



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELA
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Sistemas de vetorização/liberação de extratos vegetais em modelos experimentais
de enfisema pulmonar**

RAFAEL LEITE DANTAS

Teresina - Piauí

2014

RAFAEL LEITE DANTAS

**Sistemas de vetorização/liberação de extratos vegetais em modelos experimentais
de enfisema pulmonar**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes
Coorientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Freire de Medeiros

Teresina – Piauí
2014

RAFAEL LEITE DANTAS

**SISTEMAS DE VETORIZAÇÃO/LIBERAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS
EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE ENFISEMA PULMONAR**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes

Curso de Farmácia- Universidade Federal do Piauí (Orientador)

Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira

**Departamento de Produtos Naturais de Farmanguinhos - Fundação Oswaldo Cruz
(Examinador Externo)**

Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho

**Curso de Ciências dos Materiais - Universidade Federal do Piauí
(Examinador Interno)**

Teresina – Piauí

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITORA

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Pedro Vilarinho Castelo Branco

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Regina Ferraz Mendes

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Lina Gomes Santos

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

Dedicatória

Dedico esta dissertação, bem como todas as minhas demais conquistas, a Deus, aos meus avós (José, Rita, Nilton e Josete), aos meus pais (Manuel e Josinete), aos meus irmãos (Daniel e Clívia – amo muito vocês!), aos meus sobrinhos (Gabriel, Mariana e Manuela), aos meus tios (Cláudia, Darlene, Roberto, Rita, Alberto, Alice, Sara e Vicente) e aos meus primos (André, Henrique, Diogo, Bruna, Daniela, Lucas, Samuel e Júlia – nunca esquecerei as nossas brincadeiras e os nossos momentos de alegria!).

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes que, muito mais do que ensinar como trabalhar em laboratório, acompanhar alunos de graduação, ministrar aulas, desenvolver projetos e redigir artigos e patentes, me ensinou sobre a vida;

Ao Prof. Wellington dos Santos Alves, que desde a graduação me orienta nas pesquisas do sistema respiratório (que esta parceria e amizade se perpetuem!);

Aos professores Dr. Rivelilson Mendes de Freitas e Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante que, sempre que solicitados, disponibilizaram reagentes e equipamentos imprescindíveis para a realização deste trabalho;

Aos professores Dr. Stanley Juan Chavez Gutierrez, Dr. Giovanni Rebouças Pinto, Dra. Lécia Maria da Silva Freire e, em especial, a Dra. Maria das Graças Freire de Medeiros, pela amizade e colaborações;

Aos mestrandos Érik Reis, Sean Telles, Rusbene Bruno, George Oliveira, Antônio Luis, Paula Batista, Antonia Amanda, Giselle Zayra, Laisa Lis e Vânia Lima, pela amizade e colaborações;

Aos graduandos Laynne Leal, Neylon Campelo, José Júnior, Khetyma Fonseca, Mariana Soares, Amanda Goudinho e Laís Iasmin, foi um prazer ter vocês ao meu lado!;

Aos integrantes do GEUM, do LAPNEX e do NTF. Em especial, a equipe de limpeza e manutenção Maria Francisca Silva, Orlando Cardoso, Ary dos Santos, Francisco Sena e Maria Ivelta Campos, pela ajuda em todos os momentos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí - FAPEPI, pelo auxílio a minha formação científica com concessão de bolsas e financiamento de projetos;

*À Coordenação do Mestrado em Ciências Farmacêuticas, nas pessoas do coordenador **Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira** e dos secretários **Rusniel Fonseca** e **Suyanne Kassia**, pela presteza que sempre fui recebido e pela atenção a mim dada;*

*Aos **animais** que fizeram parte desta pesquisa e que, inconscientemente, doaram o material para que essa pesquisa tenha sido realizada.*

Muito obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xiii
LISTA DE TABELAS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3. REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 A DPOC e o enfisema pulmonar.....	20
3.2 Mecanismos patogênicos associados ao enfisema.....	21
3.2.1 A ceramida e a apoptose celular.....	21
3.2.2 Fator de crescimento placentário.....	22
3.2.3 <i>Prothymosin</i> α	23
3.2.4 Receptor <i>toll like 4</i> e a IL-17.....	24
3.2.5 Fibrilina-1.....	25
3.2.6 Proteína D do surfactante.....	26
3.3 Alternativas terapêuticas relevantes para o enfisema pulmonar.....	26
3.4 Fitoterapia no enfisema: o guaco.....	28
3.5 <i>Mikania glomerata</i> Spreng.....	29
3.5.1 Família, gênero e morfologia.....	29
3.5.2 Atividade farmacológica.....	30
3.5.3 Segurança do extrato da <i>M. glomerata</i>	32
3.6 Entrega de formulações por via pulmonar.....	32
3.7 Planejamento e otimização de experimentos.....	33
3.7.1 Planejamento fatorial.....	33
3.8 Perspectivas para o enfisema pulmonar: biomarcadores e células-tronco.....	34
REFERÊNCIAS	36

4. CAPÍTULO I: Modelo animal de enfisema pulmonar: papaína pulverizada ou fumaça de cigarro?	47
Resumo.....	48
Abstract.....	49
Introdução.....	50
Materiais e métodos.....	51
Resultados e discussões.....	55
Conclusão.....	63
Referências.....	65
5. CAPÍTULO II: <i>Mikania glomerata</i> Spreng.: Desenvolvimento de uma formulação para entrega pulmonar	70
Resumo.....	71
Abstract.....	72
Introdução.....	73
Materiais e métodos.....	75
Resultados e discussões.....	80
Conclusão.....	89
Referências.....	91
6. CAPÍTULO III: Avaliação do efeito da <i>Mikania glomerata</i> Spreng. ao ser pulverizada no pulmão de animais com enfisema induzido por papaína	97
Resumo.....	98
Abstract.....	99
Introdução.....	99
Materiais e métodos.....	101
Resultados e discussões.....	104
Conclusão.....	111
Referências.....	112
CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA	116
ANEXOS	

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

®	Marca registrada
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AHE	Ágar <i>enteric hecktoen</i>
AP-1	Fator de transcrição AP-1
APT	Água peptonada
CD	Células dendríticas
CEP	Células epiteliais do pulmão
CG	Cromatografia gasosa
CONCEA	Conselho nacional de controle de experimentação animal
CRD	Carboidratos C-terminal
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
DPPH•	Radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
eONS	Isoformas III da óxido nítrico sintetase
EPM	Erro-padrão da média
EPP	Elastase pancreática de porco
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FECGH	Fator estimulador de colônias de granulócitos humanos
FCEV	Fator de crescimento do endotélio vascular
FCH	Fator de crescimento de hepatócitos
FCP	Fator de crescimento placentário
FN-k β	Fator nuclear kappa β
FNT	Fator de necrose tumoral
FPF	Fração de partícula fina
HATs	Histonas acetiltransferases
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IL	Interleucina
iONS	Isoformas II da óxido nítrico sintetase
JNK	Via c-Jun N-terminal quinase

LBA	Lavado broncoalveolar
LIA	Ágar lisina ferro
LST	Caldo Lauril Sulfato Triptose
LTB4	Leucotrieno B4
MMP	Matriz metaloproteinase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
Nox	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase
ON	Óxido nítrico
ONS	Óxido nítrico sintetase
PBS	Solução Salina Fosfatada Tamponada
PEG	Polietilenoglicol
PCA	Ágar padrão para contagem
PCB	Proteína <i>CREB-binding</i>
PLGA	Poli (L- ácido láctico-co-ácido glicólico)
PNS	Polimorfismo de nucleotídeo simples
PQAM	Proteína quinase ativada por mitógeno
PQM	Proteína quimiotática de monócitos
ProT	<i>Prothymosin α</i>
PT2	Pneumócitos tipo II
REDOX	Redução/oxidação
RNA	Ácido ribonucleico
ROIs	Intermediários reativos de oxigênio
RRPC	Receptor de resposta precoce ao crescimento
RTL	Receptor <i>toll like</i>
RTL4 ⁻	Nocautê gênico do RTL4
SP	Proteína do surfactante
SS	Ágar salmonella-shigela
Th	Células T helper
TGF	Fator de transformação de crescimento
TSI	Ágar três açúcares ferro
UFC	Unidade de formação de colônias
VEF1	Volume expiratório forçado em um segundo

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão

Ilustração 1	Figura - Características do enfisema pulmonar.....	20
Ilustração 2	Figura – <i>Mikania glomerta</i> Spreng.....	29
Ilustração 3	Figura - Estrutura química da cumarina, 2H-1benzopirran-2-ona.....	31
Ilustração 4	Estrutura química do ácido caurenóico.....	31

Capítulo I

Ilustração 1	Figura - Ooforectomia das ratas.....	52
Ilustração 2	Figura - Modelos de enfisema com cigarro e papaína.....	53
Ilustração 3	Figura - Lavado broncoalveolar.....	54
Ilustração 4	Figura - Contagem total de células do LBA.....	56
Ilustração 5	Figura - Contagem de neutrófilos do LBA.....	57
Ilustração 6	Figura - Contagem de macrófagos do LBA.....	58
Ilustração 7	Figura - Contagem de linfócitos do LBA.....	59
Ilustração 8	Figura - Análise histopatológica dos experimentos realizados.	60
Ilustração 9	Figura - RX dos grupos avaliados.....	62

Capítulo II

Ilustração 1	Figura - Forma radicalar e não radicalar do DPPH.....	78
Ilustração 2	Figura - Rendimento das secagens por aspersão.....	81
Ilustração 3	Figura - Teor de umidade das secagens por aspersão.....	83
Ilustração 4	Figura - Análise macroscópica dos extratos após seis meses da secagem.....	84
Ilustração 5	Figura - Análise da eliminação do radical DPPH.....	86
Ilustração 6	Figura - Análise do teor de cumarina.....	87

Capítulo III

Ilustração 1	Figura - Laringoscópio artesanal, microspray e esquema de pulverização.....	102
Ilustração 2	Figura - Lavado broncoalveolar.....	103
Ilustração 3	Figura - Contagem total de células do LBA.....	105
Ilustração 4	Figura - Sequência cronológica do recrutamento celular.....	106
Ilustração 5	Figura - Contagem de neutrófilos do LBA.....	107
Ilustração 6	Figura - Contagem de macrófagos do LBA.....	108
Ilustração 7	Figura - Contagem de linfócitos do LBA.....	109
Ilustração 8	Figura - Análise histopatológica dos experimentos realizados.	110

LISTA DE TABELAS**Capítulo II**

Tabela 1	Planejamento fatorial dos experimentos realizados	76
Tabela 2	Temperaturas de saída dos experimentos	85

Sistemas de vetorização/liberação de extratos vegetais em modelos experimentais de enfisema pulmonar. RAFAEL LEITE DANTAS. Orientador: Dr. Lívio César Cunha Nunes. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Curso de Farmácia, UFPI, 2013.

RESUMO

O enfisema pulmonar é uma patologia com carência de estratégias de tratamento eficazes. Como forma de tentar reverter esse cenário, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma formulação a partir da *Mikania glomerata* Spreng para o tratamento dessa doença. Essa planta é amplamente utilizada no tratamento de alergias e inflamações, particularmente do sistema respiratório. O efeito do tratamento com a *M. glomerata* foi avaliado em um modelo animal de enfisema. Devido a algumas desvantagens apresentadas nos modelos de enfisema em animais, fez-se uma adaptação no modelo de enfisema com papaína e, então, o comparou com o modelo de enfisema com inalação de fumaça de cigarro. Os resultados dos estudos com animais evidenciaram que o modelo de enfisema com pulverização de papaína mostrou-se mais adequado para o estudo isolado do enfisema do que o com cigarro. No modelo com pulverização de papaína foi observado um maior recrutamento neutrofílico e destruição parenquimatosa e uma menor quantidade de metaplasia de células caliciformes, deposição de colágeno e muco. Na análise do efeito da castração sobre o desenvolvimento do enfisema, não foram encontradas diferenças significativas. Dessa forma, o modelo de enfisema com pulverização de papaína se mostra uma ferramenta útil, particularmente, para o estudo de lesão proteolítica e inflamatória. A formulação para o tratamento dos animais foi desenvolvida em um *Spray dryer*, pois esse fornece pós com as características necessárias para a entrega pulmonar. No entanto, como esse aparelho opera em altas temperaturas, uma formulação por liofilização foi desenvolvida para servir de parâmetro. Para isso, foi realizado um planejamento fatorial para avaliar a influência da temperatura de entrada e da percentagem de adjuvante de secagem. Na análise de UV, utilizou-se a cumarina como marcador. Também foi avaliado a atividade antioxidante, pelo método de eliminação do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•), e a análise microbiológica dos produtos acabados. Os resultados evidenciaram uma perda de atividade antioxidante quando a secagem foi realizada com temperatura de entrada de 170°C e a preservação das características físicas, a longo prazo, nos extratos secos com 30% de Aerosil®200 como adjuvante de secagem. Diante disso, podemos concluir que o melhor método de secagem por aspersão utiliza 30% de Aerosil®200 e uma temperatura de entrada de 140°C. Ficou evidente, ainda, que a preservação do teor de cumarina no extrato seco por aspersão, se deve, provavelmente, a microencapsulação promovida pelo Aerosil®200. Pôde-se constatar que a secagem por aspersão e liofilização, mantiveram, estatisticamente, a mesma população microbiológica. A utilização do extrato seco da *M. glomerata* no tratamento do enfisema pulmonar mostrou-se muito eficiente, uma vez que houve uma diminuição significativa no recrutamento neutrofílico e na contagem total de células. Outros resultados evidenciaram um incremento, proporcional, no recrutamento de macrófagos no grupo tratado com a planta, o que pode ocorrer devido a um acúmulo de extrato seco de *M. glomerata* no pulmão. Dessa forma, existe a necessidade de otimizar algumas características do extrato seco (como a biodegradabilidade) e a dose entregue sem, contudo, afetar a eficácia de seu efeito terapêutico.

Palavras-chave: Enfisema pulmonar; *Mikania glomerata*; Modelos Animais; Ovariectomia; Papaína.

Systems of vectorization/drug delivery of plant extract in experimental models of pulmonary emphysema. RAFAEL LEITE DANTAS. Advisor: Dr. Lívio César Cunha Nunes. Master's dissertation. Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences. Center for Health Sciences. Pharmacy course, 2013.

ABSTRACT

Pulmonary emphysema is a disease with a lack of effective treatment strategies. In an attempt to reverse this scenario, the present study aimed to develop a formulation from *Mikania glomerata* Spreng for the treatment of this disease. This plant is widely used to treat allergies and inflammation, particularly of the respiratory system. The effect of treatment with *M. glomerata* was evaluated in an animal model of emphysema. Due to some disadvantages of animal models of emphysema, was performed an adaptation in the papain-induced experimental emphysema model and then compared it to the cigarette smoke-induced emphysema model. The results of animal studies have shown that the animal emphysema model with spraying papain was more suitable for the isolated study of emphysema than the cigarette smoke-induced emphysema model. In the spraying papain model was observed increased neutrophil recruitment and parenchymal destruction and fewer goblet cell metaplasia, deposition of collagen and mucus. Analyzing the effects of castration on the development of emphysema, no significant differences were found. Thereby, the spraying papain model proves to be useful, particularly for the study of proteolytic and inflammatory injury. Formulation for the treatment of animals was performed in a spray dryer, as this equipment provides powders with the necessary characteristics for the pulmonary delivery. However, since this equipment operates at high temperatures, a formulation was developed by lyophilization as parameter. For this, a factorial design was conducted to evaluate the influence of the inlet temperature and the percentage of glidant. In the analysis of UV was used as a marker coumarin. We also assessed the antioxidant activity by the method of elimination of free radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH •), and microbiological analysis of finished products. The results showed a loss of antioxidant activity when drying was performed with inlet temperature of 170°C and long-term preservation of the physical characteristics in dry extracts with 30% Aerosil®200 as a glidant. Therefore, we conclude that the best method of spray drying uses 30% of Aerosil®200 and an inlet temperature of 140°C. Besides, the preservation of the coumarin content of the spray dried extract is probably promoted by Aerosil®200 microencapsulation. It could be observed that the spray drying and freeze drying, remained statistically the same microbial population. The use of dry extract of *M. glomerata* in the treatment of pulmonary emphysema proved to be very effective, since was found a significant reduction in neutrophil recruitment and total cell count. Other results showed an increase, proportionally, in the recruitment of macrophages in the group treated with the plant, which can occur due to an accumulation of dry extract of *M. glomerata* in the lung. Thus, there is a need to optimize certain characteristics of dry extract (such as biodegradability) and the dose delivered without, however, affecting the efficacy of therapeutic effect.

KEYWORDS: Pulmonary Emphysema; *Mikania glomerata*; Animal Models; Ovariectomy; Papain.

1. INTRODUÇÃO

O entendimento dos mecanismos patogênicos de uma doença e o consequente desenvolvimento de uma nova opção terapêutica, muitas vezes, alteram as estimativas de crescimento de uma patologia. As estimativas de crescimento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), entretanto, continuam dentro do esperado. Se assim continuar, a DPOC será a terceira principal causa de morte no mundo em 2020 (YOSHIDA; TUDER, 2007).

Dentre os esforços para reverter esse quadro, podemos destacar os estudos que desenvolveram e/ou aprimoraram modelos pulmonares de enfisema em animais. Esses modelos são ferramentas que possibilitam a análise de forma isolada de determinadas vias moleculares, o que permite o melhor entendimento do complexo mecanismo multifatorial da doença e, principalmente, possibilitam a compreensão dos eventos primários (ROBBESOM et al., 2007).

Hoje, já são conhecidos muitos dos mecanismos moleculares envolvidos com a evolução das alterações patológicas iniciais da DPOC. Diante disso, esses mecanismos serviram de base para o desenvolvimento desta pesquisa. Nesta dissertação, intitulada: Sistemas de vetorização/liberação de extratos vegetais em modelos experimentais de enfisema pulmonar, foram descritos experimentos que visam, de alguma forma, acrescentar novos dados aos mecanismos patogênicos do enfisema e, concomitantemente, despertar a atenção e mostrar as possibilidades do desenvolvimento de novas formulações para entrega pulmonar a partir de plantas medicinais.

Dentre as várias plantas medicinais conhecidas, a *Mikania glomerata* Spreng foi escolhida em virtude de sua ampla utilização em situações alérgicas e inflamatórias, particularmente do sistema respiratório. Existem evidências pré-clínicas de sua ação broncodilatadora, anti-inflamatória, antiespasmódica e na inibição da inflamação imunológica (FALCÃO et al., 2005; GASPARETTO et al., 2010; CZELUSNIAK et al., 2012). Além disso, é uma planta que integra a lista dos 12 fitoterápicos de interesse do Sistema Único de Saúde (SUS) (RODRIGUES, SANTOS; AMARAL, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Desenvolver sistemas de vetorização/liberação de extratos vegetais em modelos experimentais de enfisema.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e otimizar uma formulação para entrega pulmonar;
- Realizar a caracterização das formulações desenvolvidas, comparando as características das partículas obtidas por liofilização com as obtidas por *spray dryer*;
- Desenvolver/otimizar modelos de enfisema em ratos;
- Avaliar a influência da ausência dos hormônios sexuais femininos na proteção pulmonar;
- Avaliar o tratamento com as formulações obtidas nos modelos desenvolvidos/otimizados.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A DPOC e o enfisema pulmonar

A DPOC é uma doença heterogênea caracterizada pela obstrução crônica e não totalmente reversível do fluxo aéreo (MANNINO; BUIST, 2007). Cada um dos componentes da DPOC, o que inclui o enfisema pulmonar, a doença das pequenas vias aéreas e a bronquite crônica, contam com características específicas que contribuem para a redução do volume expiratório forçado em um segundo (VEF1) (YOSHIDA; TUDER, 2007).

Dos componentes da DPOC, o principal é o enfisema pulmonar (ISHII et al., 2011). O enfisema é caracterizado pela destruição das paredes alveolares, pelo alargamento permanente dos espaços aéreos distais aos bronquíolos terminais e pela perda de elasticidade do parênquima pulmonar, ilustração 1 (ROSENBLOOM; ABRAMS; MECHAM, 1993; KIELTY; SHERRATT; SHUTTLEWORTH, 2002; BARR et al., 2010).

