenvolvimento da prole de ratas Wistar. Utilizou-se ratos Wistar adultos, machos e fêmeas, com idade de 90 dias. Os protocolos experimentais e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí. Os animais (n=6 machos; n=12 fêmeas) foram tratados por via oral (v.o) com GFC na dose de 0,25 g.kg⁻¹ e ao grupo controle foi administrado solução salina, no decorrer do período experimental. Diariamente eram observadas as fêmeas quanto a fertilidade, performance gestacional, procriação e desenvolvimento de seus filhotes. Na fase pré e durante o acasalamento, os animais tratadas com a GFC não apresentaram nenhum tipo de alteração física ou comportamental quando comparados ao grupo controle. Após esse período, continuou-se a administração nas 12 fêmeas, tendo 9 ratas prenhes. Na prole, registrou-se 96,7% de animais nativos, sendo que 6,4% desses animais possuíam má formação na cabeça e no dorso, e 3,3% dos filhotes formam natimortos com má formação morfológica. Diante desse fato, a administração de GFC não mostrou diferenças significantes nas variáveis reprodutivas entre os grupos tratados e controle, todavia estudos continuam sendo realizados através da autópsia dos animais e exame histopatológico sobre os órgãos e tecidos dos animais que receberam tratamento.

INTRODUÇÃO

As plantas servem como fonte natural de substâncias, mas, seu uso, sob o ponto de vista terapêutico, não deve ser indiscriminado. Como preconiza a toxicologia, toda substância, mesmo sendo de origem natural, pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição, como dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição e vias de administração. Além disso, as plantas podem apresentar na sua constituição substâncias capazes de causarem efeitos adversos no organismo, que podem interferir no funcionamento de órgãos vitais e não-vitais (BARROS; DAVINO, 1996).

Platonia insignis Mart (família Clusiaceae) é popularmente conhecida no Brasil como bacuri ou bacurizeiro, sendo uma espécie frutífera e madeireira, assumindo importância econômica nos Estados do Pará, Maranhão, Tocantins e Piauí, onde se concentram populações naturais densas e diversificadas (LIMA et al., 2007). Ela possui propriedades antioxidantes e atividades anticancerígenas, sendo a partir de sua semente o isolamento do Garcinielliptone FC (GFC) (COSTA JUNIOR, 2012).

Os testes de avaliação de toxicidade reprodutiva geralmente compreendem a exposição de animais sexualmente maduros antes da concepção, durante o desenvolvimento pré-natal e após o nascimento e continuamente até sua maturação sexual (LEMÔNICA, 2001). Assim, ao analisar o potencial tóxico de agentes químicos sobre os sistemas reprodutivos masculinos e femininos e o desenvolvimento de descendentes, é possível avaliar seus efeitos sobre o comportamento sexual, fertilidade, gestação, lactação e todos os processos diretamente relacionados a esses sistemas (EPA, 1996).

Segundo Calixto (2000), estudos toxicológicos bem controlados para provar a sua segurança são necessários. Diante disso, o presente estudo avaliará os efeitos do Garcinielliptone FC (GFC) sobre a performance de ratas Wistar, fertilização, gestação, procriação e desenvolvimento de seus filhotes.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio preliminar foi desenvolvido em 36 ratos (n=12 machos; n=24 fêmeas) Wistar, distribuídos em grupos tratado e controle, com idade de 90 dias provenientes do biotério do Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental (LAPNEX) da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram mantidos no LAPNEX, sendo previamente adaptadas por cinco dias às condições constantes de temperatura (22 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo alimentadas com ração e água ad libitum durante todo o período experimental. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal - UFPI sob protocolo nº 078/12. Os animais foram tratados por via oral na dose 0,25 g.Kg-1 com Garcinielliptone FC e no grupo controle com solução salina durante seis semanas os machos e duas semanas as fêmeas antes do período de acasalamento. Após esse período apenas as fêmeas prosseguiram com a administração durante o acasalamento, gestação e pós-parto. As fêmeas foram observadas diariamente tendo o registro de suas características perceptíveis quanto à fertilização e gestação, procriação e desenvolvimento de seus filhotes. A análise estatística e a confecção dos gráficos e tabelas foram feitas através do programa Graphpad Prism® versão 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na fase pré-acasalamento, todos os animais machos e fêmeas tratadas com GFC não apresentaram nenhum tipo de alteração física ou comportamental em relação ao grupo controle. A administração continuada durante o cruzamento não mostraram alterações relevantes no número de fêmeas prenhes e não prenhes (Fig. 1), visto que efeitos na fertilidade e gestação podem ser úteis na avaliação da toxicidade e permitem observar resultados das consequências funcionais de danos reprodutivos (Tab. 1).