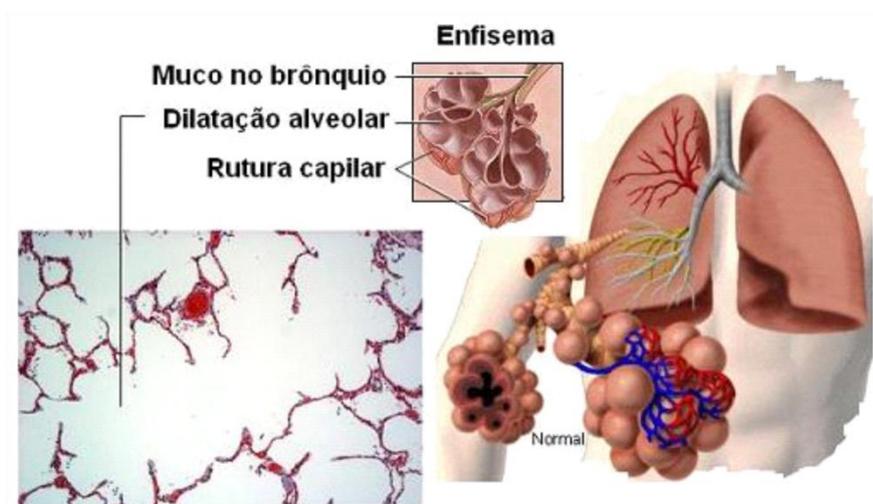


Ilustração 1: Características do enfisema pulmonar. Adaptada de West (2011).

Além da DPOC ser uma doença com mecanismos patogênicos heterogêneos, esses mecanismos não são totalmente compreendidos. Isso acaba se refletindo na ausência de tratamentos eficazes, o que favorece a alta mortalidade e morbidade que são encontradas. Em 2012, a DPOC foi a quarta principal causa de morte no mundo (AGUSTI; SOBRADILLO; CELLI, 2011; DECRAMER, 2012).

3.2 Mecanismos patogênicos associados ao enfisema

Vários insultos, como a fumaça do cigarro, induzem a produção de quimiocinas e outros quimioatrativos, tais como a interleucina-8 (IL-8), a proteína quimiotática de monócitos-1 (PQM-1) e o leucotrieno B4 (LTB4). Esses quimioatrativos promovem o acúmulo de células inflamatórias no pulmão. Essas células, principalmente os neutrófilos e os macrófagos, produzem citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (FNT)- α , IL-1 β , IL-6 e espécies reativas de oxigênio (ERO); em particular, o ânion superóxido (RUBIO et al., 2004; FORONJY et al., 2006; KINOSHITA et al., 2007). Além disso, liberam proteinases, incluindo as elastases e a matriz metaloproteinase-9. Essas citocinas e proteinases, por fim, contribuem para a degradação dos componentes da matriz extracelular e, eventualmente, para o desenvolvimento do enfisema (CALVERLEY; RENNARD, 2007).

Embora níveis aumentados de óxido nítrico (ON) (BRINDICCI et al., 2005) e da nitratação de proteínas (RICCIARDOLO et al., 2005) tenham sido encontrados em pacientes com DPOC, as isoformas II (iNOS) e III (eNOS) da óxido nítrico sintetase (ONS) não se mostraram necessárias para a indução do enfisema em um modelo pulmonar de enfisema induzido por elastase (BOYER et al., 2010).

Todos esses achados, que compõem a hipótese protease/ antiprotease e a hipótese oxidante/anti-oxidante, têm sido o conceito dominante na patogênese do enfisema (ELIAS; LEE, 2005). Contudo, os agentes anti-inflamatórios ou anti-oxidantes somente reduzem os sintomas, eles não afetam o declínio da VEF1 (CALVERLEY; RENNARD, 2007). Dessa forma, outros mecanismos patogênicos devem estar envolvidos com o desenvolvimento do enfisema. Além disso, embora o ato de fumar seja considerado o mais importante fator de risco para o enfisema, apenas 15-20% dos fumantes realmente desenvolvem a doença (FLETCHER; PETO, 1977; PAUWELS et al., 2012). Isso sugere que a susceptibilidade para a DPOC para cada indivíduo é, pelo menos em parte, determinada geneticamente (PATEL et al., 2008).

Como forma de descobrir novos alvos potenciais para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra o enfisema, nos últimos anos, várias pesquisas têm sido realizadas. Essas pesquisas geram hipóteses que podem elucidar o desenvolvimento da patologia.

3.2.1 A ceramida e a apoptose celular

Uma dessas hipóteses demonstra que a apoptose de células estruturais do pulmão é um evento primário e significativo na patogênese do enfisema. A apoptose contribui para o acúmulo de proteases locais que podem, em seguida, gerar um *feedback* de degradação nas proteínas da matriz do septo alveolar exposto. Esses eventos, podem ser confirmados através do bloqueio do fator de crescimento do endotélio vascular (FCEV) e pela administração intrapulmonar de caspase 3 ativada. Nesse contexto, destacamos o papel da ceramida. A ceramida é um segundo mensageiro regulador de esfingolipídios que coordena as respostas ao stress, modula as respostas proliferativas e oxidativas e é um potente indutor de apoptose. A molécula é produzida por uma variedade de tecidos em resposta a uma série de estímulos, incluindo endotoxinas, stress oxidativo e citocinas. Foi encontrado que as ceramidas pulmonares se mostram aumentadas e qualitativamente alteradas nos tecidos pulmonares de indivíduos com enfisema induzido por fumaça de cigarro. Corroborando com esses dados, foi observado que a instilação pulmonar de ceramida é indutora de enfisema em camundongos. Além disso, a inibição das enzimas que controlam a síntese da ceramida previne a apoptose de células do alvéolo, o estresse oxidativo e o enfisema em camundongos com bloqueio do FCEV. Outro ponto importante é que a estimulação do 1-fosfato de esfingosina, lisofosfolipídio que inibe a ceramida, previne a apoptose no pulmão (ELIAS; LEE, 2005).

3.2.2 Fator de crescimento placentário

Ainda em relação à apoptose celular, foi descoberto que o fator de crescimento placentário (FCP) induz a apoptose de células epiteliais do pulmão (CEP) e inibe a proliferação celular (TSAO et al., 2004). O FCP pertence a uma família do FCEV e sua principal função biológica é promover a angiogênese através do FCEV-1 (DE FALCO, 2012; DEWERCHIN; CARMELIET, 2012). O FCP é expresso na placenta, coração, pulmão, tireóide, cérebro e músculo esquelético (DIPALMA et al., 1996).

Foi descoberto que, em ratos, a fumaça de cigarro aumenta a expressão do FCP no pulmão (TSAI; CHIEN, 2012). Além disso, camundongos transgênicos com superexpressão do FCP desenvolvem o fenótipo do enfisema (TSAO et al., 2004). Já os camundongos com bloqueio gênico do FCP, ao serem estimulados com elastase pancreática de porco (EPP), não desenvolvem esse fenótipo (SHIH et al., 2009).

Corroborando com os resultados em animais, foi encontrado que pacientes com DPOC apresentam níveis maiores de FCP no soro e no lavado broncoalveolar (LBA).

Essa variação no nível do FCP, também é inversamente relacionada com a função pulmonar (CHENG et al., 2008).

Essa participação do FCP na patogênese do enfisema induzido por EPP, provavelmente, ocorre através do estímulo ao receptor de resposta precoce ao crescimento-1 (RRPC-1). Além disso, o FCP ativada as vias c-Jun N-terminal quinase (JNK) e proteína quinase ativada por mitógeno (PQAM) p38, que também estão diretamente envolvidas com o desenvolvimento da doença (HOU et al., 2013).

Como nota, os estudos de apoptose induzidas pelo FCP associados aos estudos de apoptose induzidas pela ceramida mostram um provável mecanismo de interação entre essas duas vias. Nelas, ocorre a participação crucial do FCEV no desenvolvimento do enfisema. Entretanto, ainda não existem estudos que mostrem essa relação. Além desses estudos com o FCP e a ceramida, outras pesquisas também ajudam a elucidar a patogênese do enfisema.

3.2.3 *Prothymosin α*

A *Prothymosin α* (ProT) é uma proteína nuclear ácida que possui diversas funções intracelulares e extracelulares que estão envolvidas na proliferação, apoptose, stress oxidativo, imunomodulação e acetilação (WU; SHIAU; LIN, 1997; EVSTAFIEVA et al., 2003; LETSAS; FRANGOU-LAZARIDIS, 2006; MOSOIAN, 2011; IOANNOU et al., 2012; UEDA; MATSUNAGA; HALDER, 2012). Essa proteína nuclear pode acetilar a histona H1 do *linker* (KARETSOU et al., 1998; ZAKHAROVA et al., 2011) e histonas do núcleo (COVELO et al., 2006), o que modula a estrutura da cromatina. Além disso, pode interagir com duas diferentes histonas acetiltransferases (HATs): proteína *CREB-binding* (PCB) e p300 (COTTER; ROBERTSON, 2000; SUBRAMANIAN et al., 2002). Através da interação com a PCB, a ProT estimula a transcrição dependente de AP-1 e do fator nuclear kappa β (FN-k β) (KARETSOU et al., 2002).

Particularmente sob exposição à fumaça de cigarro, a ProT aumenta a acetilação de histonas e do FN-k β , o que ocasiona o aumento da matriz metaloproteinase 2 (MMP2) e 9 (MMP9). Além disso, a superexpressão da ProT no pulmão está correlacionada com a gravidade do enfisema em pacientes. Em modelos animais, camundongos transgênicos homozigotos para ProT desenvolvem alargamento espontâneo do espaço aéreo e destruição da parede alveolar característicos do enfisema. Os camundongos heterozigotos desenvolvem, apenas, leves ampliações do espaço

aéreo. No entanto, ao serem estimulados com fumaça de cigarro, ocorre aumento significativo da incidência e gravidade do enfisema com aumentos concomitantes na expressão da ProT (SU et al., 2013).

3.2.4 Receptor *toll like 4* e a IL-17

Muitos estudos indicam que os receptores *toll like* (RTLs) desempenham papéis críticos no desenvolvimento e na resolução do enfisema. Os RTLs podem iniciar e orquestrar a resposta imunitária inata e adaptativa. Além disso, funcionam como sensores de danos e estão envolvidos com várias doenças inflamatórias não-infecciosas, tais como a síndrome do desconforto respiratório agudo, a asma e a DPOC (ZHANG et al., 2006; LEE et al., 2007).

Dentre os RTLs, o RTL4 e o RTL2 são os que desempenham um papel proeminente nas interações gene-ambiente, as quais são relevantes para os fenótipos da DPOC. Isso ocorre porque a interação entre a carga microbiana e o sistema imunológico é um fator determinante para a função imune e para a susceptibilidade a asma/enfisema (VERCELLI, 2010).

Foi encontrado que uma mutação no TLR4 resulta em enfisema através da regulação positiva da NADPH oxidase (Nox) 3 nos pulmões e nas células endoteliais, o que provoca um aumento nas atividades oxidante e elastolítica (ZHANG et al., 2006). Tem sido demonstrado que a redução/oxidação (redox) regula a polarização da célula T (GILL; TSUNG; BILLIAR, 2010) e que o acúmulo de ERO é crítico para a diferenciação de células Th *naive* em Th1 ou Th17. As células Th17 desempenham um papel importante na inflamação e em doenças como o enfisema (INOUE et al., 2006; WON et al., 2010).

A IL-17, além de desempenhar um papel vital em doenças autoimunes como um importante mediador pró-inflamatório que promove a produção de muitas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (HONG; LEE, 2010), promove o crescimento de células epiteliais das vias aéreas (INOUE et al., 2006). Isso é relevante devido o desenvolvimento do enfisema possuir um forte caráter autoimune (LEE et al., 2007), o que é fundamentado pela descoberta de que folículos linfáticos contendo células dendríticas (CD) e células Th1 estão presentes no parênquima do pulmão enfisematoso (CALVERLEY; RENNARD, 2007).

Foi observado que o TGF- β 1 e a IL-6 demonstram ser necessários para a diferenciação de células T *naive* em células Th17 em camundongos (KORN et al.,

2009). Além disso, foi verificado que a IL-23 estabiliza e aumenta a população de células Th17 (MCKENZIE; KASTELEIN; CUA, 2006) e que a IL-17 é um indutor importante da expressão de IL-6. Em outras palavras, existe um ciclo de retroalimentação que mantém o nível da IL-17, o que mantém a infiltração de células Th17 no pulmão (KISHIMOTO, 2005).

Grande parte dessas observações foi fundamentada após estudos em camundongos com nocaute gênico do RTL4 (RTL4⁻). Nesses, os níveis de expressão de IL-17, IL-6 e IL-23 são todos deprimidos, o que resulta em atenuação na infiltração de células Th17 no pulmão. Além disso, o tratamento de camundongos RTL4⁻ com IL-17 exógena aumenta a fosforilação da MAP quinase p38 e a expressão do AP-1, o que diminui os níveis de apoptose e reverte o enfisema pulmonar em camundongos RTL4⁻ (WANG et al., 2011).

3.2.5 Fibrilina-1

A rede de fibras elásticas é um elemento estrutural importante no parênquima pulmonar e é, em grande parte, responsável pelas propriedades de recolhimento elástico do pulmão (ROSENBLUM; ABRAMS et al., 1993; KIELTY; SHERRATT et al., 2002). As fibras elásticas são compostas de microfibrilas, que variam de 10-12nm e estão localizadas em torno da elastina amorfa (ROBINSON; GODFREY, 2000; KIELTY et al., 2002). Dentre os componentes das fibras elásticas, o principal é a elastina. Ela tem atraído muita atenção nos estudos sobre enfisema, pois a substituição de aminoácido no seu gene tem sido associada à DPOC (KELLEHER et al., 2005).

Nesse contexto, podemos destacar o papel da fibrilina-1, uma vez que essa é o principal componente da parte microfibrilar das fibras elásticas, embora outros componentes estejam presentes, dentre os quais podemos citar outras fibrilinas, (ZHANG et al., 1994; ROARK et al., 1995; YANAGISAWA et al., 2002) glicoproteínas associadas a microfibrilas, (GIBSON et al., 1986; GIBSON; KUMARATILAKE; CLEARY, 1989; GIBSON et al., 1996) e emilins (BRESSAN et al., 1993; DOLIANA et al., 1999; COLOMBATTI et al., 2000).

Outro dado importante que destaca a participação da fibrilina-1 é o fato de o desenvolvimento do enfisema ter sido observado em pacientes com síndrome de Marfan. Essa síndrome é caracterizada por ser uma doença autossômica causada por mutações no gene que codifica a fibrilina-1 (COLLOD-BÉROUD; BOILEAU, 2002; JACOBS et al., 2002; PYERITZ; DIETZ, 2003). Em camundongos, a mutação do gene

da fibrilina-1 resulta no desenvolvimento de enfisema que é, em muitos aspectos, semelhante ao observado em humanos (PEREIRALRZ et al., 1997; KIELTY et al., 1998; GAYRAUD et al., 2000).

Entretanto, a parte mais relevante dos estudos com a fibrilina-1 foi realizada no parênquima pulmonar de pacientes que, embora sem manifestações clínicas, apresentavam alterações microscópicas do enfisema. Nesses pacientes, foi possível estabelecer uma associação significativa entre a fibrilina-1 e os três parâmetros morfométricos mais importantes para o enfisema, a citar: a destruição alveolar, o alargamento do espaço aéreo e as alterações morfológicas associadas à doença. Em adição, foi verificado que, no estágio inicial do enfisema, as outras moléculas da matriz extracelular (laminina e colágeno tipo I e IV) não estavam alteradas (ROBBESOM et al., 2007).

3.2.6 Proteína D do surfactante

O surfactante é formado por proteínas (SP) hidrofóbicas (SP-B e SP-C) e hidrofílicas (SP-A e SP-D). Enquanto as proteínas hidrofóbicas baixam a tensão superficial do alvéolo, as proteínas hidrofílicas medeiam à função de defesa. Dessa forma, no que se refere ao estudo do enfisema, são as proteínas hidrofílicas que interessam. Essas proteínas são colectinas (colágeno-lectinas) que consistem em quatro domínios estruturais, incluindo um domínio de colágeno e um domínio de reconhecimento de carboidratos C-terminal (CRD). O CRD medeia interações com o patógeno, mediando, assim, a fagocitose celular. As colectinas também se ligam aos receptores de superfície dos macrófagos alveolares e, principalmente, aos pneumócitos tipo II. Além disso, foi descoberto que camundongos com nocaute gênico da SP-D desenvolvem enfisema pulmonar (HARTL; GRIESE, 2006).

Ratificando esses resultados, foi encontrado que a concentração de SP-D no líquido broncoalveolar de humanos está correlacionada com a limitação do fluxo aéreo (SIN et al., 2008). Esse resultado, observado em duas populações distintas, ocorre devido a um polimorfismo de nucleotídeo simples (PNS) da SP-D. A presença do alelo C em rs721917 resulta na substituição da Met por Thr na posição 11 da SP-D, o que está relacionado com a suscetibilidade ao enfisema. Outrossim, a concentração sérica de SP-D prediz o genótipo da SP-D e indica a suscetibilidade à doença (ISHII et al., 2011).

3.3 Alternativas terapêuticas relevantes para o enfisema pulmonar

Dentre as opções terapêuticas que estão sendo desenvolvidas contra o enfisema, a mais promissora é a que utiliza o fator de crescimento de hepatócitos (FCH). Nos pulmões de animais de laboratório, o FCH age como mitogênico, morfogênico e protetor pulmonar. Esse efeito é desempenhado através da fosforilação do c-Met, um receptor tirosina quinase, e ocorre após lesão (OHMICHI; MATSUMOTO; NAKAMURA, 1996; YAMADA et al., 2000; SAKAMAKI et al., 2002) ou durante o desenvolvimento pulmonar (OHMICHI et al., 1998).

O FCH é o mais promissor tratamento porque a sua administração em ratos com enfisema induzido por elastase, sobretudo por meio das vias aéreas, induz a migração de células-tronco derivadas da medula óssea (CD34 (+) e de c-kit (+)) e a proliferação de células-tronco endógenas do pulmão (Sca-1 (+) e CD34 (+)), que também são ativadas em resposta à lesão e participam na regeneração do pulmão. Esse processo, orquestrado pelo FCH, reverte as lesões enfisematosas do pulmão. Vale salientar que, após administração exógena de FCH por via aérea, sua presença não é detectada no soro dos animais, indicando que não ocorre a difusão do FCH a partir do pulmão para a circulação. Outrossim, após a observação dos camundongos por várias semanas, não foi observada a retomada da destruição do pulmão. A complacência pulmonar estática também voltou aos níveis normais dentro de 2 semanas de tratamento com o FCH (HEGAB et al., 2008).

Esse processo de cura do FCH não se deve apenas ao seu potente efeito mitogênico sobre os pneumócitos tipo II (PT2), que ocorre *in vivo* (PANOS; PATEL; BAK, 1996; SAKAMAKI et al., 2002) e *in vitro* (MASON et al., 1994). Embora se saiba que os PT2 podem reparar danos do epitélio alveolar (ASO; YONEDA; KIKKAWA, 1976), foi observado, após injúria pulmonar de camundongos adultos, que é uma população de células-tronco do tecido pulmonar que se diferencia em células da Clara e em PT2. São esses novos PT2 que regeneram os alvéolos através da diferenciação em pneumócitos tipo I (KIM et al., 2005). Dessa forma, o FCH promove a migração e a transdiferenciação de células tronco. Esse processo, que acontece fisiologicamente, se mostra insuficiente quando o quadro de enfisema está estabelecido (IWASAKI et al., 2005; APTE et al., 2006; FORTE et al., 2006; LI et al., 2006; HEGAB; KUBO et al., 2008).

Entretanto, embora que no tratamento intranasal de camundongos saudáveis com HGF por 4 semanas, e com posterior observação por várias outras, não tenha sido detectada nenhuma alteração morfológica ou funcional no pulmão (HEGAB et al.,

2008), a participação da expressão descontrolada do FCH e seu receptor c-Met são conhecidas por estarem associadas com uma variedade de tumores humanos, particularmente os tipos mais agressivos (HADDAD; LIPSON; WEBB, 2001; DULAK et al., 2011).