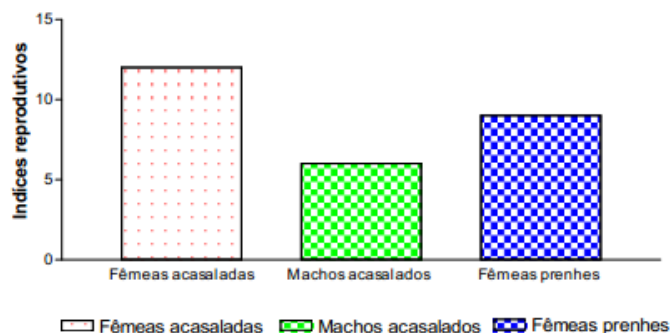


Fig. 1: Índices reprodutivos dos ratos Wistar tratados com GFC (0,25 g.kg-1) extraído da espécie *Platonia insignis* Mart.

Tab. 1: Índices reprodutivos das ratas Wistar tratadas com GFC (0,25g.kg⁻¹) extraído da espécie *Platonia insignis* Mart.

Índices reprodutivos	Animais tratados com GFC
Fêmeas acasaladas (n)	12
Fêmeas prenhes (n)	09
Taxa de acasalamento (%)	75
Taxa de natalidade (%)	96

Na avaliação de toxicidade reprodutiva, o índice de mortalidade é um sinal claro de toxicidade. O tamanho da ninhada é influenciado pelo número de ovócitos viáveis para fertilização, pelas taxas de fertilização e implantação e pela proporção de embriões implantados que sobrevivem até o parto. Um agente químico pode interferir no desenvolvimento de embriões diretamente, ou indiretamente, ao comprometer a capacidade da progenitora em sustentar a prole. (EPA, 1991; EPA, 1996). Observou-se nesse ensaio preliminar que a exposição à substância nas fêmeas prenhes não interferiu na taxa de parturição (75%) e na taxa de fertilização.

Nas fases pré e pós-natal, os órgãos sexuais e o sistema nervoso central que ainda estão se diferenciando, podem ser atingidos por substâncias presentes no sangue materno através da placenta durante a gestação ou através do leite durante a lactação (ZENICK & KLEGG, 1989). O índice de nascimento reflete a relação entre o número de filhotes nascidos vivos e o número total de filhotes nascidos. Assim, entre as fêmeas que pariram, a exposição de ratas ao derivado da *P. insignis* não sofreu interferência neste parâmetro. A relação entre o número de nativos (96,7%) e natimortos (3,3%) também não evidenciou toxicidade significativa, visto que o universo de filhotes vivos é relevante para o estudo (Fig. 2).

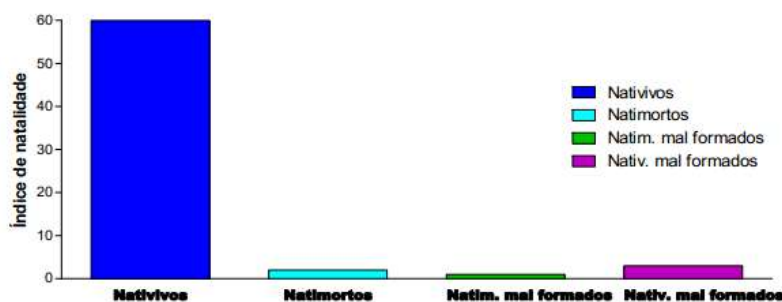


Fig. 2: Índice de natalidade de ratos Wistar provenientes de fêmeas tratadas com GFC (0,25 g.kg-1) extraída da espécie *Platonia insignis* Mart.

Anormalidades estruturais podem ser indicativas de toxicidade de desenvolvimento (US EPA, 1997). No presente estudo tiveram-se dois natimortos descendentes de progenitoras diferentes, em que um deles possuía o corpo mal formado (Fig. 3). Anormalidades morfológicas também foram detectadas em outros três filhotes, dois deles apresentando fendas abertas na região da cabeça (Fig. 4) e um com fenda no dorso.