As células-tronco, no entanto, também contam com a opção de serem administradas exogenamente ou induzidas, de outras formas, a se mobilizarem da medula óssea para o pulmão lesionado (GRIFFITHS; BONNET; JANES, 2005), nesse caso, o mais adequado seria a utilização do ácido *all-trans-retinóico* e do fator estimulador de colônias de granulócitos humanos (FECGH) (ISHIZAWA et al., 2004).

Por sua vez, os tratamentos cirúrgicos disponíveis, tais como a cirurgia de redução de volume e o transplante de pulmão, são adequados somente para um subgrupo limitado de pacientes (HEGAB et al., 2008).

Além dessas opções terapêuticas, as quais precisam ter um desenvolvimento tecnológico que as tornem viáveis, existe a opção de se utilizar a tecnologia farmacêutica como ferramenta para otimizar os resultados clínicos de medicamentos que já foram aprovados para uso e que têm o potencial de se tornarem mais eficazes. Dentre esses medicamentos, podemos destacar os fitoterápicos.

3.4 Fitoterapia no enfisema: o guaco

Segundo a resolução – RDC nº 10, de 9 de março de 2010, os fitoterápicos, ou drogas vegetais, são medicamentos oriundos de “plantas medicinais ou suas partes, que contenham as substâncias, ou classes de substâncias, responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta ou colheita, estabilização e secagem, íntegras, rasuradas, trituradas ou pulverizadas” (BRASIL, 2010). Em outras palavras, são medicamentos que contêm princípios ativos de origem vegetal, diferentemente de um medicamento comum, o qual pode ter componentes sintéticos e biológicos. Uma vez que são medicamentos, os fitoterápicos precisam apresentar estudos científicos que comprovem a sua segurança e a eficácia de sua utilização para que possam ser comercializados (CARVALHO et al., 2008).

Essa necessidade de comprovação, aliada a outras exigências atuais, fez com que muitos remédios antigos não conseguissem se adaptar. Isso acarretou a diminuição do número de fitoterápicos registrados: de 512 em 2008 para 384 em 2011, ou seja, uma redução de 25,0%. Além disso, nesse mesmo período, ocorreu a redução de 34,45% no número de empresas produtoras de fitoterápicos no país. Em contrapartida a essa

diminuição, a Vigilância Sanitária discute a criação da categoria “Produto Tradicional Fitoterápico”. Essa categoria englobaria substâncias cuja segurança seja comprovada pelo uso tradicional, desde que cumpram as condições adequadas de higiene em sua fabricação (BRASIL, 2013).

Mesmo com esse novo panorama, que já é uma realidade na Europa (FAN et al., 2012), existe a necessidade da fundamentação científica do uso das plantas brasileiras. Dentre essas plantas, uma com ação potencial contra o enfisema e que pode ser otimizada através da tecnologia farmacêutica é a *Mikania glomerata* Spreng.

3.5 *Mikania glomerata* Spreng.

A *Mikania glomerata* Spreng., ilustração 2, é uma planta cujo uso já foi validado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), por isso possui aplicação promissora na tecnologia farmacêutica. Além disso, ela é um dos 12 fitoterápicos ofertados pelo SUS na atenção básica, o que constitui em uma das estratégias do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, lançado em 2008 com o objetivo de ampliar as opções terapêuticas e fortalecer o complexo produtivo e o uso sustentável da biodiversidade brasileira (BRASIL, 2008).

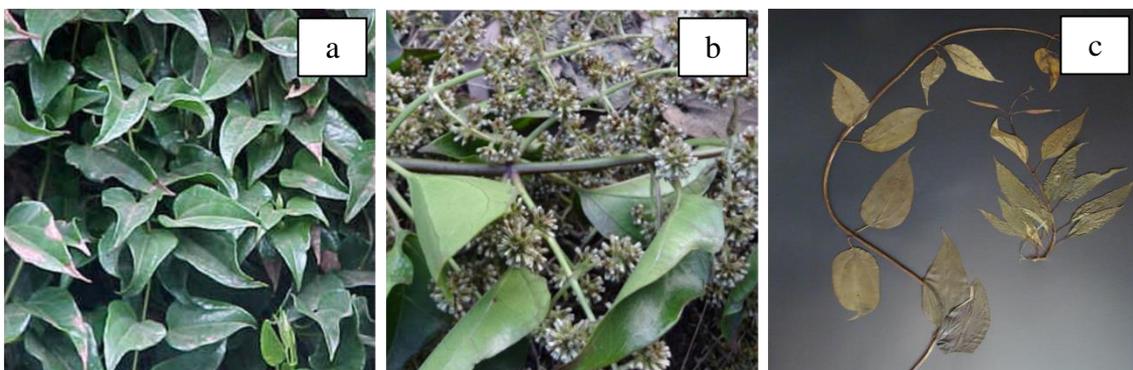


Ilustração 2: *Mikania glomerata* Spreng. Legenda: (a) folha; (b) flor; (c) exsicata. Adaptada de Santos (2005).

3.5.1 Família, gênero e morfologia

A *M. glomerata* pertence à família Asteraceae. Essa família é o grupo mais numeroso dentro das Angiospermas e compreende cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies. É constituído por plantas com características variadas, inclui geralmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores. Aproximadamente 98% dos gêneros

são compostos por plantas de pequeno porte que são encontradas em todos os tipos de *habitats*, principalmente na região tropical montanhosa da América do Sul (CZELUSNIAK et al., 2012). O gênero *Mikania* conta com aproximadamente 430 espécies distribuídas na região tropical e subtropical da América, sendo que 171 espécies são encontradas no Brasil (KING; ROBINSON, 1987).

A planta, conhecida vulgarmente como coração-de-jesus, guaco-cheiroso, cipó-caatinga e erva-de-cobra (GASPARETTO et al., 2010), é um subarbusto silvestre, escandente, de folhagem densa e perene, com caule cilíndrico, ramificado e glabro. Quando seco, o caule apresenta fratura fibrosa e aspecto estriado no sentido longitudinal, enquanto que, estando jovem, apresenta coloração verde-claro passando a arroxeadada e a cinzento-escura nas partes suberificadas. As folhas são pecioladas, cordiforme-deltoides, oval-lanceoladas, tri ou pentanervadas e agudas no ápice. As flores são esbranquiçadas e carnosas, dispostas em inflorescência panícula tirsoide, com até 30 cm de comprimento, onde os capítulos se encontram reunidos em glomérulos. As bractéolas são lineares e apresentam medidas próximas a 2 mm de comprimento. O aquênio é pentangular com aproximadamente 3 mm (CZELUSNIAK et al., 2012).

3.5.2 Atividade farmacológica

A *M. glomerata* foi oficializada desde 1929 na 1ª edição da Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 1959) e encontra-se comercializada principalmente nas formas farmacêuticas de extrato fluido, tintura e xarope. Com fins medicinais, a planta é empregada no tratamento de afecções do aparelho respiratório (gripe, tosse, bronquite e asma), além disso, também é empregada no tratamento de reumatismos, úlceras gástricas, nevralgias, e como sudorífera, febrífuga, depurativa e cicatrizante (RADÜNZ et al., 2012).

Essa ampla utilização é sustentada por evidências pré-clínicas de ação broncodilatadora, expectorante, anti-inflamatória, antiespasmódica e analgésica (FALCÃO et al., 2005; GASPARETTO et al., 2010; CZELUSNIAK et al., 2012). Há, ainda, pesquisas que relatam que uma fração obtida do extrato etanólico da *M. glomerata* é efetiva na inibição da inflamação imunológica, mas não afeta a resposta inflamatória aguda no pulmão de ratos (RUPPELT et al., 1991)

Fitoquimicamente, os compostos de maior interesse presentes na *M. glomerata* são a cumarina, os terpenos e os diterpenos. A cumarina, 2H-1benzopiran-2-ona, é um dos constituintes majoritários da *M. glomerata* (Ilustração 3) e está envolvido com o

caráter broncodilatador da planta, o qual ocorre através do relaxamento da musculatura lisa pulmonar (LEITE, 1992). Ela é responsável por cerca de 50% a 60% da atividade broncodilatadora do extrato cru total (CELEGHINI; VILEGAS; LANÇAS, 2001).

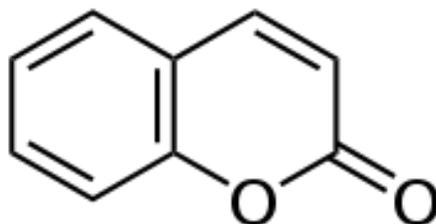


Ilustração 3: Estrutura química da cumarina, 2H-1benzopiran-2-ona. Acervo pessoal.

Dentre os diterpenos, podemos destacar os que constituem a classe dos cauranos, como por exemplo o ácido caurenóico, ilustração 4, (isolado de *M. glomerata* e *M. laevigata*), que apresenta atividade bactericida, anti-parasitária e fúngica (BARBOSA; FERREIRA; VALENTE, 1994; GHISALBERTI, 1997; SILVA et al., 2004; LEYVA et al., 2008).

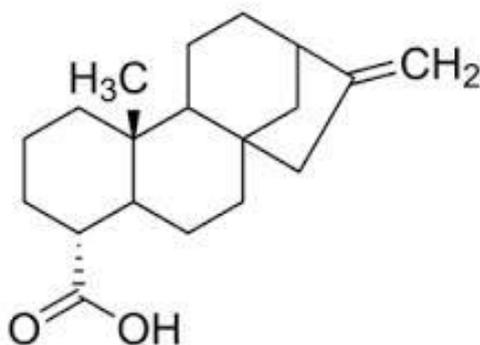


Ilustração 4: Estrutura química do ácido caurenóico. Acervo pessoal.

Em virtude das propriedades terapêuticas atribuídas a essa espécie, o xarope e a solução oral da *M. glomerata* foram incluídos no elenco de referência de medicamentos e insumos complementares para a assistência farmacêutica na atenção básica em saúde, conforme anexo II da Portaria No. 3.237 de 24 de dezembro de 2007 (CANABARRO; HAHN, 2009).

3.5.3 Segurança do extrato da *M. glomerata*

Os fitoterápicos e os compostos isolados de espécies do guaco não apresentaram efeitos tóxicos nem genotóxicos em seres humanos. Entretanto, como ocorre discrepância dos constituintes devido às origens geográficas, aspectos agrônômicos, solvente extrator e técnica de extração, os efeitos e/ou toxicidade do guaco podem ser alterados ou mascarados. Isso revela a necessidade de estudos prévios com os extratos (DALLA NORA et al., 2010).

Dentre as opções de inovação tecnológica que poderiam beneficiar a resposta farmacológica do fitoterápico da *M. glomerata*, podemos citar o desenvolvimento de uma formulação para a entrega pulmonar do medicamento.

3.6 Entrega de formulações por via pulmonar

Durante as últimas décadas, tem se investido em vias de administração alternativas que proporcionem elevada biodisponibilidade e baixos efeitos colaterais. Dentre essas vias, uma das mais promissoras é a pulmonar. Essa via possui uma superfície extensa ($\sim 75\text{m}^2$), fina (0,1-0,5: μm) e altamente vascularizada (MANCA et al., 2012). Essas características trazem potencialidades, sobretudo, quando o objetivo terapêutico é o próprio pulmão. Entretanto, a utilização dessa via pode gerar limitações, como a flutuação da concentração e a perda da droga, que pode ocorrer devido à deposição no trato orofaríngeo, à elevada depuração por macrófagos ou à atividade mucociliar. Além disso, quantidades elevadas de drogas, como os antibióticos, podem ter efeitos irritantes ou de toxicidade aguda no epitélio pulmonar (DOAN; COUET; OLIVIER, 2011).

Para superar tais problemas foram criadas várias abordagens de formulações com a utilização de diferentes carreadores e a incorporação de excipientes, adjuvantes ou agentes porogênicos que otimizassem as muitas propriedades físico-químicas que têm impacto significativo sobre a entrega pulmonar, a liberação sustentada e a estabilidade de armazenamento (OGAIN et al., 2011). Essas abordagens são oriundas, geralmente, das várias tecnologias que estão sob investigação, incluindo grandes micropartículas porosas, partículas de polímero microencapsulado, drogas *PEGylated* e conjugadas, nanopartículas e micropartículas intumescíveis (SELVAM; EL-SHERBINY; SMYTH, 2011).

Entretanto, independente da inovação tecnológica utilizada, algumas características das partículas são mantidas, uma vez que já possuem consenso. Dentre essas características, o diâmetro é uma das de maior consenso. Esse diâmetro deve estar entre 1-5 μ m para que ocorra uma maior probabilidade de se atingir a porção inferior do sistema respiratório (HASSAN; LAU, 2011). Esse tamanho de partícula, entretanto, é o que apresenta máxima absorção pelos macrófagos, o que é o desejado apenas em raros casos, como no tratamento da tuberculose. Na maioria das vezes, então, são utilizados agentes intumescíveis que incham quando no pulmão profundo e, portanto, podem iludir a captação dos macrófagos alveolares através das suas maiores dimensões geométricas (KHANDWEKAR et al., 2011).

Uma vez que as características das formulações se mostram tão importantes para a entrega pulmonar, é preciso se trabalhar com equipamentos que possibilitem a alteração dessas características para que se obtenha uma melhor otimização da entrega. Um aparelho que possibilita tais alterações é o *Spray Dryer*. Entretanto, por ser um aparelho que trabalha com muitas variáveis, é preciso estabelecer metodologias para se obter as formulações com as melhores características. Para tanto, existe o planejamento de experimentos.

3.7 Planejamento e otimização de experimentos

A atividade estatística mais importante não é a análise de dados, e sim o planejamento dos experimentos em que esses dados devem ser obtidos. Quando isso não é feito da forma apropriada, muitas vezes, não é possível obter uma conclusão plausível a partir dos resultados. Um bom planejamento é o que fornece exatamente o tipo de informação procurada. Para isso é preciso organizar a evolução do estudo empírico. Essa organização consiste, inicialmente, em uma triagem das variáveis de maior influência, descartando dessa forma as variáveis não significativas. Em seguida é feita uma avaliação da influência das variáveis, nesse caso é utilizado o planejamento fatorial. Por fim, são construídos os modelos empíricos e mecanísticos, que possibilitam a otimização do estudo. Entretanto, construir modelos empíricos não basta. É preciso também avaliar se eles são realmente adequados ao sistema que se quer descrever (BARROS, 2003). Então, uma vez que se objetive avaliar a influência de variáveis, o mais adequado é o planejamento fatorial.

3.7.1 Planejamento fatorial

O planejamento fatorial é uma ferramenta extremamente eficiente e econômica que pode ser utilizada para avaliar, quantitativamente, a influência de dezenas de fatores, simultaneamente, sobre a resposta de interesse, bem como as possíveis interações entre os fatores (BARROS, 2003).

3.8 Perspectivas para o enfisema pulmonar: biomarcadores e células-tronco

Entretanto, embora a tecnologia farmacêutica, aliada ao planejamento de experimentos, possa trazer grandes avanços com a otimização de medicamentos já existentes para o tratamento do enfisema, a longo prazo, a cura da patologia será, possivelmente, conseguida através do diagnóstico precoce por biomarcadores e/ou tratamento com células tronco.

Os biomarcadores são entidades que podem ser medidas como um indicador de processos biológicos normais ou patológicos, ou ainda como indicador de resposta à terapia (ATKINSON et al., 2001). Eles podem ser usados na prática clínica para o diagnóstico ou para identificar riscos de ocorrência de uma doença. Podem, ainda, ser utilizados para estratificar doentes e identificar a gravidade ou progressão de uma determinada doença, prever um prognóstico ou monitorizar um determinado tratamento para que seja menos provável que alguns efeitos secundários ocorram. Ademais, o uso de biomarcadores pode reduzir os custos no desenvolvimento de medicamentos, uma vez que, através da triagem dos pacientes, minimiza o número de participantes necessários (ROBINSON et al., 2013).

Embora os biomarcadores, geralmente, sejam utilizados para descrever uma variável bioquímica, como a concentração de uma proteína ou outra biomolécula na circulação, também podem ser empregados para se analisar características anatômicas e estruturais, que são visualizadas por radiografia convencional, ultra-sonografia, tomografia computadorizada (por exemplo, a tomografia por emissão de pósitrons) ou ressonância magnética. As respostas celulares imunes, traços genéticos, características histológicas do tecido doente e as proteínas ou RNAs expressos em tecidos também podem ser utilizadas como biomarcadores (LOGOTHETIS, 2008).

Para muitas doenças, um único biomarcador pode ser informativo em um nível populacional, mas não em um nível individual. Dessa forma, estão sendo desenvolvidos biomarcadores múltiplos e, em paralelo, tecnologias que permitam a análise dessas múltiplas variáveis (FU et al., 2010).

O enfisema pulmonar é uma das patologias onde o uso de biomarcadores múltiplos se faz necessária. Esses biomarcadores, baseados nos mecanismos patogênicos descritos na seção 3.2, permitiriam que uma proporção significativa de pacientes fosse tratada antes que alterações irreversíveis do enfisema se instalassem. Como forma de identificar esses biomarcadores, poderia ser utilizado, por exemplo, a tomografia computadorizada (GALBÁN et al., 2012).

Uma vez que as alterações irreversíveis do enfisema já estejam estabelecidas, a terapia mais promissora envolve, sem dúvidas, o uso ou recrutamento de células-tronco endógenas e exógenas ao pulmão, conforme descrito na seção 3.3.

REFERÊNCIAS

AGUSTI, A.; SOBRADILLO, P.; CELLI, B. Addressing the complexity of chronic obstructive pulmonary disease: from phenotypes and biomarkers to scale-free networks, systems biology, and P4 medicine. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 183, n. 9, p. 1129-1137, 2011.

APTE, U.; ZENG, G.; MULLER, P.; TAN, X.; MICSENYI, A.; CIEPLY, B.; DAI, C.; LIU, Y.; KAESTNER, K. H.; MONGA, S. P. S. Activation of Wnt/ β -catenin pathway during hepatocyte growth factor-induced hepatomegaly in mice. **Hepatology**, v. 44, n. 4, p. 992-1002, 2006.

ASO, Y.; YONEDA, K.; KIKKAWA, Y. Morphologic and biochemical study of pulmonary changes induced by bleomycin in mice. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 35, n. 6, p. 558, 1976.

ATKINSON, A. J.; COLBURN, W. A.; DEGRUTTOLA, V. G.; DEMETS, D. L.; DOWNING, G. J.; HOTH, D. F.; OATES, J.; PECK, C. C.; SCHOOLEY, R. T.; SPILKER, B. A. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 69, n. 3, p. 89-95, 2001.

BARBOSA, A. D.; FERREIRA, R. D. C. V.; VALENTE, P. H. M. Atividade antimicrobiana de extratos fluidos de plantas medicinais brasileiras; Antimicroby activity of fluid extracts from medicinal Brazilian plants. **Lecta-USF**, v. 12, n. 2, p. 153-63, 1994.

BARR, R. G.; BLUEMKE, D. A.; AHMED, F. S.; CARR, J. J.; ENRIGHT, P. L.; HOFFMAN, E. A.; JIANG, R.; KAWUT, S. M.; KRONMAL, R. A.; LIMA, J. A. C. Percent emphysema, airflow obstruction, and impaired left ventricular filling. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 3, p. 217-227, 2010.

BARROS, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. São Paulo: **Editora Unicamp**, p. 5 e 83, 2003.

BOYER, L.; PLANTIER, L.; DAGOUASSAT, M.; LANONE, S.; GOVEN, D.; CARMELLE, P.; BERREHAR, F.; KERBRAT, S.; DINH-XUAN, A. T.; CRESTANI, B. Role of nitric oxide synthases in elastase-induced emphysema. **Laboratory Investigation**, v. 91, n. 3, p. 353-362, 2010.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**, 2ª Ed, 1959.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília-DF, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC Nº 10, de 09 de março de 2010**. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência

Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. Brasília-DF, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Medicamento fitoterápico**. Brasília-DF, 2013.

BRESSAN, G. M.; DAGA-GORDINI, D.; COLOMBATTI, A.; CASTELLANI, I.; MARIGO, V.; VOLPIN, D. Emilin, a component of elastic fibers preferentially located at the elastin-microfibrils interface. **The Journal of cell biology**, v. 121, n. 1, p. 201-212, 1993.