Fig. 3: Filhote, proveniente de fêmea tratada com GFC (0,25 g.kg⁻¹) extraída da *Platonia insignis* Mart, com má formação morfológica.



Fig. 4: Filhote, proveniente de fêmea tratada com GFC (0,25 g.kg⁻¹) extraída da *Platonia insignis* Mart, com má formação por fenda aberta na cabeça.

CONCLUSÃO

No presente ensaio preliminar dos efeitos de Garcinielliptone FC sobre a reprodução, a administração por via oral do extrato aquoso de *P. insignis* não causou alterações significativas no percentual de fêmeas prenhes e não prenhes e no tamanho da prole; bem como no número de filhotes nascidos vivos, mortos ou mal formados. Vale ressaltar que estudos relacionados à toxicidade reprodutiva pelo GFC nos ratos Wistar continuam sendo realizados através da autópsia dos animais e exame histopatológico sobre os órgãos e tecidos daqueles que receberam tratamento.

REFERÊNCIAS

- BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S. (Ed.). Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Atheneu, 1996. cap. 1.5, p. 60-70.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.33, n.2, p. 179-189, 2000.
- COSTA JUNIOR, J. S. et al. Cytotoxic and leishmanicidal properties of garcinielliptone FC, a prenylated benzophenone from *Platonia insignis*. *Nat Prod Res*, iFirst, p. 1-5, 2012.
- EPA – Environmental Protection Agency. Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. Federal Register, v.61, p. 56274-56322, 1996.
- EPA – Environmental Protection Agency. Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. Federal Register, v.56, p. 63798-638226, 1991.
- LEMÔNICA, I. P. Teratogenese experimental e sua aplicação em humanos. In: SPRITZER, D.T.; SANSEVERINO, M. T. V; SCHULLER-FACCINE, Manual de Teratogenese. Porto Alegre: Ed da Universidade/ UFRGS, p. 19-39, 2001.
- LIMA, M. M. A.; VIEIRA, L. F.; COSTA JUNIOR, J. S. Avaliação da atividade antioxidante de *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae). In: Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, 2., 2007, João Pessoa.
- US EPA. Special report on environmental endocrine disruption: An Effects Assessment and Analysis. EPA/630/R-96/012, Washington, 1997.
- ZENICK, H.; CLEGG, E. D. Assessment of male reproductive toxicity: A risk of assessment approach. In: Principles and methods of toxicology. In: New York: Raven Press, 1989. p. 275 - 309.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental (LAPNEX) pela realização do estudo.

CV09 - Qualidade microbiológica da água obtida de poços e usada para consumo humano na regional IV de Teresina - PI

Paulo Renzo Guimarães Júnior^{1*} (IC); Alan Bruno da Silva Ferreira¹ (IC); Ronaldo Costa² (PQ).

6. Faculdade Aliança – Curso de Bacharelado em Biomedicina

7. Faculdade Aliança – Professor do Curso de Bacharelado em Biomedicina

* Autor principal

prezoguimaraes@hotmail.com

Palavras-chave: Qualidade microbiológica da água. Água de poços. *Escherichia coli*. LACEN PI.

RESUMO

A água é um recurso comum que está se esgotando. Em locais onde não há encanação e tratamento de água, utiliza-se de poços artesianos como fonte de consumo humano. Estes poços são passíveis de contaminação por diversas fontes, em especial, a bactéria *Escherichia coli*. Para diagnosticar a presença dos coliformes no órgão responsável pela qualidade da água é utilizado a metodologia do colilert. O objetivo deste trabalho foi buscar noção sobre a qualidade da água de poços artesianos das cidades contempladas pela regional IV do Siságua. Foi examinado mais de 23.000 fichas referentes aos anos de 2009 a 2010. Após selecionar as águas de poços apenas das cidades situadas na região IV e computados em planilhas eletrônicas, constatou a existência de 243 amostras no ano de 2009, e 188 amostras referentes a 2010. Aproximadamente, 32,92% das fichas tinham coliformes totais e fecais, no ano de 2009. No ano seguinte, 37,76% das fichas relatavam amostras com coliformes totais e fecais. Identificou-se 70 fichas em 2009 referentes ao município de Teresina, e entre estas o percentual de 12,82% das fichas foi encontrado os dois tipos de coliformes. Em 2010 o número de fichas encontrado foi de 50, com 14% de coliformes totais e fecais presente nestas águas. O setor de controle de qualidade de produtos do LACEN-PI, verifica a qualidade física, química e microbiológica da água. Entre estas estão incluídas águas de poços as quais apresentam índices expressivos de contaminação por coliformes.

INTRODUÇÃO

Santos; Wilson (sd), mencionaram que a água é um bem importantíssimo oferecido pela natureza, ao homem, pois utilizamos para atividades diárias, sobretudo para nossa sobrevivência. Águas superficiais raramente estão livres de contaminação, mesmo onde não há atividade humana (SIRIGATE et al., 2005).

Para Brasil (2006), o abastecimento público de água em termos quanti e qualitativos é um problema crescente da humanidade, em função da falta do recurso água e do desgaste da qualidade dos mananciais. Por conta disso, Hirata; Bastos; Rocha (1990), acreditam ser uma opção viável o emprego de poços, cujo Estado de São Paulo, maior utilizador deste recurso, conta mais de 20.000 poços profundos e uma abundância imensurável de poços rasos que fornecem águas para consumo público, uso industrial e irrigação. De acordo com Campos; Cerca de 65% da sua zona urbana é abastecida por poços artesianos e na região metropolitana de São Paulo, cerca de 3 milhões de habitantes recebem água proveniente de poços profundos (SCORSFAVA et al, 2010).

Para o CVE (2008), a ocorrência de surtos por doenças transmitidas através de alimentos e água contaminados caracteriza falha no controle da cadeia de produção deles, os riscos de contaminação podem ser de natureza química, física ou biológica. Em relação a essa há doenças ocasionadas por microorganismos como os vírus, bactéria e parasitas, presentes em fezes humanas e animais, que contaminam a água e apresentam sintomas de diarreia aquosa (SÃO PAULO, 2011).

Na visão de Soto et al. (2007), o melhor método de certificar a qualidade da água para o consumo, consiste em protegê-la dos dejetos animais e humanos, os quais podem conter variedade bacteriana, viral, protozoótica e helmíntica. No meio rural, o risco de se veicular doenças na água segundo Bezerra; Sousa; Pinho (2010), é relativamente alto, em função da possibilidade de contágio bacterianos nas águas, muitas vezes captadas em poços, vedados de forma inadequada e próxima de fontes de contaminação como fossas e áreas de pastagem ocupadas por animais. Lopes et al. (2010), classificam a falta de infraestrutura de saneamento, nos centros urbanos como a principal fonte de contaminação de poços subterrâneos em Minas Gerais. Problemas de saúde podem ser adquiridos com a contaminação de poços por bacterioses como a *Escherichia coli* que levam ao quadro de hipersecreção de líquidos e eletrólitos, além de vômitos, náuseas, cólicas e febre (MURRAY, 2002).

O colilert é um teste que indica a qualidade microbiológica da água indicando a presença ou não de coliformes totais e fecais (IDEXX, 2002). Segundo Kott (2007), os indicadores de poluentes da água mais comumente utilizados são os coliformes, principalmente o grupo dos coliformes fecais ou termotolerantes e os estreptococos fecais. Estes podem ser analisados facilmente com a metodologia do Colilert, teste químico que detecta na água a presença de bactérias da espécie representante da família das Enterobactérias que possuem bacilos gram-negativos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Partindo deste princípio este estudo objetivou verificar através do programa do SISAGUA a qualidade microbiológica da água coletada de poços dos Municípios que abrangem a regional IV Teresina Piauí.