BRINDICCI, C.; ITO, K.; RESTA, O.; PRIDE, N. B.; BARNES, P. J.; KHARITONOV, S. A. Exhaled nitric oxide from lung periphery is increased in COPD. **European Respiratory Journal**, v. 26, n. 1, p. 52-59, 2005.

CALVERLEY, P.; RENNARD, S. I. What have we learned from large drug treatment trials in COPD? **The Lancet**, v. 370, n. 9589, p. 774-785, 2007.

CANABARRO, I. M.; HAHN, S. Panorama da Assistência Farmacêutica na Saúde da Família em município do interior do Estado do Rio Grande do Sul. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 18, n. 4, p. 345-355, 2009.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CELEGHINI, R.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Spreng: ("guaco") leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 6, p. 706-709, 2001.

CHENG, S.; WANG, H.; YU, C.; YANG, P. Increased expression of placenta growth factor in COPD. **Thorax**, v. 63, n. 6, p. 500-506, 2008.

COLLOD-BÉROUD, G.; BOILEAU, C. Marfan syndrome in the third Millennium. **European Journal of Human Genetics**, v. 10, n. 11, p. 673, 2002.

COLOMBATTI, A.; DOLIANA, R.; BOT, S.; CANTON, A.; MONGIAT, M.; MUNGIGUERRA, G.; PARON-CILLI, S.; SPESSOTTO, P. The EMILIN protein family. **Matrix Biology**, v. 19, n. 4, p. 289-301, 2000.

COTTER, M. A.; ROBERTSON, E. S. Modulation of histone acetyltransferase activity through interaction of Epstein-Barr nuclear antigen 3C with prothymosin alpha. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 15, p. 5722-5735, 2000.

COVELO, G.; SARANDESES, C. S.; DÍAZ-JULLIEN, C.; FREIRE, M. Prothymosin α interacts with free core histones in the nucleus of dividing cells. **Journal of biochemistry**, v. 140, n. 5, p. 627-637, 2006.

CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D. F.; FREITAS, G. B. L. Morpho-anatomy, phytochemistry and pharmacology of *Mikania glomerata* Sprengel: a brief

literature review. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 14, n. 2, p. 400-409, 2012.

DALLA, N. G.; PASTORI, T.; DAIL LAUGHINGHOUSE IV, H.; DO CANTO-DOROW, T. S.; BOSIO TEDESCO, S. Antiproliferative and genotoxic effects of *Mikania glomerata* (Asteraceae). **Biocell**, v. 34, n. 3, p. 95-101, 2010.

DECRAMER, M.; JANSSENS, W.; MIRAVITLLES, M. Chronic obstructive pulmonary disease. **Lancet**, v. 379, p. 1341–1351, 2012.

DEWERCHIN, M.; CARMELIET, P. PIGF: a multitasking cytokine with disease-restricted activity. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 8, p. 1-9, 2012.

DIPALMA, T.; TUCCI, M.; RUSSO, G.; MAGLIONE, D.; LAGO, C. T.; ROMANO, A.; SACCONI, S.; VALLE, G. DELIA; DE GREGORIO, L.; DRAGANI, T. A. The placenta growth factor gene of the mouse. **Mammalian Genome**, v. 7, n. 1, p. 6-12, 1996.

DOAN, T. V. P.; COUET, W.; OLIVIER, J. C. Formulation and in vitro characterization of inhalable rifampicin-loaded PLGA microspheres for sustained lung delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 414, n. 1-2, p. 112-117, 2011.

DOLIANA, R.; MONGIAT, M.; BUCCIOTTI, F.; GIACOMELLO, E.; DEUTZMANN, R.; VOLPIN, D.; BRESSAN, G. M.; COLOMBATTI, A. EMILIN, a component of the elastic fiber and a new member of the C1q/tumor necrosis factor superfamily of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 24, p. 16773-16781, 1999.

DULAK, A. M.; GUBISH, C. T.; STABILE, L. P.; HENRY, C.; SIEGFRIED, J. M. HGF-independent potentiation of EGFR action by c-Met. **Oncogene**, v. 30, n. 33, p. 3625-3635, 2011.

ELIAS, J. A.; LEE, C. Lipid let loose in pulmonary emphysema. **Nature medicine**, v. 11, n. 5, p. 471-472, 2005.

EVSTAFIEVA, A. G.; BELOV, G. A.; RUBTSOV, Y. P.; KALKUM, M.; JOSEPH, B.; CHICHKOVA, N. V.; SUKHACHEVA, E. A.; BOGDANOV, A. A.; PETTERSSON, R. F.; AGOL, V. I. Apoptosis-related fragmentation, translocation, and properties of human prothymosin alpha. **Experimental cell research**, v. 284, n. 2, p. 209-221, 2003.

FALCÃO, H. D. S.; LIMA, I. O.; SANTOS, V. L. D.; DANTAS, H. D. F.; DINIZ, M. D. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 381-391, 2005.

FALCO, S. The discovery of placenta growth factor and its biological activity. **Experimental & molecular medicine**, v. 44, n. 1, p. 1-9, 2012.

FAN, T.; DEAL, G.; KOO, H.; REES, D.; SUN, H.; CHEN, S.; DOU, J.; MAKAROV, V. G.; POZHARITSKAYA, O. N.; SHIKOV, A.; KIM, Y. S.; HUANG, Y.; CHANG,

Y. S.; JIA, W.; DIAS, A.; WONG, V. C.; CHAN, K. Future development of global regulations of Chinese herbal products. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 3, p. 568-586, 2012.

FLETCHER, C.; PETO, R. The natural history of chronic airflow obstruction. **British medical journal**, v. 1, n. 6077, p. 1645, 1977.

FORONJY, R.; MIROCHNITCHENKO, O.; PROPOKENKO, O.; LEMAITRE, V.; JIA, Y.; INOUE, M.; OKADA, Y.; D'ARMIENTO, J. M. Superoxide dismutase expression attenuates cigarette smoke–or elastase-generated emphysema in mice. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 173, n. 6, p. 623-631, 2006.

FORTE, G.; MINIERI, M.; COSSA, P.; ANTENUCCI, D.; SALA, M.; GNOCCHI, V.; FIACCAVENTO, R.; CAROTENUTO, F.; DE VITO, P.; BALDINI, P. M. Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration, and differentiation. **Stem Cells**, v. 24, n. 1, p. 23-33, 2006.

FU, Q.; SCHOENHOFF, F. S.; SAVAGE, W. J.; ZHANG, P.; VAN EYK, J. E. Multiplex assays for biomarker research and clinical application: translational science coming of age. **PROTEOMICS-Clinical Applications**, v. 4, n. 3, p. 271-284, 2010.

GALBÁN, C. J.; HAN, M. K.; BOES, J. L.; CHUGHTAI, K. A.; MEYER, C. R.; JOHNSON, T. D.; GALBÁN, S.; REHEMTULLA, A.; KAZEROONI, E. A.; MARTINEZ, F. J. Computed tomography-based biomarker provides unique signature for diagnosis of COPD phenotypes and disease progression. **Nature medicine**, v. 18, n.11, p. 1711-1715, 2012.

GASPARETTO, J. C.; CAMPOS, F. R.; BUDEL, J. M.; PONTAROLO, R. *Mikania glomerata* Spreng. e *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae: agronomic, genetic, anatomical, chemical, pharmacological, toxicological studies and its use in herbal therapy programs in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 627-640, 2010.

GAYRAUD, B.; KEENE, D. R.; SAKAI, L.; RAMIREZ, F. New insights into the assembly of extracellular microfibrils from the analysis of the fibrillin 1 mutation in the tight skin mouse. **The Journal of cell biology**, v. 150, n. 3, p. 667-680, 2000.

GHISALBERTI, E. L. The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes. **Fitoterapia**, v. 68, n. 4, p. 303-325, 1997.

GIBSON, M. A.; KUMARATILAKE, J. S.; CLEARY, E. G. The protein components of the 12-nanometer microfibrils of elastic and nonelastic tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 8, p. 4590-4598, 1989.

GIBSON, M. A.; HATZINIKOLAS, G.; KUMARATILAKE, J. S.; SANDBERG, L. B.; NICHOLL, JILLIAN K.; SUTHERLAND, G. R.; CLEARY, E. G. Further characterization of proteins associated with elastic fiber microfibrils including the molecular cloning of MAGP-2 (MP25). **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 2, p. 1096-1103, 1996.

GIBSON, MARK A.; HUGHES, J. L.; FANNING, J. C.; CLEARY, E. G. The major antigen of elastin-associated microfibrils is a 31-kDa glycoprotein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 24, p. 11429-11436, 1986.

GILL, R.; TSUNG, A.; BILLIAR, T. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 9, p. 1121-1132, 2010.

GRIFFITHS, M. J. D.; BONNET, D.; JANES, S. M. Stem cells of the alveolar epithelium. **The Lancet**, v. 366, n. 9481, p. 249-260, 2005.

HADDAD, R.; LIPSON, K. E.; WEBB, C. P. Hepatocyte growth factor expression in human cancer and therapy with specific inhibitors. **Anticancer research**, v. 21, n. 6, p. 4243-4252, 2001.

HARTL, D.; GRIESE, M. Surfactant protein D in human lung diseases. **European journal of clinical investigation**, v. 36, n. 6, p. 423-435, 2006.

HASSAN, M. S.; LAU, R. Inhalation performance of pollen-shape carrier in dry powder formulation: Effect of size and surface morphology. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 413, n. 1-2, p. 93-102, 2011.

HEGAB, A. E.; KUBO, H.; YAMAYA, M.; ASADA, M.; HE, M.; FUJINO, N.; MIZUNO, S.; NAKAMURA, T. Intranasal HGF administration ameliorates the physiologic and morphologic changes in lung emphysema. **Molecular Therapy**, v. 16, n. 8, p. 1417-1426, 2008.

HONG, S. C.; LEE, S. Role of th17 cell and autoimmunity in chronic obstructive pulmonary disease. **Immune network**, v. 10, n. 4, p. 109-114, 2010.

HOU, H. H.; CHENG, S. L.; LIU, H. T.; YANG, F. Z.; WANG, H. C.; YU, C. J. Elastase induced lung epithelial cell apoptosis and emphysema through placenta growth factor. **Cell death & disease**, v. 4, n. 9, p. 793, 2013.

INOUE, D.; NUMASAKI, M.; WATANABE, M.; KUBO, H.; SASAKI, T.; YASUDA, H.; YAMAYA, M.; SASAKI, H. IL-17A promotes the growth of airway epithelial cells through ERK-dependent signaling pathway. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 347, n. 4, p. 852-858, 2006.

IOANNOU, K.; SAMARA, P.; LIVANIOU, E.; DERHOVANESSIAN, E.; TSITSILONIS, O. E. Prothymosin alpha: a ubiquitous polypeptide with potential use in cancer diagnosis and therapy. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 61, n. 5, p. 599-614, 2012.

ISHII, T.; HAGIWARA, K.; KAMIO, K.; IKEDA, S.; ARAI, T.; MIENO, M. N.; KUMASAKA, T.; MURAMATSU, M.; SAWABE, M.; GEMMA, A. Involvement of surfactant protein D in emphysema revealed by genetic association study. **European Journal of Human Genetics**, v. 20, n. 2, p. 230-235, 2011.

ISHIZAWA, K.; KUBO, H.; YAMADA, M.; KOBAYASHI, S.; NUMASAKI, M.; UEDA, S.; SUZUKI, T.; SASAKI, H. Bone marrow-derived cells contribute to lung regeneration after elastase-induced pulmonary emphysema. **FEBS Letters**, v. 556, n. 1, p. 249-252, 2004.

ASAKI, M.; ADACHI, Y.; NISHIUE, T.; MINAMINO, K.; SUZUKI, Y.; ZHANG, Y.; NAKANO, K.; KOIKE, Y.; WANG, J.; MUKAIDE, H. Hepatocyte Growth Factor Delivered by Ultrasound-Mediated Destruction of Microbubbles Induces Proliferation of Cardiomyocytes and Amelioration of Left Ventricular Contractile Function in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. **Stem Cells**, v. 23, n. 10, p. 1589-1597, 2005.

JACOBS, A. M.; TOUDJARSKA, I.; RACINE, A.; TSIPOURAS, P.; KILPATRICK, M. W.; SHANSKE, A. A recurring FBN1 gene mutation in neonatal Marfan syndrome. **Archives of pediatrics & adolescent medicine**, v. 156, n. 11, p. 1081, 2002.

KARETSOU, Z.; KRETISOVALI, A.; MURPHY, C.; TSOLAS, O.; PAPAMARCAKI, T. Prothymosin α interacts with the CREB-binding protein and potentiates transcription. **EMBO Reports**, v. 3, n. 4, p. 361-366, 2002.

KARETSOU, Z.; SANDALTZOPOULOS, R.; FRANGOU-LAZARIDIS, M.; LAI, C.; TSOLAS, O.; BECKER, P. B.; PAPAMARCAKI, T. Prothymosin α modulates the interaction of histone H1 with chromatin. **Nucleic acids research**, v. 26, n. 13, p. 3111-3118, 1998.

KELLEHER, C. M.; SILVERMAN, E. K.; BROEKELMANN, T.; LITONJUA, A. A.; HERNANDEZ, M.; SYLVIA, J. S.; STOLER, J.; REILLY, J. J.; CHAPMAN, H.A.; SPEIZER, F. A functional mutation in the terminal exon of elastin in severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 33, n. 4, p. 355, 2005.

KHANDWEKAR, A. P.; PATIL, D. P.; SHOUCHE, Y.; DOBLE, M. Surface Engineering of Polycaprolactone by Biomacromolecules and their Blood Compatibility. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 26, n. 2, p. 227-252, 2011.

KIELTY, C. M.; BALDOCK, C.; LEE, D.; ROCK, MATTHEW J.; ASHWORTH, J. L.; SHUTTLEWORTH, C. A. Fibrillin: from microfibril assembly to biomechanical function. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v. 357, n. 1418, p. 207-217, 2002.

KIELTY, C. M.; RAGHUNATH, M.; SIRACUSA, L. D.; SHERRATT, M. J.; PETERS, R.; SHUTTLEWORTH, C. A.; JIMENEZ, S. A. The tight skin mouse: demonstration of mutant fibrillin-1 production and assembly into abnormal microfibrils. **The Journal of cell biology**, v. 140, n. 5, p. 1159-1166, 1998.

KIELTY, C. M.; SHERRATT, M. J.; SHUTTLEWORTH, C. A. Elastic fibres. **Journal of cell science**, v. 115, n. 14, p. 2817-2828, 2002.

KIM, C. F. B.; JACKSON, E. L.; WOOLFENDEN, A. E.; LAWRENCE, S.; BABAR, I.; VOGEL, S.; CROWLEY, D.; BRONSON, R. T.; JACKS, T. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. **Cell**, v. 121, n. 6, p. 823-835, 2005.

KING, R. M.; ROBINSON, H. The genera of the Eupatorieae (Asteraceae). **Monographs in Systematic Botany**, v. 22, p. 263-266, 1987.

KINOSHITA, T.; HOSHINO, T.; IMAOKA, H.; ICHIKI, H.; OKAMOTO, M.; KAWAYAMA, T.; YODOI, J.; KATO, S.; AIZAWA, H. Thioredoxin prevents the

development and progression of elastase-induced emphysema. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 354, n. 3, p. 712-719, 2007.

KISHIMOTO, T. Interleukin-6: from basic science to medicine-40 years in immunology. **The Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 1-21, 2005.

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. IL-17 and Th17 Cells. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 485-517, 2009.

LEITE, M. G. R.; SILVA, M. A. M.; LINO, C. S.; VIANA, G. S. B.; MATOS, F. J. A. **Atividade broncodilatadora em *Mikania glomerata*, *Justicia pectoralis* e *Torresea cearenses***. 1992. 12 f. In Proceedings of the Symposium of Medicinal Plants of Brazil. Curitiba, PR, Brazil.

LEE, S.; GOSWAMI, S.; GRUDO, A.; SONG, L.; BANDI, V.; GOODNIGHT-WHITE, S.; GREEN, L.; HACKEN-BITAR, J.; HUH, J.; BAKAEEN, F. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. **Nature medicine**, v. 13, n. 5, p. 567-569, 2007.

LETSAS, K. P.; FRANGOU-LAZARIDIS, M. Surfing on prothymosin alpha proliferation and anti-apoptotic properties. **Neoplasma**, v. 53, n. 2, p. 92, 2006.

LEYVA, M. O.; VICEDO, B.; FINITI, I.; FLORS, V.; DEL AMO, G.; REAL, M. D.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; GONZÁLEZ-BOSCH, C. Preventive and post-infection control of *Botrytis cinerea* in tomato plants by hexanoic acid. **Plant Pathology**, v. 57, n. 6, p. 1038-1046, 2008.

LI, Y.; RECA, R. G.; ATMACA-SONMEZ, P.; RATAJCZAK, M. Z.; ILDSTAD, S. T.; KAPLAN, H. J.; ENZMANN, V. Retinal pigment epithelium damage enhances expression of chemoattractants and migration of bone marrow-derived stem cells. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 47, n. 4, p. 1646-1652, 2006.

LOGOTHETIS, N. What we can do and what we cannot do with fMRI. **Nature**, v. 453, n. 7197, p. 869-878, 2008.

MANCA, M. L.; MANCONI, M.; VALENTI, D.; LAI, F.; LOY, G.; MATRICARDI, P.; FADDA, A. M. Liposomes coated with chitosan-xanthan gum (chitosomes) as potential carriers for pulmonary delivery of rifampicin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 2, p. 566-75, 2012.

MANNINO, D. M.; BUIST, A. S. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. **The Lancet**, v. 370, n. 9589, p. 765-773, 2007.

MASON, R. J.; LESLIE, C. C.; MCCORMICK-SHANNON, K.; DETERDING, R. R.; NAKAMURA, T.; RUBIN, J.; SHANNON, J. M. Hepatocyte growth factor is a growth factor for rat alveolar type II cells. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 11, n. 5, p. 561-567, 1994.

MCKENZIE, B.S.; KASTELEIN, R.A.; CUA, D. J. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. **Trends in immunology**, v. 27, n. 1, p. 17-23, 2006.

MOSOIAN, A. Intracellular and extracellular cytokine-like functions of prothymosin α : implications for the development of immunotherapies. **Future Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 9, p. 1199-1208, 2011.

OGAIN, O. N.; LI, J. H.; TAJBER, L.; CORRIGAN, O. I.; HEALY, A. M. Particle engineering of materials for oral inhalation by dry powder inhalers. I-Particles of sugar excipients (trehalose and raffinose) for protein delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 405, n. 12, p. 23-35, 2011.

OHMICHI, H.; KOSHIMIZU, U.; MATSUMOTO, K.; NAKAMURA, T. Hepatocyte growth factor (HGF) acts as a mesenchyme-derived morphogenic factor during fetal lung development. **Development**, v. 125, n. 7, p. 1315-1324, 1998.

OHMICHI, H.; MATSUMOTO, K.; NAKAMURA, T. In vivo mitogenic action of HGF on lung epithelial cells: pulmotrophic role in lung regeneration. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 270, n. 6, p. 1031-1039, 1996.

PANOS, R. J.; PATEL, R.; BAK, PHILIP M. Intratracheal administration of hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates rat alveolar type II cell proliferation in vivo. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 15, n. 5, p. 574-581, 1996.

PATEL, B. D.; COXSON, H. O.; PILLAI, S. G.; AGUSTÍ, A. G.; CALVERLEY, P. M.; DONNER, C. F.; MAKE, B. J.; MÜLLER, N. L.; RENNARD, S. I.; VESTBO, J. International COPD Genetics Network. Airway wall thickening and emphysema show independent familial aggregation in chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 178, n. 5, p. 500-505, 2008.

PAUWELS, R. A.; BUIST, A. S.; CALVERLEY, P. M. A.; JENKINS, C. R.; HURD, S. S. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 163, n. 5, 2012.

PEREIRALRZ, L.; ANDRIKOPOULOSM, K.; TIANL, I.; LEE, S. Y.; KEENE, D. R.; ONO, R.; REINHARDT, D. P.; SAKAI, Y.; BIERY, I.; BUNTON, T. Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. **Nature genetics**, v. 17, n. 2, p. 218-22, 1997.