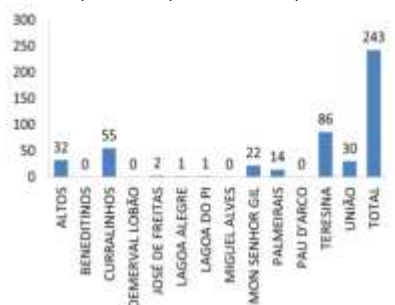
MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho tratou-se de um levantamento de dados que visou a realização de uma pesquisa exploratória e retrospectiva, que proporciona maior familiaridade com o problema, tornando-o mais explícito ou constituindo hipóteses. A pesquisa foi baseada em pesquisa exploratória, objetivando a caracterização inicial do problema, sua classificação e de sua definição, constituindo o primeiro estágio de toda pesquisa científica. Foi desenvolvida com base no Sistema de Dados do programa SISAGUA, que funciona no Piauí na sede do Laboratório Central Dr. Costa Alvarenga LACEN PI. O estudo abordou todas as águas coletadas para a fiscalização sanitária provida de poços nos municípios de Altos, Beneditinos, Curralinhos, Demerval Lobão, José de Freitas, Lagoa Alegre, Lagoa do Piauí, Miguel Alves, MonSenhor Gil, Palmeirais, Pau D'arco, Teresina e União, aos quais fazem parte da regional IV deste programa no Piauí, com sede em Teresina. A abrangência deste estudo levou em consideração os anos de 2009 e 2010, onde coletou-se os resultados das análises apresentadas nas fichas contendo informações a respeito do teste microbiológico realizado pelo LACEN, através de planilha eletrônica pré-montada. Após coleta, foi gerado gráficos estatísticos através do Programa Microsoft Office Excel 2007.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

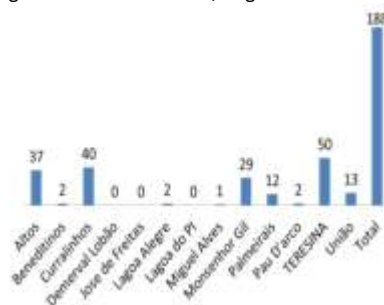
Após verificar as fichas de análises de água foram encontrados no total, pouco mais de 23.000 (vinte e três mil), análises de água pelo Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Costa Alvarenga (LACEN PI), durante os anos de 2009 a 2010. Nestas fichas observou-se análises de água do sistema de abastecimento, poços, cisternas, hemodiálise. Como o foco do trabalho foi a qualidade microbiológica da água de poços, descartou de início, todas as análises que não foram de poços. Após identificar as amostras de poços segregou as fichas que continham dados referentes as cidades que contemplam a regional IV Piauí, centralizada na cidade de Teresina. A partir destas cidades foi coletado os dados, onde obteve também o conhecimento de várias amostras do mesmo poço.

Após toda a segregação realizada, coletou-se dados de 243 amostras referentes ao ano 2009, onde Teresina foi responsável por 86, destas análises, Curralinhos 55, Altos 32, União 30, MonSenhor Gil 22, Palmeirais 14, José de Freitas 2, Lagoa Alegre e Lagoa do Piauí 01 cada, e destas, como pode-se observar no gráfico 01. Já em 2010, 188 amostras que foram analisadas, Teresina contribuiu com 50 amostras, Curralinhos 40, Altos 37, MonSenhor Gil 29, Beneditinos, Lagoa Alegre e Pau D'arco 2 cada, Miguel Alves 1.



* Dados obtidos no setor de controle de qualidade de produtos, do Laboratório Central Dr. Costa Alvarenga LACEN PI.

GRÁFICO 01: Cidades contempladas pela regional IV e suas amostras, 2009.



* Dados obtidos no setor de controle de qualidade de produtos, do Laboratório Central Dr. Costa Alvarenga LACEN PI.

* Jan: janeiro; fev: fevereiro; mar: março; abr: abril; mai: maio; jun: junho; jul: julho; ago: agosto; set: setembro; out: outubro; nov: novembro; dez: dezembro.

GRÁFICO 02: Distribuição de amostras selecionadas durante o ano de 2010.

Em 2009, 71,19% das amostras estavam contaminadas com coliformes, 38,27% tinham presença de coliformes totais, e 32,92% restante, apresentou coliformes totais e termotolerantes, 28,81% estavam livres de contaminação bacteriana, o que é possível visualizar no gráfico 03.

Em estudo da água de poços das escolas municipais realizado na cidade de Itabuna SP foram analisadas 50 amostras, dentre estas, em 41 delas haviam coliformes totais e fecais, 04 apenas coliformes totais e em 05 constatou a ausência (SOTO et. al., 2007). Estes números refletem na contaminação de 82% quanto a presença dos dois tipos de coliformes e a 90% de contaminação se levar em consideração a presença de outros coliformes que não *Escherichia coli*. Esta bactéria possui estreita relação com as fezes do homem o que representa a base do teste para verificação da contaminação por coliformes fecais na água e alimentos, bastante usado em saúde pública (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

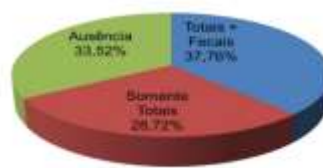
No ano seguinte houve uma redução no número de análises onde constatou-se 188, com contaminação de 66,48% das amostras, sendo que, em 28,72% detectou-se coliformes totais, e em 37,76% continham os dois coliformes, 33,52% estavam livres de coliformes. Apesar da redução do percentual de amostras contaminadas, apontou uma elevação da presença de *Escherichia coli*, presente nos poços analisados, o que preocupa, pois esta bactéria a principal causadora de gastroenterites. A intervenção para melhoria de águas não tratadas, mostrou-se eficiente em controle

feito na cidade de Ibiúma SP, após instalação de filtros dosadores com cloro e flúor, seguido de limpeza e desinfecção dos poços e treinamento de limpeza dos funcionários da escola, das 50 amostras examinadas após os procedimentos descritos, 100% das amostras não tinham nenhum dos coliformes (SOTO et. al., 2007).



* Dados obtidos no setor de controle de qualidade de produtos, do Laboratório Central Dr. Costa Alvarenga LACEN PI.
 * Ausência: Ausência de coliformes totais e fecais; Somente Totais: Presença de coliformes totais e ausência de coliformes fecais; Totais + Fecais: Presença de coliformes totais e de coliformes fecais.

GRÁFICO 03: Qualidade microbiológica das águas de poços de amostras dos municípios da regional IV, no ano de 2009.



* Dados obtidos no setor de controle de qualidade de produtos, do Laboratório Central Dr. Costa Alvarenga LACEN PI.
 * Ausência: Ausência de coliformes totais e fecais; Somente Totais: Presença de coliformes totais e ausência de coliformes fecais; Totais + Fecais: Presença de coliformes totais e de coliformes fecais.

GRÁFICO 04: Qualidade microbiológica das águas de poços de amostras dos municípios da regional IV, no ano de 2010.

CONCLUSÃO

Os coliformes são indicadores da qualidade da água. Em Teresina há um setor no Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN PI), especializado em controle de qualidade de produtos, no qual desenvolve a análise física, química e microbiológica da água. Constatou-se que boa parte das amostras de águas de poços utilizados para o consumo humano nas cidades atendidas pela regional IV do programa Siságua estavam contaminadas com coliformes termotolerantes. A *Escherichia coli* é a bactéria presente nas amostras positivas para estes coliformes, e causa inúmeros problemas à saúde sendo o principal as gastroenterites bacterianas, e pode levar a consequências mais sérias como a septicemia e meningite.

A realização da análise microbiológica é fundamental, para checar a presença dos coliformes, para que possam ser tomadas as medidas de descontaminação microbiológica destes poços. O estudo possibilitou alcançar uma noção a respeito da qualidade microbiológica das águas advindas de poços artesianos, que são fonte de consumo humano principalmente para a população carente e rural.