PYERITZ, R. E.; DIETZ, H. C. Marfan syndrome and other microfibrillar disorders. **Connective Tissue and Its Heritable Disorders: Molecular, Genetic, and Medical Aspects**, Second Edition, p. 585-626, 2003.

RADÜNZ, L. L.; MELO, E. C.; BARBOSA, L. C. A.; ROCHA, R. P.; BERBERT, P. A. Rendimento extrativo de cumarina de folhas de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) submetidas a diferentes temperaturas de secagem. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 453-457, 2012.

RICCIARDOLO, F. L. M.; CARAMORI, G.; ITO, K.; CAPELLI, A.; BRUN, P.; ABATANGELO, G.; PAPI, A.; CHUNG, K. F.; ADCOCK, I.; BARNES, P. J. Nitrosative stress in the bronchial mucosa of severe chronic obstructive pulmonary

disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 116, n. 5, p. 1028-1035, 2005.

ROARK, E. F.; KEENE, D. R.; HAUDENSCHILD, C. C.; GODYNA, S.; LITTLE, C. D.; ARGRAVES, W. S. The association of human fibulin-1 with elastic fibers: an immunohistological, ultrastructural, and RNA study. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 43, n. 4, p. 401-411, 1995.

ROBBESOM, A. A.; KOENDERS, M. M. J. F.; SMITS, N. C.; HAFMANS, T.; VERSTEEG, E. M. M.; BULTEN, J.; VEERKAMP, J. H.; DEKHUIJZEN, P. N. R.; VAN KUPPEVELT, T.H. Aberrant fibrillin-1 expression in early emphysematous human lung: a proposed predisposition for emphysema. **Modern Pathology**, v. 21, n. 3, p. 297-307, 2007.

ROBINSON, P. N.; GODFREY, M. The molecular genetics of Marfan syndrome and related microfibrillopathies. **Journal of medical genetics**, v. 37, n. 1, p. 9-25, 2000.

ROBINSON, W. H.; LINDSTROM, T. M.; CHEUNG, R. K.; SOKOLOVE, J. Mechanistic biomarkers for clinical decision making in rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 9, n. 5, p. 267-76, 2013.

ROSENBLOOM, J.; ABRAMS, W. R.; MECHAM, R. Extracellular matrix 4: the elastic fiber. **The FASEB Journal**, v. 7, n. 13, p. 1208-1218, 1993.

RUBIO, M.L.; MARTIN-MOSQUERO, M. C.; ORTEGA, M.; PECES-BARBA, G.; GONZÁLEZ-MANGADO, N. Oral N-acetylcysteine attenuates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. **CHEST Journal**, v. 125, n. 4, p. 1500-1506, 2004.

RUPPELT, B. M.; PEREIRA, E. F. R.; GONÇALVES, L. C.; PEREIRA, N. A. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom: I. Analgesic and anti-inflammatory activities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 203-205, 1991.

SANTOS, S. C. **Caracterização cromatográfica de extratos medicinais de Guaco: Mikania laevigata Schultz Bip. ex Baker e M. glomerata Sprengel e ação de M. laevigata na inflamação alérgica pulmonar.** 2005. Dissertação, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, Santa Catarina.

SAKAMAKI, Y.; MATSUMOTO, K.; MIZUNO, S.; MIYOSHI, S.; MATSUDA, H.; NAKAMURA, T. Hepatocyte growth factor stimulates proliferation of respiratory epithelial cells during postpneumectomy compensatory lung growth in mice. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 26, n. 5, p. 525-533, 2002.

SELVAM, P.; EL-SHERBINY, I. M.; SMYTH, H. D. C. Swellable Hydrogel Particles for Controlled Release Pulmonary Administration Using Propellant-Driven Metered Dose Inhalers. **Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery**, v. 24, n. 1, p. 25-34, 2011.

SHIH, C.; HAO, W.; CHONG, Y.; PO, T.; PETER, C.; SHI, C.; PAN, Y. Prevention of elastase-induced emphysema in placenta growth factor knock-out mice. **Respiratory Research**, v. 10, p. 115, 2009.

SILVA, R. Z.; RIOS, E. D. M.; DA SILVA, M. Z.; LEAL, L. D. F.; YUNES, R. A.; MIGUEL, O. G.; CECHINEL FILHO, V. Investigaç o fitoqu mica e avaliaç o da atividade antibacteriana da *Mikania lanuginosa* DC (Asteraceae). **Vis o acad mica**, v. 3, n. 2, p. 59-64, 2004.

SIN, D. D.; MAN, S. F. P.; MCWILLIAMS, A.; LAM, S. Surfactant protein D and bronchial dysplasia in smokers at high risk of lung cancer. **CHEST Journal**, v. 134, n. 3, p. 582-588, 2008.

SU, B.; TSENG, Y.; SHIEH, G.; CHEN, Y.; SHIANG, Y.; WU, P.; LI, K.; YEN, T.; SHIAU, A.; WU, C. Prothymosin α overexpression contributes to the development of pulmonary emphysema. **Nature communications**, v. 4, p. 1906, 2013.

SUBRAMANIAN, C.; HASAN, S.; ROWE, M.; HOTTIGER, M.; ORRE, R.; ROBERTSON, E. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and prothymosin alpha interact with the p300 transcriptional coactivator at the CH1 and CH3/HAT domains and cooperate in regulation of transcription and histone acetylation. **Journal of virology**, v. 76, n. 10, p. 4699-4708, 2002.

TSAI, W.; CHIEN, C. Dietary *Monascus adlay* supplements facilitate suppression of cigarette smoke-induced pulmonary endoplasmic reticulum stress, autophagy, apoptosis and emphysema-related PLGF in the rat. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 765-774, 2012.

TSAO, P.; SU, Y.; LI, H.; HUANG, P.; CHIEN, C.; LAI, Y.; LEE, C.; CHEN, C.; CHENG, W.; WEI, S. Overexpression of placenta growth factor contributes to the pathogenesis of pulmonary emphysema. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 169, n. 4, p. 505-511, 2004.

UEDA, H.; MATSUNAGA, H.; HALDER, S. K. Prothymosin α plays multifunctional cell robustness roles in genomic, epigenetic, and nongenomic mechanisms. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1269, n. 1, p. 34-43, 2012.

VERCELLI, D. Gene-environment interactions in asthma and allergy: the end of the beginning? **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 10, n. 2, p. 145, 2010.

WANG, Q.; YANG, H.; LIU, H.; MI, SU; ZHANG, X.; YAN, H.; MA, Y.; WANG, X.; HU, Z. Interleukin-17A is involved in development of spontaneous pulmonary emphysema caused by Toll-like receptor 4 mutation. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 32, n. 8, p. 1045-1054, 2011.

WON, H. Y.; SOHN, J. H.; MIN, H. J.; LEE, K.; WOO, H. AE; HO, Y.; PARK, J. W.; RHEE, S.; HWANG, E. S. Glutathione peroxidase 1 deficiency attenuates allergen-induced airway inflammation by suppressing Th2 and Th17 cell development. **Antioxidants & redox signaling**, v. 13, n. 5, p. 575-587, 2010.

WU, C.; SHIAU, A.; LIN, C. Prothymosin α promotes cell proliferation in NIH3T3 cells. **Life Sciences**, v. 61, n. 21, p. 2091-2101, 1997.

YAMADA, T.; HISANAGA, M.; NAKAJIMA, Y.; MIZUNO, S.; MATSUMOTO, K.; NAKAMURA, T.; NAKANO, H. Enhanced expression of hepatocyte growth factor by

pulmonary ischemia–reperfusion injury in the rat. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 162, n. 2, p. 707-715, 2000.

YANAGISAWA, H.; DAVIS, E. C.; STARCHER, B. C.; OUCHI, T.; YANAGISAWA, M.; RICHARDSON, J. A.; OLSON, E. N. Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 168-171, 2002.

YOSHIDA, T.; TUDER, R. M. Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. **Physiological reviews**, v. 87, n. 3, p. 1047-1082, 2007.

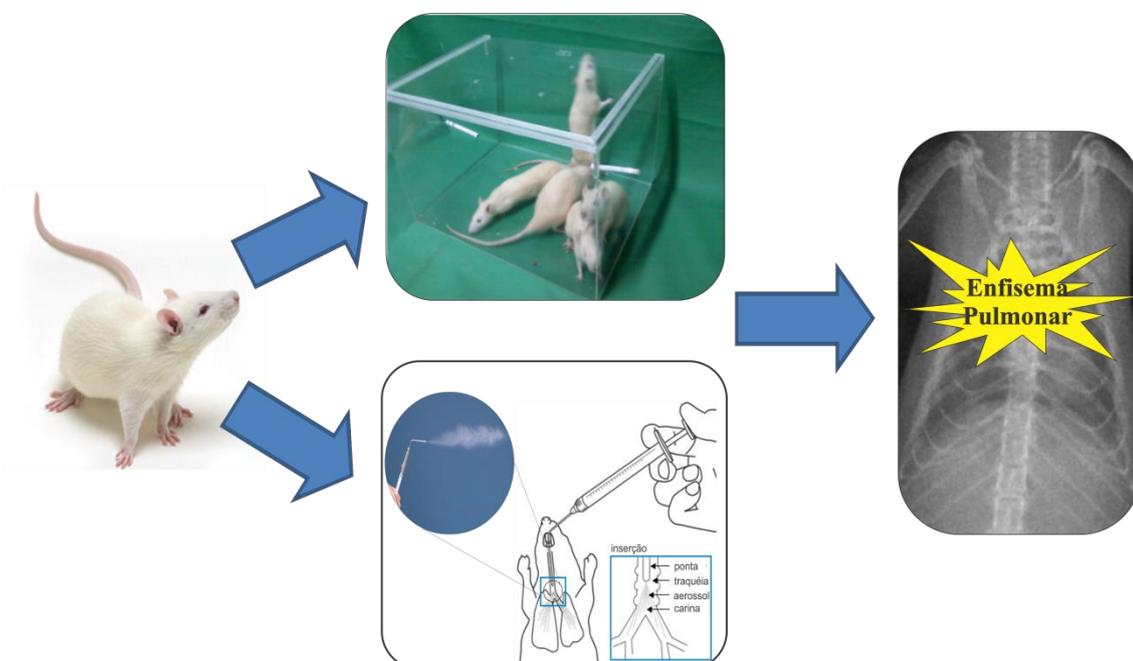
ZAKHAROVA, N. I.; SOKOLOV, V. V.; SUVOROVA, A. A.; SHIAU, A.; WU, C.; EVSTAFIEVA, A. G. Prothymosin alpha interacts with C-terminal domain of histone H1 and dissociates p53-histone H1 complex. **Molecular Biology**, v. 45, n. 4, p. 624-633, 2011.

ZHANG, R.; PAN, T.; ZHANG, Z.; MATTEI, M.; TIMPL, R.; CHU, M. Fibulin-2 (FBLN2): human cDNA sequence, mRNA expression, and mapping of the gene on human and mouse chromosomes. **Genomics**, v. 22, n. 2, p. 425-430, 1994.

ZHANG, X.; SHAN, P.; JIANG, G.; COHN, L.; LEE, P. J. Toll-like receptor 4 deficiency causes pulmonary emphysema. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 11, p. 3050-3059, 2006.

**CAPÍTULO I: Modelo animal de enfisema pulmonar:
papáina pulverizada ou fumaça de cigarro?**

**Artigo submetido à revista Brazilian Journal of Medical and
Biological Research**



Modelos animais de enfisema pulmonar: papaína pulverizada ou fumaça de cigarro?

DANTAS, R. L.¹; CAMPELO, N. B.²; FONSECA, K. M.³; LEAL, L. H. C.²; LIMA, V. B. S.⁴; PEREIRA JUNIOR, J. L.⁵; REIS, E. V. S.⁶; ALVES W. S.⁷; NUNES, L.C.C.¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Piauí, Brasil.

²Curso de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil.

³Curso de Fisioterapia da Universidade Estadual do Piauí, UESPI, Teresina, Brasil.

⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências Animal da Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Piauí, Brasil.

⁵Curso de Farmácia da Faculdade Santo Agostinho, FSA, Teresina, Brasil.

⁶Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, UFPI, Parnaíba, Brasil.

⁷Mestre em Bioengenharia, Professor Assistente da Faculdade de Ciências Médicas- Universidade Estadual do Piauí, UESPI, Teresina, Brasil.

RESUMO

O enfisema pulmonar é uma patologia com um expressivo impacto econômico e social. Apesar disso, estamos totalmente desprovidos de agentes farmacológicos que alterem a história natural da doença e diminuam a taxa de perda da função pulmonar. Essa falta é devido, em grande parte, ao nosso conhecimento limitado da patogênese da doença. Uma forma de reverter esse cenário é o desenvolvimento e a adaptação de modelos de enfisema. Nesse sentido, esta pesquisa objetivou a adaptação do modelo de enfisema com papaína, pois o seu modelo atual usa a instilação de uma solução contendo a enzima, o que tende a gerar alterações que não são compatíveis com a doença. Nós propomos um modelo que se assemelha mais ao que acontece no desenvolvimento do enfisema com cigarro em humanos. Por esse motivo, como comparativo, foi utilizado o modelo com inalação de fumaça de cigarro. Investigou-se, também, a influência da castração no desenvolvimento da doença em ratas. Para tanto, foi realizado o estudo do lavado broncoalveolar (LBA) e do tecido pulmonar, através de análise histológica e por Raio-X. No LBA foi encontrado um maior recrutamento neutrofílico e, proporcionalmente, um menor recrutamento de macrófagos e linfócitos, enquanto que nos achados do histopatológico foi observada uma grande destruição parenquimatosa, pouca metaplasia de células caliciformes e uma menor deposição de colágeno. Diante

disso, o modelo de enfisema com papaína revelou-se mais adequado para o estudo isolado do enfisema que o modelo utilizando o cigarro. Na análise radiológica e do efeito da castração, não foram encontradas diferenças significativas.

PALAVRAS-CHAVE: Enfisema pulmonar; Lesão por Inalação de Fumaça; Modelos Animais; Papaína; Histopatologia.

Abstract: Animal models of pulmonary emphysema: spraying papain or cigarette smoke?

Pulmonary emphysema is a disease with a significant economic and social impact. In contrast to this, we are totally lacking in pharmacologic agents that alter the natural history of the disease and decrease the rate of loss of lung function. This lack is due, in great extent, to our limited knowledge of disease pathogenesis. One way to reverse this scenario is the development and adaptation of animal models of emphysema. Seen in these terms, this study aimed to adapt the papain-induced experimental pulmonary emphysema model in rats, as its current model uses instillation of a solution containing the enzyme, which tends to generate changes that are not compatible with the disease. We have proposed a model that is closer to what happens in the development of cigarette smoke-induced emphysema in humans. Therefore, as a comparison, was used the cigarette smoke-induced experimental pulmonary emphysema model in rats. We also investigated the influence on the castration on the development of emphysema in rats. Thus, the study of bronchoalveolar lavage and lung tissue was performed by histological, cell count and X-ray analysis. In the animal model by spraying papain was found a higher neutrophil recruitment and destruction of the pulmonary parenchyma and a lower goblet cell metaplasia, collagen and mucus deposition than in the animal model by cigarette smoke. Thus, the animal model by spraying papain has proved to be more suitable for the isolated study of emphysema than the model using cigarette smoke. In the radiological and castration effect analysis, no significant differences were found.

KEYWORDS: Pulmonary Emphysema; Smoke Inhalation Injury; Animal Models; Papain; Histopathology.

1 INTRODUÇÃO

O enfisema pulmonar, principal consequência da DPOC, é caracterizado pela restrição permanente do fluxo de ar resultante do alargamento do espaço aéreo alveolar e da perda de elasticidade do pulmão (BARNES, 2003). Seu diagnóstico baseia-se em dados funcionais respiratórios, manifestações clínicas características, achados radiológicos sugestivos e, por fim, alterações anatomopatológicas definitivas. O principal fator de risco para o desenvolvimento, a gravidade e a progressão do enfisema é o ato de fumar (FLETCHER; PETO, 1977; BARNES, 2009; PAUWELS et al., 2012).

As estimativas sobre a prevalência da DPOC, e conseqüentemente do enfisema, têm sido baseadas primariamente nas estatísticas de mortalidade, o que configura um subdiagnóstico. Ainda assim, essas estimativas mostram que a morbimortalidade está se elevando em muitas regiões. A DPOC afeta 210 milhões de pessoas, é a quarta causa de mortalidade e representa 4,8% dos óbitos em todo o mundo. No Brasil, estima-se que existam 7,5 milhões de pessoas acometidas. Cada um desses pacientes tem um custo estimado por ano de US\$ 1.522,00, quase três vezes o custo per capita da asma (BRASIL, 2014).

Em contraste com esse impacto econômico e social, estamos totalmente desprovidos de agentes farmacológicos que alterem a história natural da doença e diminuam a taxa de perda da função pulmonar. Essa falta é devido, em grande parte, ao nosso conhecimento limitado da patogênese da doença (ELIAS; LEE, 2005). Uma forma de reverter esse cenário é o desenvolvimento e a adaptação de modelos animais de enfisema. Esses modelos aumentam, de forma progressiva, o nosso conhecimento sobre os fatores envolvidos com essa doença (ROBBESOM et al., 2007).

Em laboratório, o enfisema pode ser desencadeado através da indução de apoptose, que pode ocorrer por bloqueio do fator de crescimento do endotélio vascular, pela administração intrapulmonar de caspase 3 e ceramida (ELIAS; LEE, 2005) e pela superexpressão do fator de crescimento placentário (HOU et al., 2013) e da *Prothymosin α* (SU; TSENG et al., 2013). Outros métodos de desencadear um enfisema é por nocaute gênico do receptor *toll like 4* (WANG et al., 2011) e da fibrilina-1 (ROBBESOM; KOENDERS et al., 2007), pelo desequilíbrio nas atividades protease/antiprotease e oxidante/anti-oxidante, que pode ser induzido por fumaça de cigarro (WRIGHT; CHURG, 2002), pela administração de papaína (GROSS et al.,

1965), por elastase pancreática de porco e de neutrófilos humanos (SNIDER; LUCEY; STONE, 1986) e, por fim, pelo bloqueio da alfa-1-antitripsina (ERIKSSON, 1965).

Nesses modelos de enfisema nos deparamos com as complexas relações envolvidas com a doença, incluindo a participação das interações gene-ambiente (WANG et al., 2011), do sistema autoimune (TARASEVICIENE-STEWART et al., 2005; CALVERLEY; RENNARD, 2007; LEE et al., 2007) e dos fatores genéticos (MAHADEVA; SHAPIRO, 2002; WRIGHT; CHURG, 2002; PATEL et al., 2008; ISHII et al., 2011). A participação dos fatores genéticos pode ser verificada, por exemplo, quando se observa que o ato de fumar só causa enfisema em cerca de 15-20% dos fumantes (FLETCHER; PETO, 1977; PAUWELS et al., 2012).

Nesse contexto, faz-se necessário a utilização de modelos pulmonares que possibilitem o conhecimento exato do início da doença, para que tenhamos um melhor entendimento dessa patologia. Dessa forma, este estudo teve como objetivo adaptar o modelo de enfisema com papaína, enzima proteolítica extraída da fruta e seiva da papaia (*Carica papaya*). Essa enzima foi escolhida devido ao seu baixo custo, facilidade de obtenção e por possuir ação semelhante a elastase neutrofílica no desenvolvimento do enfisema pulmonar (FUSCO et al., 2002; WEST, 2010).

Grande parte dos modelos experimentais de enfisema a base de papaína usam a instilação de uma solução contendo a enzima. A presença de líquido no pulmão, embora em pequenas quantidades, tende a gerar atelectasias (JOHNSTON; CARVALHO, 2008) e outras alterações que não são compatíveis com o enfisema (IRION; MARCHIORI; HOCHHEGGER, 2009). Por ser mais fisiológico, nós propomos um modelo com a pulverização do pó da papaína. Além disso, nós fracionamos a dose com o objetivo de parcelar o recrutamento celular, o que acontece no desenvolvimento do enfisema com cigarro em humanos. Por esse motivo, como comparativo, foi utilizado o modelo com inalação da fumaça do cigarro. Investigou-se, também, o efeito da castração, como forma de avaliar se as mulheres pós-menopausa correm riscos adicionais de desenvolver a doença. Além disso, como a radiografia convencional de tórax, exame de simples execução, geralmente é um dos primeiros a serem solicitados na avaliação de paciente com queixas e história de exposição compatíveis com o enfisema (BRUNO et al., 2009), realizou-se a análise radiológica dos animais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Metodologia com Animais

Os experimentos com animais foram realizados após aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UESPI (CEP-UESPI 001/2012) e foram desenvolvidos em conformidade com as diretrizes do conselho nacional de controle de experimentação animal - CONCEA. Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*), com três meses de vida e peso médio de $300 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$ provenientes do Biotério da UFPI. Os animais foram mantidos sob condições livres de organismos patogênicos. Os procedimentos de anestesia foram realizados com administração subcutânea de 0,2 ml de midazolam e 0,3 ml de ketamina. Para a eutanásia foi realizada tração cervical.

2.1.1 Grupos experimentais

Foram formados 5 grupos (n=10): grupo controle; grupo enfisema/papaína 22d, grupo enfisema/papaína 31d; grupo enfisema cigarro e grupo enfisema/papaína 22d/castração.

2.1.2 Ooforectomia das ratas

O procedimento de ooforectomia pode ser visualizado na ilustração 1.

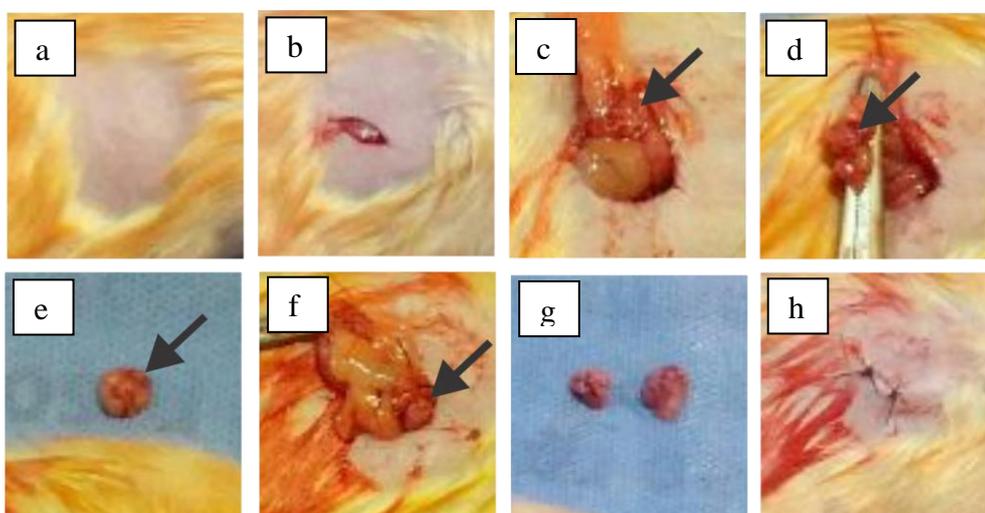


Ilustração 1: Ooforectomia das ratas.

Após a indução anestésica, os animais foram imobilizados em decúbito ventral e, em seguida, foi realizada a tricotomia do dorso entre as últimas costelas e a região pélvica, ilustração 1.a. A sepsia foi feita com álcool iodado a 2%. Em seguida, foi feita uma incisão de 1 cm na pele e na musculatura, ilustração 1.b, possibilitando o acesso a cavidade abdominal. Com uma pinça, foi puxada delicadamente a gordura que envolve o ovário para fora da incisão, expondo o órgão e a porção superior do corno uterino,

ilustração 1.c. Com uma pinça hemostática, foi pinçado o tecido entre o ovário e o oviduto, ilustração 1.d, procedendo a uma ligadura (com o fio) e excisão do ovário, ilustração 1.e. Então, pela mesma incisão foi puxado o segundo corno uterino para que a operação fosse realizada no outro ovário, ilustração 1.f. Por fim, foram recolocados os cornos uterinos na cavidade abdominal e realizada a suturada na camada muscular e na pele, ilustração 1.h.

2.1.3 Indução do enfisema

Os modelos utilizados neste estudo são apresentados na ilustração 2.

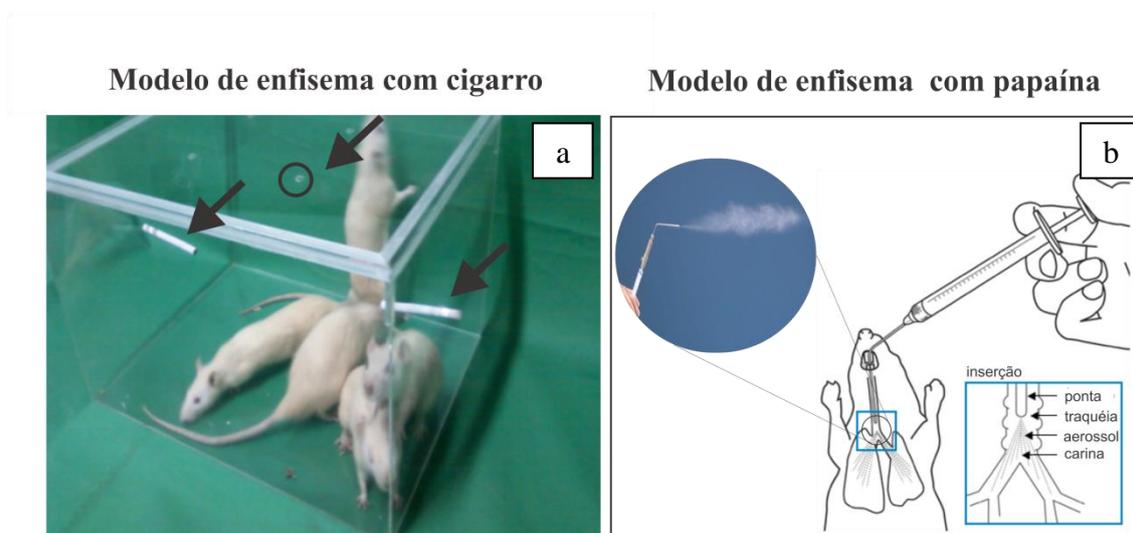


Ilustração 2: Modelos de enfisema. Legenda: (a) grupo cigarro; (b) grupos papaína.

Para induzir o enfisema com cigarro, os animais ficaram em uma câmara acrílica medindo 40x30x25 cm por 30 minutos duas vezes ao dia, totalizando 8 cigarros (marca *US Mild*) com filtro por dia, durante 45 dias. A câmara de inalação continha quatro aberturas superiores, para permitir a ventilação, e duas aberturas laterais para a introdução dos cigarros, destaques na ilustração 2.a. A indução do enfisema pulmonar por papaína foi realizada por meio de três pulverizações, com intervalos de 7 dias entre elas, de 3 mg de papaína, ilustração 2.b. A pulverização foi realizada utilizando um microspray (Penn-Century®). A dosagem estabelecida foi adaptada do modelo experimental de Fusco (FUSCO et al., 2002).

2.1.4 RX dos animais

Para a análise dos achados radiológicos, os animais foram anestesiados e dispostos em decúbito ventral e perfil para a realização do RX em um RAEX RC/300 D[®]. Foram utilizados, como parâmetros, 225mA e 49KV.

2.2 Metodologia com células e tecidos

No 22^o e 31^o dia da primeira pulverização de papaína e no 45^o dia de inalação de cigarro, os animais foram eutanasiados para a realização do LBA, que permite a contagem total e diferencial de células, e do histopatológico.

2.2.1 Lavado broncoalveolar

A canulação da traqueia para a realização do lavado é apresentada na ilustração 3.

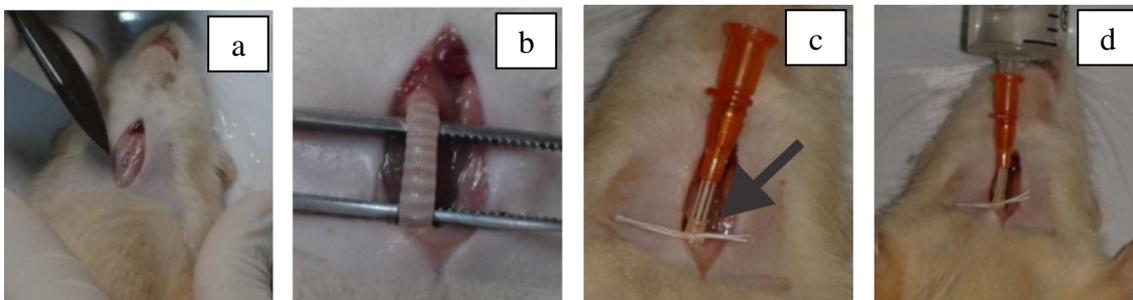


Ilustração 3: Lavado broncoalveolar

Após a anestesia, foram retirados 10 ml de sangue pela artéria abdominal. Em seguida, foi realizado a traqueostomia e o acoplamento da cânula, ilustração 3.a-c, a qual foi fixada à traqueia para evitar o extravasamento da Solução Salina Fosfatada Tamponada (PBS), indicada pela seta na ilustração 3.c. Através da cânula, foram introduzidos 20 ml de PBS, ilustração 3.d. Durante a introdução, foi realizada uma massagem na região torácica e em seguida, foram aspirados de 17 a 20 ml do lavado, o qual foi centrifugado por 10 min a 1500 rpm. Então, foram coletados 0,5 ml para contagem diferenciada (câmara de suta). Ao botão celular, foram adicionados 0,5 ml de PBS e 0,8 ml de cristal violeta. Em seguida foi coletado 0,1 ml da amostra para contagem em câmara de Neubauer. A contagem diferenciada foi realizada após coração com panótico rápido, de acordo com as instruções do fabricante, Laborclin[®].

2.2.2 Histopatológico

Para retirada do pulmão foi realizada uma perfusão cardíaca para a retirada do sangue pulmonar. Em seguida, os animais foram novamente acoplados à cânula.

Através dessa, foi introduzido formaldeído a 10% tamponado. Os pulmões foram conservados por um período de 24 horas e então, transferidos para recipientes contendo álcool etílico a 70%, onde permaneceram por cerca de 72 horas. Em seguida, procedeu-se à desidratação das peças em série alcoólica de concentração crescente (80% por 1 hora, 90% por uma hora, 95% por uma hora e 100% em dois banhos de uma hora cada). Então foram diafanizadas em xilol (duas passagens de duas horas), impregnadas em parafina histológica (duas passagens de duas horas em estufa a 60°C) e colocadas em blocos de parafina. Os blocos foram seccionados em micrótomo Olympus, modelo CUT 4055 II, em seções com 5,0 µm de espessura. As amostras seccionadas foram, em seguida, desparafinizadas em xilol (2/ 3 minutos) e hidratadas em série alcoólica de concentração decrescente até água pura (100%/2 minutos, 95%/2 minutos, 70%/2 minutos e água destilada), conforme descrito anteriormente (SILVA et al., 2004).

As lâminas contendo os cortes histológicos foram, então, coradas com Hematoxilina-Eosina (HE), PAS-Alcian Blue, Tricrômicos de Masson e Picrosírius, de acordo com as instruções do fabricante, Easypath®.

2.3 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, em seguida, ao teste Newman-Keuls. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o GraphPad Prism 5. Os resultados foram expressos como a média ± erro-padrão da média (EPM). Valores de $p < 0,001$ foram considerados significativos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O enfisema induzido por fumaça de cigarro em modelos animais, assim como os modelos de enfisema com papaína, contam com o inconveniente da falta de padronização, pois diferem no tempo de exposição, no protocolo utilizado para induzir as lesões e, conseqüentemente, nos graus de alterações produzidas (WRIGHT; CHURG, 2002). O primeiro modelo animal de enfisema com inalação de fumaça de cigarro foi relatado em 1990. Nesse modelo, a exposição de porquinho-da-índia a 10 cigarros por dia, 5 dias por semana, durante 1, 3, 6 e 12 meses resultou em enfisema e perda progressiva da função pulmonar semelhantes ao observado em humanos (WRIGHT; CHURG, 1990). Entretanto, a exposição de cigarro por 45 dias já é o suficiente para se obter recrutamentos neutrofílicos e alterações histopatológicas compatíveis com o

enfisema, como já havia sido relatado (OLIVEIRA et al., 2010; ALVES et al., 2010). Por esse motivo, os animais do grupo cigarro foram expostos a 45 dias de inalação.

O primeiro modelo com papaína foi desenvolvido em ratos há quase 50 anos (GROSS et al., 1965). Depois dele, outros modelos surgiram, como o desenvolvido com instilação (TAKARO; WHITE, 1973) e nebulização (HADDAD et al., 1979) de solução de papaína em cães. Dentre os modelos de papaína em ratos, podemos destacar o que causou enfisema com a instilação de cerca de 6mg de papaína por animal e avaliou o enfisema após 50 dias. Esse modelo de enfisema, em muitos aspectos, se assemelha ao encontrado em humanos (FUSCO et al., 2002). Entretanto, a curto prazo, esse modelo não se mostrou tão compatível, uma vez que foram encontradas grande áreas de congestão e de colabamento alveolar (DANTAS et al., 2012). Uma forma de se contornar esse problema é através do modelo proposto por este estudo, onde o fracionamento e a pulverização do pó de papaína permitiram, em pouco tempo, que os achados característicos do enfisema fossem encontrados. Os dados que fundamentam isso podem ser encontrados nas ilustração 4-8.

Na ilustração 4, são apresentados os dados da contagem total de células do LBA.

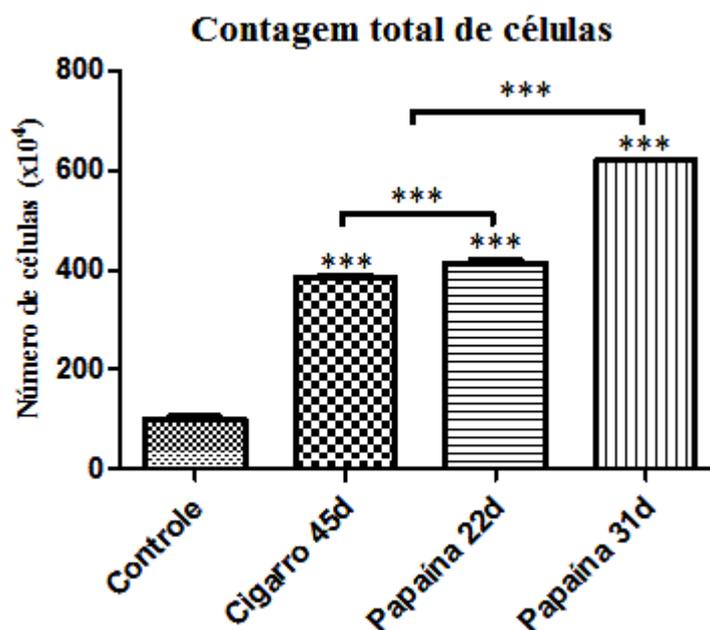


Ilustração 4: Contagem total de células do LBA. Os valores apresentados representam a média \pm E.P.M. dos experimentos realizados ($n = 10$).***, estatisticamente significativo, $p < 0,001$. ANOVA seguida de Newman-Keuls.

Os dados apresentados na ilustração 4 mostram que os grupos papaína e o grupo cigarro apresentaram, em relação ao controle, um aumento significativo na contagem

total de células inflamatórias, os dois modelos são potentes indutores inflamatórios. Isso é relevante porque existe uma associação positiva entre o número de células inflamatórias e a gravidade do enfisema (CHUNG; ADCOCK, 2008).

Ainda na ilustração 4, ao compararmos os dois grupos papaína, é possível constatar uma rápida progressão do recrutamento celular, no grupo papaína 31d em relação ao grupo 22d, uma vez que o grupo 31d apresentou um aumento significativo na contagem celular do LBA. Esse acréscimo pode ser atribuído a existência de um *feedback* de degradação (ELIAS; LEE, 2005). Esse *feedback* pode ser causado, por exemplo, pelas proteinases do hospedeiro (KUHN; STARCHER, 1980). Em outras palavras, esses dados mostram que existe uma progressão da inflamação no modelo de enfisema induzido por papaína.

Na ilustração 5, são apresentados os dados da contagem de neutrófilos do LBA.

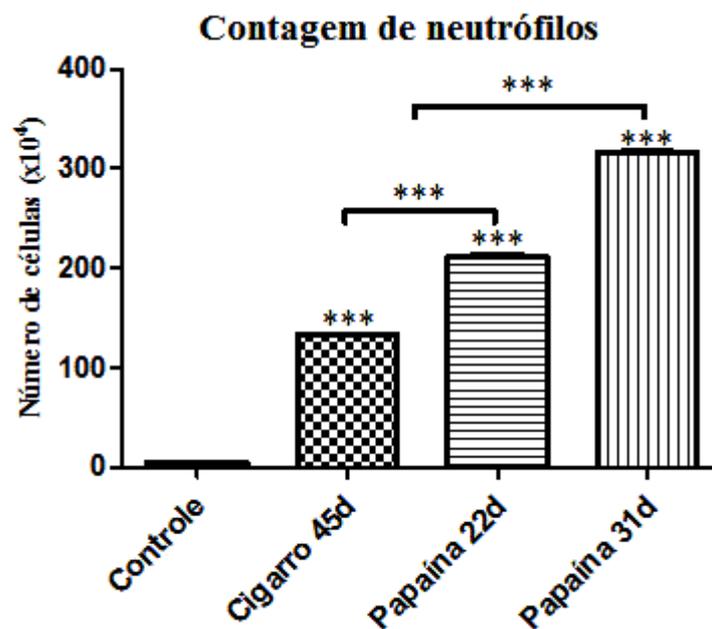


Ilustração 5: Contagem de neutrófilos do LBA. Os valores apresentados representam a média \pm E.P.M. dos experimentos realizados (n = 10).***, estatisticamente significativo, $p < 0,001$. ANOVA seguida de Newman-Keuls.

É possível observar na ilustração 5 que o grupo controle apresentou uma contagem de neutrófilos estatisticamente próximo a zero. Isso mostra que os animais do grupo controle estão saudáveis, os neutrófilos são abundantes no sangue, mas praticamente ausentes nos tecidos pulmonares saudáveis (WAGNER; ROTH 2000). Também é possível observar que os grupos papaína apresentaram uma proporção maior

de neutrófilos que o grupo cigarro. Vale salientar que os neutrófilos são as células inflamatórias encontradas em maior quantidade em pacientes com enfisema, eles são observados no escarro induzido e no LBA desses pacientes. Os neutrófilos secretam proteinases como a elastase neutrofílica, a catepsina neutrofílica e a proteinase neutrofílica-3, que irão contribuir para o desequilíbrio entre proteases e antiproteases e irão provocar a destruição do tecido pulmonar. Além disso, no período da exacerbação da DPOC, há maior aumento do número de neutrófilos nas vias aéreas e no LBA (TARANTINO, 2008).

Na ilustração 6, são apresentados os dados da contagem de macrófagos do LBA.

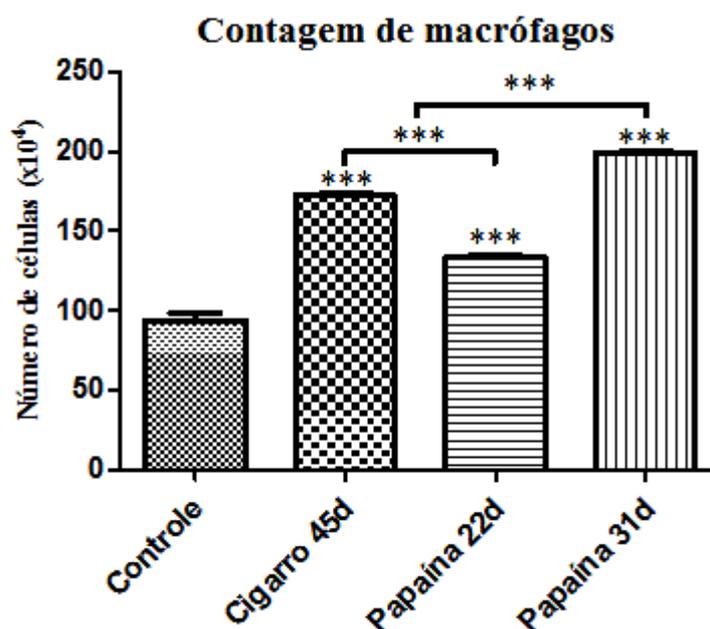


Ilustração 6: Contagem de macrófagos do LBA. Os valores apresentados representam a média \pm E.P.M. dos experimentos realizados (n = 10).***, estatisticamente significativo, $p < 0,001$. ANOVA seguida de Newman-Keuls.