REFERÊNCIAS

- BEZERRA, Natallyne S.; SOUSA, Maria José G.; PINHO, Antônio Ivanildo. Análise microbiológica de água de cisternas na localidade Cipó dos Tomaz, Município DO CRATO-CE. URCA, 2010. Disponível em: <periodicos.urca.br/ojs/index.php/cadernos/article/view/203/131 >. Acesso às 19:28 horas de 13.11.2011.
- BRASIL. Vigilância e controle da qualidade da água para o consumo humano. BRASÍLIA DF, 2006. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_controle_qualidade_agua.pdf>. Acesso às 08:19 horas de 11.11.2011.
- _____. Fóruns Regionais de Vigilância Sanitária/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/foruns/regionais_visa/lista_trabalhos.pdf>. Acesso às 08:21 horas de 11.11.2011.
- CVE. CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DAS DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ÁGUA E ALIMENTOS. INVESTIGAÇÃO DE SURTOS, - NORMAS E INSTRUÇÕES. Centro de Vigilância Epidemiológica: São Paulo, 2008. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/doc/VEDTA08_manual.pdf >. Acesso às 13:56 horas de 17.11.2011.
- HIRATA, R.C.A.; BASTOS, C.R.A.; ROCHA, G.A.; GOMES, D.C.; IRITANI, M.A. Groundwater pollution risk and vulnerability map of the São Paulo State. In: Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas, 6ª. Porto Alegre. Anais, Porto Alegre, ABAS, 1990. p. 236-46.
- IDEXX. Colilert. IDEXX Laboratories, Inc., One IDEXX Drive Westbrook, Maine, 2011. Disponível em: <www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en_us/water/6406300L.pdf>. Acesso às 15:57 horas de 02.09.2011.
- KOTT, Y. Current concepts of indicator bacteria. In: Hoadley, A. W. & Dutka, B. J. Bacterial indicators, health hazards associated with water, ASTM STP 635. Philadelphia, American Society for Testing and Materials, 1977. p. 3-13.
- LOPES, Laudicéia G.; HOJAIJ, Aparecido; PINTO, Renildo A.; PINTO, Fernanda de R.; AMARAL, Luiz A. do; FERRAUDO, Antônio S. Sazonalidade de indicadores de qualidade de água em poços do município de Jaboticabal – SP. Nucleus, v.7, n.1, abril 2010. <http://www.nucleus.feituverava.com.br/index.php/nucleus/articleview345396>. Acesso às 10:45 horas de 15.11.2011.
- MURRAY, Patrick R. Microbiologia médica. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- SANTOS, Claudia Martins dos; WILSON, Edwing Martin Holguin. QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO NO MUNICÍPIO DE HONÓRIO SERPA: ÊNFASE AO USO DOS AGROTÓXICOS. Faculdade de Pato Branco FADEP, [2008]. Disponível em: <www.bvsde.paho.org/bvstox/fulltext/qualidade.pdf>. Acesso às 15:41 horas de 13.04.2011.
- SÃO PAULO. Secretaria Municipal de Saúde – SMS Coordenação de Vigilância em Saúde – COVISA Gerência do Centro de Prevenção e Controle de Doenças – CCD Vigilância Epidemiológica de Doenças Transmitidas por Alimentos – VEDTA. Alerta epidemiológico: surtos de doenças transmitidas por água e alimentos (DTA). Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo, 2011. Disponível em: <http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/chamadas/alerta_epidemiologico_2011_surtos_de_doencas_transmitidas_por_agua_e_alimentos_1299791339.pdf>. Acesso às 12:56 horas de 02.09.2011.
- SCORSAFAVA, Maria Anita; SOUZA, Arlete de; STOFER, Mônica; NUNES, Claudete Azevedo; MILANEZ, Thaís Valéria. Avaliação físico-química da qualidade de água de poços e minas destinada ao consumo humano. Revista Instituto Adolfo Lutz São Paulo, versão 69 n.º 2, 2010. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552010000200013&lng=pt&nrm=iso>. Acesso às 12:45 horas de 13.09.2011.
- SIRIGATE, Priscila; STADLER, Carlos Cezar; OROSKI, Fabiano Icker; KOVALESKI, João Luis. Gestão da qualidade ambiental da água de mananciais de abastecimento público como estratégia de redução de custos. XXV Encontro Nacional. de engenharia de Produção Abepro PUC – Porto Alegre RS; 29 out a 01 de novembro, 2005. Disponível em: <http://www.pg.utfpr.edu.br/ppgep/Ebook/ARTIGOS2005/E-book%202006_artigo%207.pdf>. Acesso às 08:15 horas de 17.11.2011.
- SOTO, Francisco R. M.; FONSECA, Yara S. K.; RISSETO, Marcia R.; ARINI, Maria de Lourdes B.; MARCHETTE, Daniel S.; CAMARGO, Cristina da Conceição. Programa de saneamento da água de poços rasos de escolas públicas rurais do município de Ibiúma SP. Revista Ciência em Extensão, versão 3, n.2, 2007. Disponível em: <http://ojs.unesp.br/index.php/revista_proexarticleview10426>. Acesso às 20:15 horas de 08.09.2011.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Faculdade Aliança, todos os mestres do curso de Biomedicina, em especial, Ronaldo Costa e Adriana Saraiva dos Reis e à coordenadora Maria Regilda Fernandes por nos auxiliarmos em todo o processo acadêmico. O LACEN - PI por colaborar com o acesso aos seus dados na pessoa da Dra. Symonara Karina Medeiros Faustino, e à Dra. Sandra Regina de Carvalho Nascimento Silva, responsável pelo laboratório de Controle de Qualidade de Produtos que nos receberam de braços abertos.

Realização

PPGCF UFPi
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas



Expositores



Apoio



Conselho Federal de Farmácia
www.cff.org.br