Os macrófagos alveolares são representantes da primeira linha de defesa pulmonar e atuam na depuração pulmonar através da captação, transporte e eliminação de partículas, microorganismos e líquido por processos de fagocitose, pinocitose e digestão (VALENÇA et al.; 2004, VALENÇA; PORTO 2008). Em condições normais, representam 90% das células aspiradas na contagem celular do LBA, o que explica a grande proporção de macrófagos no grupo controle, ilustração 6 (RUFINO; SILVA, 2006).

Na ilustração 7, são apresentados os dados da contagem de linfócitos do LBA.

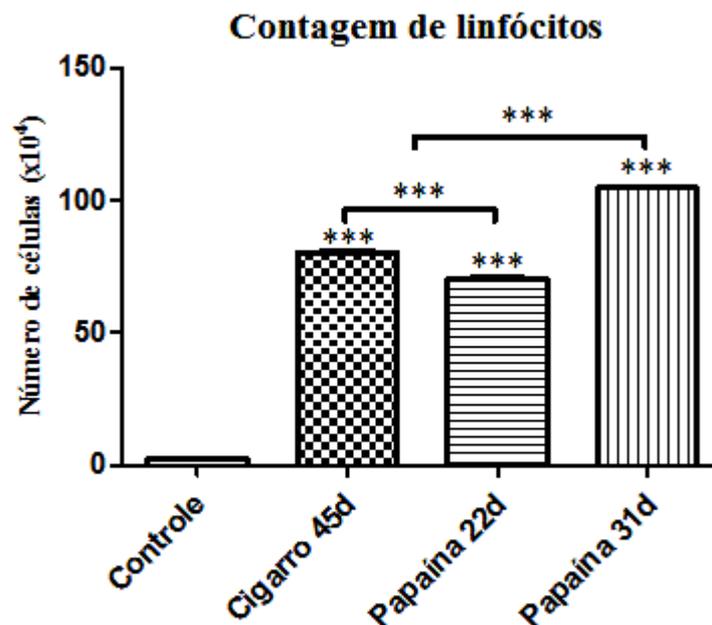


Ilustração 7: Contagem de linfócitos do LBA. Os valores apresentados representam a média \pm E.P.M. dos experimentos realizados ($n = 10$).***, estatisticamente significativo, $p < 0,001$. ANOVA seguida de Newman-Keuls.

Os macrófagos também desempenham um papel importante na inflamação da DPOC por meio da liberação de mediadores, tais como o TNF-alfa, IL-8 e LTB₄, que promovem a inflamação neutrofílica (MENEZES et al., 2005). Entretanto, no LBA de pacientes com DPOC ocorre uma diminuição percentual de macrófagos e uma manutenção na contagem total de linfócitos (TARANTINO, 2008; RUFINO; SILVA, 2006; RUFINO et al., 2007). Dessa forma, o modelo de enfisema com papaína mostrou-se mais adequado do que o modelo utilizando o cigarro por 45 dias pois, proporcionalmente, o modelo com papaína apresentou uma proporção menor de macrófagos, ilustração 6, e linfócitos, ilustração 7, em relação ao modelo utilizando o cigarro. Nesse último, ocorreu neutrofilia acompanhada de acúmulo de macrófagos e linfócitos, o que já havia sido observado em outros estudos com cigarro (WRIGHT, 2001; MESHİ et al., 2002).

Isso, porém, não diminui a importância dos macrófagos e linfócitos na patogênese da DPOC. Em biópsias brônquicas obtidas a partir de vias aéreas centrais, os fumantes tiveram um aumento do número de macrófagos e linfócitos T em comparação com não fumantes (MENEZES et al., 2005). Foi verificado, também, que no tecido

pulmonar de pacientes com DPOC as áreas mais destruídas eram circundadas por processo macrofágico e linfocitário. Estudos do processo inflamatório que ocorre tanto nas vias aéreas quanto na periferia pulmonar de pacientes com DPOC têm demonstrado infiltrado de linfócitos T associado aos macrófagos, fazendo com que os autores sugerissem a interação entre essas células na patogênese da DPOC (HOGG; SENIOR, 2002).

Embora seja menos acessível, uma vez que a papaína é barata e pode ser comprada na maioria das farmácias de manipulação, também é possível desenvolver enfisema com EPP. Estudos recentes e relevantes utilizaram o modelo de enfisema com EPP, dentre esses, podemos citar a pesquisa envolvendo o FCP (HOU; CHENG et al., 2013) e o anticolinérgico brometo Mepenzolate (TANAKA et al., 2013). Nessas pesquisas, os autores relatam que encontraram um grau de destruição parenquimatosa equivalente ao encontrado no grupo papaína 22d e 31d, foco do presente estudo, como pode ser visto na ilustração 8.

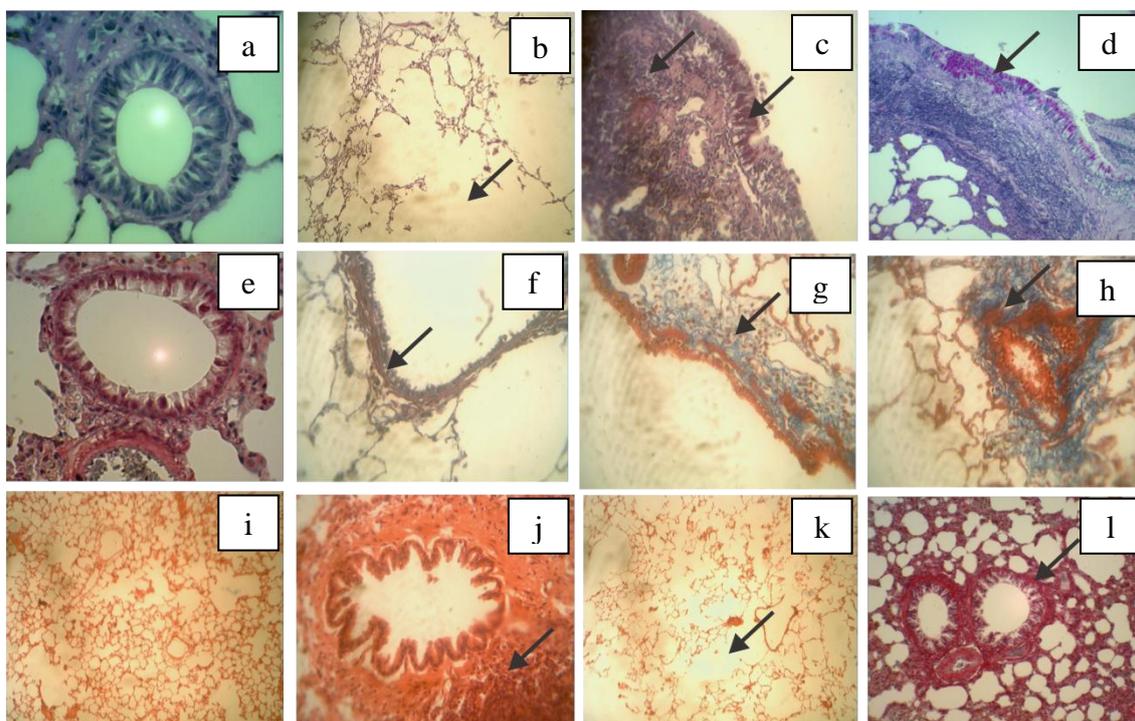


Ilustração 8: Análise histopatológica dos grupos avaliados. Lâminas a, e, j objetiva de 40X, demais lâminas na objetiva de 10X. Legenda: Coloração PAS-Alcian Blue (PAS) (a) do grupo controle; (b) grupo enfisema papaína 31d; (c e d) grupo cigarro 45d; (e) Picrosírius do grupo controle; (f e g) Tricrômicos de Masson (Massom) do grupo papaína; (h) Massom do grupo cigarro 45d; (i) Hematoxilina-Eosina (HE) do grupo

controle; (j) HE do grupo papaína 31d; (k) HE do grupo papaína 22d; (l) Picrosírius do grupo cigarro 45d.

Analisando a ilustração 8, podemos notar a ausência de metaplasia de célula caliciforme e de muco, ilustração 8.a. No entanto na ilustração 8.b, podemos visualizar a destruição do parênquima alveolar (em destaque) e a presença de pouca metaplasia de célula caliciforme e de muco; já na ilustração 8.c, o destaque indica a presença de metaplasia de célula caliciforme e infiltrado celular, nessa lâmina também foi encontrado um aumento na quantidade de muco, e na ilustração 8.d o destaque indica a presença de metaplasia de célula caliciforme. Na ilustração 8.e, podemos perceber a pouca concentração de colágeno (em vermelho), o que foi confirmado quando se corou o bloco dessa lâmina com Masson (nesse caso, mostrando o colágeno em azul), enquanto que na ilustração 8.f e 8.g, percebe-se a presença das fibras colágenas, caracterizada pela cor azul. Na ilustração 8.h, percebe-se uma maior proporção de fibras colágenas do que o encontrado na ilustração 8.f e 8.g. Por fim, analisando a ilustração 8.i, percebe-se a preservação da estrutura pulmonar, na ilustração 8.j, pode-se visualizar a presença de infiltrado de células inflamatórias; na ilustração 8.k, nota-se que houve a perda de parênquima pulmonar e na ilustração 8.l, visualiza-se o aumento na concentração de fibras colágenas.

Analisando a coloração PAS-Alcian Blue (PAS), ilustração 8, podemos observar que, em relação ao controle, ilustração 8.a, o grupo cigarro 45d apresentou grandes áreas de infiltrado inflamatório, presença de metaplasia de células caliciformes e aumentos na quantidade de muco, ilustração 8.c e 8.d. Esses resultados são mais característicos da bronquite crônica e não do enfisema (MARTINEZ; GOTTSCHALL, 1979). Apesar dos grupos papaína 22d e 31d apresentarem grandes áreas de infiltrado celular, ilustração 8.j, não foi encontrado aumento significativo na metaplasia de células caliciformes e nem no muco. Os achados mais característico desses grupos foi a destruição parenquimatosa, como pode ser observado nas colorações PAS e HE, ilustração 8.b e 8.k, respectivamente.

Ainda na ilustração 8, podemos analisar a deposição de colágeno. Essa deposição, analisada pelos métodos de coração de Tricrômicos de Masson (Masson) e Picrosírius, revela que o grupo cigarro 45d apresentou maior quantidade de colágeno que os grupos papaína. Esse resultado pode ser observado ao compararmos a coração Masson, ilustração 8.h, e Picrosírius, ilustração 8.l, do grupo cigarro 45d com a coração

Masson dos grupos papaína, ilustração 8.f e 8.g. O enfisema é uma patologia sem fibrose óbvia e esta fibrose, em grande parte, esta relacionada à deposição de colágeno (KIELTY; SHERRATT; SHUTTLEWORTH, 2002). Dessa forma, mais uma vez, o modelo com papaína se mostra mais adequado para o estudo do enfisema do que o modelo com cigarro.

Embora não tenhamos desenvolvido uma modelo comparativo entre a papaína e o EPP, em muitos aspectos, pelos dados da literatura, o modelo de enfisema com papaína revelou-se mais adequado para o estudo isolado do enfisema do que o com elastase. Segundo a literatura, no enfisema induzido por EPP, ocorre metaplasia de células secretoras, anormalidades da função pulmonar, hipoxemia, e hipertrofia ventricular direita, as quais são características da DPOC humano, ou seja, bronquite crônica e enfisema. A administração intratraqueal de EPP é seguida pela perda inicial de elastina e colágeno. Ao longo do tempo, a elastina e os glicosaminoglicanos retornam ao normal e o colágeno aumenta novamente, ainda que a matriz extracelular intraparenquimatosa (ECM) permaneça reduzida e distorcida e a arquitetura do pulmão permaneça grosseira e permanentemente anormal (KUHN et al., 1976).

Na ilustração 9, são apresentados os RX dos grupos avaliados.

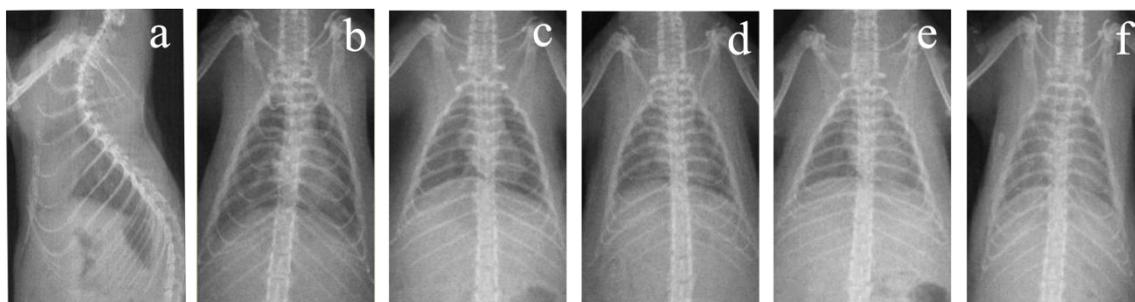


Ilustração 9: RX dos grupos avaliados. Legenda: (a) RX em perfil do grupo controle; (b) RX pósterio-anterior (PA) do grupo controle; (c) RX PA do grupo cigarro 45d; (d) RX PA do grupo papaína castração; (e) RX PA do grupo papaína 22d; (f) RX PA do grupo papaína 31d.

A radiografia convencional de tórax, exame de simples execução, geralmente é um dos primeiros a serem solicitados na avaliação de paciente com queixas e história de exposição compatíveis com o enfisema. Dentre as alterações radiológicas compatíveis com essa doença, podemos destacar a presença de hiperinsuflação pulmonar, apesar de poder estar presente em outras situações como no transplante pulmonar e na

bronquiolite obliterante, o aumento do diâmetro ântero-posterior e do espaço retroesternal e o aplainamento e retificação das cúpulas diafragmáticas. Todos esses achados tendem a aumentar o tamanho pulmonar. Estudos antigos já correlacionavam a medida objetiva do tamanho pulmonar na radiografia de tórax com alterações espirométricas, encontrando grande reprodutibilidade e valores preditivos positivos muito confiáveis. Na análise estatística do tamanho do tórax, ilustração 9, entretanto, não foram encontradas diferenças significativas nos grupos avaliados, o que pode ser devido ao estágio inicial da patologia, já que poucas alterações morfológicas podem ser surpreendidas nas fases iniciais com esse método. À medida que ocorre a progressão da doença, porém, algumas alterações com razoável sensibilidade e baixa especificidade podem ser encontradas na radiografia convencional (REICH; WEINSHELBAUM; YEE, 1985; BRUNO et al., 2009).

Outra apresentação radiológica muito associada à DPOC, e que também não foi encontrada na ilustração 9, é a formação de bolhas pulmonares, verdadeiras “ilhas” avasculares e destituídas de parênquima pulmonar funcionante e responsáveis por piora funcional respiratória atribuída a compressão de tecido preservado adjacente, além de potencial gerador de pneumotórax, complicação sempre temida no contexto da doença bolhosa. Apesar da clara associação existente entre enfisema e formação de bolhas, outras patologias podem cursar com a mesma manifestação. Um exemplo corrente em nosso meio é a seqüela de tuberculose em sua forma de caverna insuflada gerada por mecanismo de válvula unidirecional e desestruturação da árvore brônquica com apresentação radiográfica bastante semelhante da bolha enfisematosa (FRIEDMAN, 2008).

Por fim, a curto prazo, quando se comparou as ratas castradas com as não castradas, não foram observadas alterações significativas na contagem total e diferencial de células e nem na análise anatomopatológica. Entretanto, a longo prazo, o resultado encontrado poderia ser diferente, pois tanto o estrogênio quanto os demais hormônios esteroidais atuam na transcrição gênica (PRENZEL et al., 2011), no processo de inicialização da lipoperoxidação, na proteção contra dano no DNA (VIGO et al., 2003; COLARES, 2011; THOMAS et al., 2011) e na regulação da atividade das enzimas antioxidantes, como a glutatona peroxidase (ROBB; STUART, 2011).

4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados dos achados do LBA, podemos concluir que o modelo de enfisema com papaína revelou-se mais adequado para o estudo isolado do enfisema do que o modelo utilizando o cigarro como desencadeador do enfisema. No modelo com papaína foi encontrado um maior recrutamento neutrofílico, em relação aos macrófagos e linfócitos, bem como uma maior destruição parenquimatosa. Além disso, foi encontrado uma menor metaplasia de células caliciformes e uma menor deposição de colágeno do que a encontrada no modelo com cigarro. Dessa forma, no estudo da bronquite crônica associada ao enfisema, a melhor opção seria o modelo com cigarro.

Pode-se concluir ainda que, na análise do efeito da castração sobre o desenvolvimento do enfisema, não foram encontradas diferenças significativas, o que não significa que esse efeito não ocorra, uma vez que esse efeito pode ter sido mascarado pela agressiva inflamação e destruição proporcionada pela pulverização da papaína. Uma forma de confirmar isso seria através da análise do efeito da castração durante um longo período de tempo.

Além disso, não foram encontradas diferenças radiológicas significativas nos grupos avaliados, o que pode ser devido ao estágio inicial da patologia, já que poucas alterações morfológicas do enfisema podem ser surpreendidas nas fases iniciais com Raio-X.

Por fim, podemos concluir que o modelo de enfisema com pulverização de papaína mostrou ser uma ferramenta útil, particularmente, para o estudo de lesão proteolítica. Além disso, os achados inflamatórios seguintes à administração de papaína sugerem que este modelo também pode fornecer informações relevantes no estudo inflamatório e de proteases endógenas.

REFERÊNCIAS

- ALVES, W. S.; OLIVEIRA, G. C.; SANTO, L. A. E.; BESERRA, M. R. S.; CARVALHO, F. A. S. Efeito da laserterapia de baixa potência na inflamação pulmonar em *rattus norvegicus*. **ConScientiae Saúde**, v. 9, n. 4, p. 610-617, 2010.
- BARNES, P. J. New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. **Annual Review of Medicine**, v. 54, n. 1, p. 113-129, 2003.
- BARNES, P. J. Role of HDAC2 in the pathophysiology of COPD. **Annual review of physiology**, v. 71, p. 451-464, 2009.
- BARR, R. G.; BLUEMKE, D. A.; AHMED, F. S.; CARR, J. J.; ENRIGHT, P. L.; HOFFMAN, E. A.; JIANG, R.; KAWUT, S. M.; KRONMAL, R. A.; LIMA, J. A. C. Percent emphysema, airflow obstruction, and impaired left ventricular filling. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 3, p. 217-227, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Doenças respiratórias crônicas / Ministério da Saúde**. Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- BRUNO, L. P.; CAPONE, D.; MOTTA, J. P. S.; LOPES, A. J.; NUNES, D. H.; OLIVEIRA, J. G. P.; CAPONE, R. Imagem em DPOC. **Pulmão RJ**, v.1, n.1, p. 38-44, 2009.
- CHUNG, K. F.; ADCOCK, J. M. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair destruction. **European Respiratory Journal**, v. 31, p. 1334-56, 2008.
- GRUBER, C. J.; TSCHUGGUEL, W.; SCHNEEBERGER, C.; HUBER, J. C.; Production and Actions of Estrogens. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, p. 340-351, 2002.
- DANTAS, R. L.; PINTO, J. G. M.; LIMA, R. O.; OLIVEIRA, R. A.; ALVES, W. S. Fotobiomodulação experimental na prevenção de enfisema pulmonar. **ConScientiae Saúde**, v. 11, n. 1, p. 53-59, 2011.
- ELIAS, J. A.; LEE, C. G. Lipid let loose in pulmonary emphysema. **Nature medicine**, v. 11, n. 5, p. 471-472, 2005.
- ERIKSSON S. Studies in α 1-antitrypsin deficiency. **Acta Medica Scandinavica**, v. 432, p. 1-85, 1965.
- FALCO, S. The discovery of placenta growth factor and its biological activity. **Experimental & molecular medicine**, v. 44, n. 1, p. 1-9, 2012.
- 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. **Jornal de Pneumologia**, v. 28, n. 1, p. 1-7, 2002.

FRIEDMAN, P. J. Imaging studies in emphysema. **Proceedings of the American Thoracic Society**; v. 5, p. 494-500, 2008.

GROSS, P; PFITZER, E A.; TOLKER, E; BABYAK, M A; KASCHAK, M. Experimental emphysema: its production with papain in normal and silicotic rats. **Archives of Environmental Health: An International Journal**, v. 11, n. 1, p. 50-58, 1965.

HADDAD, A. G.; PIMMEL, R. L.; SCAPEROTH, D. D.; BROMBERG, P. A. Forced oscillatory respiratory parameters following papain exposure in dogs. **Journal of Applied Physiology**, v. 46, n. 1, p. 61-66, 1979.

HOGG, J. C.; SENIOR, R. M. Chronic obstructive pulmonary disease part 2: pathology and biochemistry of emphysema. **Thorax**, v. 57, n.9, p. 830-834, 2002.

HOU, H. H.; CHENG, S. L.; LIU, H. T.; YANG, F. Z.; WANG, H. C.; YU, C. J. Elastase induced lung epithelial cell apoptosis and emphysema through placenta growth factor. **Cell death & disease**, v. 4, n. 9, p. 793, 2013.

IRION, K. L.; MARCHIORI, E.; HOCHHEGGER, B. Tomographic diagnosis of pulmonary emphysema. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 9, p. 821-823, 2009.

ISHII, T.; HAGIWARA, K.; KAMIO, K.; IKEDA, S.; ARAI, T.; MIENO, M. N.; KUMASAKA, T.; MURAMATSU, M.; SAWABE, M.; GEMMA, A. Involvement of surfactant protein D in emphysema revealed by genetic association study. **European Journal of Human Genetics**, v. 20, n. 2, p. 230-235, 2011.

JOHNSTON, C.; CARVALHO, W. B. D. Atelectasia en el niño: mecanismos, diagnóstico y tratamiento. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 5, p. 455-460, 2008

KIELTY, CAY M.; SHERRATT, M. J.; SHUTTLEWORTH, C. A. Elastic fibres. **Journal of cell science**, v. 115, n. 14, p. 2817-2828, 2002.

KUHN 3RD, C.; STARCHER, B. C. The effect of lathyrogens on the evolution of elastase-induced emphysema. **The American review of respiratory disease**, v. 122, n. 3, p. 453, 1980.

KUHN, C.; YU, S.; CHRAPLYVY, M.; LINDER, H. E.; SENIOR, R. M. The induction of emphysema with elastase. II. Changes in connective tissue. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 34, n. 4, p. 372-380, 1976.

MAHADEVA, R.; SHAPIRO, S. D. Chronic obstructive pulmonary disease: Experimental animal models of pulmonary emphysema. **Thorax**, v. 57, n. 10, p. 908-914, 2002.

MARTINEZ, D.; GOTTSCHALL, C. A. M. Anatomia patológica da bronquite crônica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 5, n. 3, p. 108-110, 1979.

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.

MESHI, B.; VITALIS, T. Z.; IONESCU, D.; ELLIOTT, W. M.; LIU, C.; WANG, X.; HAYASHI, S.; HOGG, J. C. Emphysematous lung destruction by cigarette smoke: the effects of latent adenoviral infection on the lung inflammatory response. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 26, n. 1, p. 52-57, 2002.

OCHS, M. Estimating structural alterations in animal models of lung emphysema. Is there a gold standard? **Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger**, v. 196, n. 1, p. 26-33, 2013.

OLIVEIRA, G. C.; SANTO, L. A. E.; SÁ, H. P.; NUNES, H. M.; ALVES, W. S.; CARVALHO, K. C. Efeito da laserterapia de baixa potência na inflamação pulmonar em *rattus norvegicus*. **ConScientiae Saúde**, v. 9, n. 4, p. 659-666, 2010.

PRENZEL, T.; BEGUS-NAHRMANN, Y.; KRAMER, F.; HENNION, M.; HSU, C.; GORSLER, T.; HINTERMAIR, C.; EICK, D.; KREMMER, E.; SIMONS, M. Estrogen-dependent gene transcription in human breast cancer cells relies upon proteasome-dependent monoubiquitination of histone H2B. **Cancer research**, v. 71, n. 17, p. 5739-5753, 2011.

REICH, S. B.; WEINSHELBAUM, A.; YEE, J. Correlation of radiographic measurements and pulmonary function tests in chronic obstructive pulmonary disease. **American journal of roentgenology**, v. 144, n. 4, p. 695-699, 1985.

ROBB, E. L.; STUART, J. A. Resveratrol interacts with estrogen receptor- β to inhibit cell replicative growth and enhance stress resistance by upregulating mitochondrial superoxide dismutase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 7, p. 821-831, 2011.

ROBBESOM, A. A.; KOENDERS, M. M. J. F.; SMITS, N. C.; HAFMANS, T.; VERSTEEG, E. M. M.; BULTEN, J.; VEERKAMP, J. H.; DEKHUIJZEN, P. N. R.; KUPPEVELT, T. H. V. Aberrant fibrillin-1 expression in early emphysematous human lung: a proposed predisposition for emphysema. **Modern Pathology**, v. 21, n. 3, p. 297-307, 2007.

RUFINO, R.; SILVA, J. R. L. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n.3, p. 241-248, 2006.

RUFINO, R.; COSTA, C. H.; SOUZA, H. S.; MADI, K.; SILVA, J. R. Perfil celular do escarro induzido e sangue periférico na doença pulmonar obstrutiva crônica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 5, p. 510-518, 2007.

SHIH, C.; HAO, W.; CHONG, Y.; PO, T.; PETER, C.; SHI, C.; PAN, Y. Prevention of elastase-induced emphysema in placenta growth factor knock-out mice. **Respiratory Research**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2009.

SILVA, S. R.; MATOS, L. P.; DE SOUSA, F. C.; DE SOUSA, C. M. V.; BARBOSA, K. P.; CASTRO, J. N.; CAMPELLO, C. C. **Evidenciação de componentes teciduais de rim murino através de diferentes protocolos de coloração**. 2004. f 14. Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Ceará.

SNIDER, G. L. The definition of emphysema: report of a National Heart, Lung and Blood Institute. Division of Lung Diseases. Workshop. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 132, p. 182-185, 1985.

SNIDER, G. L.; LUCEY E. C.; STONE P J. Animal models of emphysema. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 133, p. 149-69, 1986.

SU, B.; TSENG, Y.; SHIEH, G.; CHEN, Y.; SHIANG, Y.; WU, P.; LI, K.; YEN, T.; SHIAU, A.; WU, C. Prothymosin α overexpression contributes to the development of pulmonary emphysema. **Nature communications**, v. 4, p. 1906, 2013.

TANAKA, K.; ISHIHARA, T.; SUGIZAKI, T.; KOBAYASHI, D.; YAMASHITA, Y.; TAHARA, K.; YAMAKAWA, N.; IJIMA, K.; MOGUSHI, K.; TANAKA, H. Mepenzolate bromide displays beneficial effects in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease. **Nature communications**, v. 4, p. 1-24, 2013.

TARASEVICIENE-STEWART, L.; SCERBAVICIUS, R.; CHOE, K.; MOORE, M.; SULLIVAN, A.; NICOLLS, M. R.; FONTENOT, A. P.; TUDER, R. M.; VOELKEL, N. F. An animal model of autoimmune emphysema. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 171, n. 7, p. 734-742, 2005.

TARANTINO, A. B. **Doenças pulmonares**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

TAKARO, T.; WHITE S. M. Emphysema. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 108, p. 334-7, 1973.

VALENÇA, S. S.; HORA, K.; CASTRO, P.; MORAES, V. G.; CARVALHO, L.; SOBRINO, L. C. V. D. M. Emphysema and Metalloelastase Expression in Mouse Lung Induced by Cigarette Smoke. **Toxicologic Pathology**, v.32, p. 351-356, 2004.

VALENÇA, S. S.; PORTO, L. C. Estudo imunohistoquímico do remodelamento pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.34, n.10, p. 787-795, 2008.

VIGO, F. M.; BARP, J.; MONTEIRO, S. D. C.; MATTÉ, C.; FERNANDES, T. R. G.; WYSE, A. T. D. S. **Papel do estrogênio no estresse oxidativo cardíaco em ratas com hiperhomocisteinemia**. 2003. 15 f. Salão de Iniciação Científica - UFRGS. Livro de resumos. Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

WAGNER, J. G; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 349-374, 2000.

WANG, QI.; YANG, H.; LIU, H.; MI, S.; ZHANG, X.; YAN, H.; MA, Y.; WANG, X.; HU, Z. Interleukin-17A is involved in development of spontaneous pulmonary emphysema caused by Toll-like receptor 4 mutation. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 32, n. 8, p. 1045-1054, 2011.

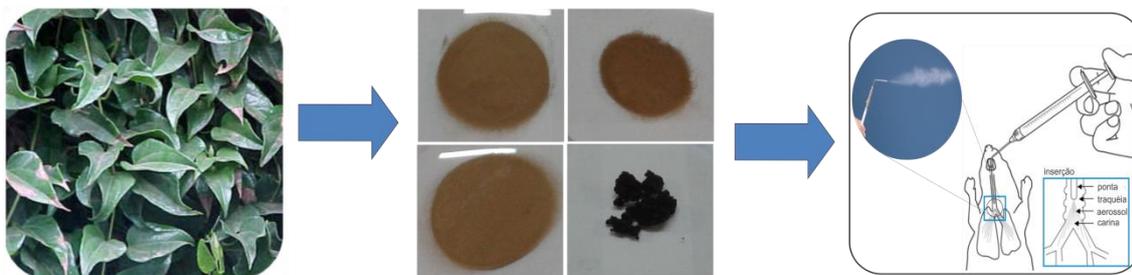
WRIGHT, J. L. The importance of ultramicroscopic emphysema in cigarette smoke-induced lung disease. **Lung**, v. 179, n. 2, p. 71-81, 2001.

WRIGHT, J. L.; CHURG, A. Cigarette Smoke Causes Physiologic and Morphologic Changes of Emphysema in the Guinea Pig 1-3. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 142, p. 1422-1428, 1990.

WRIGHT, J. L.; CHURG, A. Animal models of cigarette smoke-induced COPD. **CHEST Journal**, v. 122, n. 6, p. 301-306, 2002.

CAPÍTULO II: *Mikania glomerata* Spreng.: Desenvolvimento de uma formulação para entrega pulmonar

Artigo submetido à revista Journal of Pharmaceutical Sciences



Mikania glomerata Spreng.: Desenvolvimento de uma formulação para entrega pulmonar

DANTAS, R.L.¹; CAMPELO, N.B.²; LEAL, L.H.C.²; OLIVEIRA, G.L.S.¹; REIS, E. V. S.³; ALVES W. S.⁴; MEDEIROS, M.G.F.¹; NUNES, L.C.C.¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

²Curso de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, Brasil.

⁴Programa de Pós-Graduação em Ciência da Reabilitação da Universidade Nove de Julho, São Paulo, Brasil.

RESUMO

A *Mikania glomerata* Sprengel, popularmente conhecida como guaco, atua eficazmente como broncodilatadora, expectorante e supressora da tosse. Com o objetivo de obter extratos secos com as características proporcionadas pela secagem por aspersão, que são necessárias para a entrega pulmonar, e com a estabilidade de constituintes encontradas na secagem por liofilização, foi realizado um planejamento fatorial para avaliar, quantitativamente, a influência da temperatura de entrada e da percentagem de Aerosil[®]200 sobre as respostas de interesse, bem como as possíveis interações entre os fatores. Além disso, foi utilizado com marcador a cumarina, em análise feita em um espectrofotômetro UV, e a atividade antioxidante, avaliada pelo método baseado na eliminação do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•). Também foi realizada a análise microbiológica dos produtos acabados. Os resultados evidenciaram uma perda de atividade antioxidante quando a secagem foi realizada com temperatura de entrada de 170°C e a preservação das características físicas, a longo prazo, nos extratos secos com 30% de Aerosil[®]200. Diante disso, podemos concluir que o melhor método de secagem por aspersão utiliza 30% de Aerosil[®]200 e uma temperatura de entrada de 140°C. Foi observado, também, que a preservação do teor de cumarina no extrato seco por aspersão, mesmo com a utilização de temperaturas de saída de 106°C, se deve, provavelmente, a microencapsulação promovida pelo Aerosil[®]200. Pôde-se constatar, ainda, que a cumarina, isoladamente, não deve estar associada a atividade

antioxidante. Dessa forma, outros compostos mais termolábeis que ela devem ser os responsáveis por tal atividade. Por fim, as secagens por aspersão e liofilização mantiveram, estatisticamente, a mesma população microbiológica e, uma vez que o tamanho de partícula, 1-5 μm , a fluidez, a estabilidade e a atividade do extrato seco foram conseguidos, a formulação seca com 30% de Aerosil[®]200 e temperatura de entrada de 140°C poderá ser uma candidata para estudos que a utilizem por via pulmonar.

PALAVRAS-CHAVE: Asteraceae; Antioxidantes; Guaco; Liofilização; Parâmetros de secagem.

Abstract: *Mikania glomerata* Spreng.: Development of a formulation for pulmonary delivery

The *Mikania glomerata* Sprengel, popularly known as guaco, effectively acts as a bronchodilator, expectorant and cough suppressant. In order to obtain powders with the features offered by spray drying, which are necessary for pulmonary delivery, and the stability of constituents found in the freeze-drying a factorial experimental design was conducted to assess quantitatively the influence of temperature input and the percentage of Aerosil[®]200 on the responses of interest, as well as possible interactions between factors. Furthermore, it was used with marker coumarin, in analysis in a UV spectrophotometer, and antioxidant activity, assessed by eliminating method based on the stable free radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH •). Microbiological analysis of finished products was also performed. The results showed a loss of antioxidant activity when drying was performed with inlet temperature of 170°C and the preservation of the physical characteristics, long-term, in dry extracts with 30% Aerosil[®]200. Therefore, we conclude that the best method of spray drying uses 30% of Aerosil[®]200 and an inlet temperature of 140°C. It was also observed that the microencapsulation promoted by Aerosil[®]200 preserves the content of coumarin in the spray dried extract, even with the use of the outlet temperature of 106°C. We could as well observe that coumarin alone should not be associated with antioxidant activity. Thus, other more labile compounds that it should be responsible for such activity. Finally, the spray drying and freeze drying remained statistically similar microbiological population, and, since the particle size, 1-5 μm , the fluidity, stability and activity of the dry extract were obtained, the dry formulation with 30% of

Aerosil®200 and inlet temperature of 140°C may be a candidate for use in studies for pulmonary delivery.

KEYWORDS: Asteraceae; Antioxidants; Guaco; Freeze-dryer; Parameters of drying.

1 INTRODUÇÃO

A *Mikania glomerata* Sprengel, popularmente conhecida como guaco, é uma planta da família Asteraceae que atua eficazmente na broncodilatação, expectoração e supressão da tosse. Esta planta faz parte da "Lista de Fitoterápicos com Registro Simplificado" da ANVISA e é um dos 12 fitoterápicos de interesse do SUS. O xarope de guaco, produzido com o extrato fluido alcoólico, e a cápsula, produzida a partir do extrato seco, são as formas farmacêuticas utilizadas na terapêutica de doenças das vias aéreas superiores, incluindo bronquite, pleurite, tosse, asma, gripes e resfriados (RADÜNZ et al., 2012).

Embora disponível em duas formas farmacêuticas, o extrato seco é a apresentação farmacêutica mais comercializada (ROCHA et al., 2008), uma vez que apresenta uma série de vantagens em relação ao extrato alcoólico, as quais podemos destacar: maior estabilidade química, físico-químicas e microbiológicas, mais fácil padronização, maior concentração de compostos ativos e uma maior capacidade de transformação em diferentes tipos de formas farmacêuticas sólidas (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Uma das melhores formas de se obter o extrato seco é através da secagem a frio ou por aspersão. Na secagem por aspersão é realizado a pulverização do fluido dentro de uma câmara de secagem. Nessa câmara, uma corrente de ar quente gera a evaporação do solvente em frações de segundos. Essa velocidade de evaporação é, em grande parte, decorrente da grande área superficial gerada pela atomização do líquido. Como vantagens desse processo, temos o fato de que o tamanho de partícula, a distribuição de tamanho, a densidade e o teor de umidade podem ser controlados somente por modificações nos parâmetros de secagem. Essa versatilidade é primordial, por exemplo, quando se objetiva a entrega pulmonar. Além disso, esse processo fornece pós com a fluidez necessária para a utilização dessa via de administração (CARVALHO; MARTINS, 2004; DOAN; COUET; OLIVIER, 2011; SILVA et al., 2012). Cabe salientar que, além da secagem por aspersão, é possível produzir pós, com todas as

características necessárias para a entrega pulmonar, por secagem a frio (OH et al., 2011; YOO et al., 2011).

A secagem a frio, também conhecida como liofilização, é amplamente utilizada, uma vez que permite a secagem e mantém a estabilidade de compostos termicamente instáveis (por exemplo, medicamentos a base de proteínas) (TANG; PIKAL, 2004). Como esse método de secagem mantém a estabilidade dos constituintes químicos, é por vezes utilizado como método de referência para comparar as experiências de secagem (RATTI, 2001; STRÅLSJÖ et al., 2003).

Porém, é inviável se comparar todos os constituintes químicos de um extrato vegetal. Dessa forma, o mais adequado é a utilização de marcadores. Neste estudo, que objetivou a obtenção de extratos secos com as características físicas proporcionadas pela secagem por aspersão e a estabilidade de constituintes encontradas na secagem por liofilização, foi utilizada a cumarina (2H-1-benzopirran-2-ona) como marcador (LEITE et al., 1993).

A cumarina é um dos constituintes majoritários da *M. glomerata* e contribui, significativamente, para o efeito farmacológico dessa planta. Ela também é responsável por cerca de 50 a 60% da atividade broncodilatadora, que ocorre através do relaxamento do músculo liso pulmonar (CELEGHINI; VILEGAS; LANÇAS, 2001; WANG; LIU, 2009; SOARES et al., 2012).

Além da cumarina, a atividade antioxidante dos extratos secos também foi utilizada como marcador, alguns extratos vegetais reduzem inflamações por eliminar superóxidos conhecidos por participarem do recrutamento de células polimorfonucleares presentes em tecidos inflamados, ou seja, existe uma correlação entre as atividades antioxidante e anti-inflamatória (THAMBI et al., 2006).

Selecionada a forma de secagem, é preciso escolher o melhor adjuvante, uma vez que é uma variável particularmente importante na secagem por aspersão de extratos vegetais. Nesse método de secagem, o adjuvante pode determinar a estabilidade e a qualidade do extrato, além de afetar as características de biodisponibilidade (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). Entretanto, do ponto de vista farmacotécnico, quando se trata da secagem do extrato da *M. glomerata* por aspersão, a escolha do Aerosil®200 (dióxido de silício coloidal) já se encontra bem fundamentada. Isso ocorre, em grande parte, devido à elevada superfície específica e ao alto poder adsorvente desse adjuvante (SILVA et al., 2012; SOARES et al., 2012). Além disso, não foi encontrado

efeito patogênico do Aerosil[®]200 no pulmão, por se tratar de uma sílica amorfa, a qual pode ser degradada pelos macrófagos (KAWASHIMA et al., 1998).

Além das análises químicas e físicas, que são relevantes para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica, também é preciso se investigar a existência de contaminação microbiológica dos produtos acabados. Isso é ainda mais relevante quando se trabalha com matérias-primas de origem biológica, como os extratos de plantas. Porém, é impossível monitorar de forma eficiente a contaminação por todos os micro-organismos. Dessa forma, é utilizado o estudo de micro-organismos indicadores, que são grupos ou espécies que quando presentes fornecem informações sobre a ocorrência de contaminação, as quais são úteis no controle da qualidade (BATTAGLINI, 2010).

Diante do exposto e levando em consideração que na secagem por aspersão, para desenvolver um extrato vegetal seco para a entrega pulmonar, precisa-se, normalmente, trabalhar com temperaturas entre 100°C a 200°C, o presente estudo objetivou realizar uma otimização da secagem dos extratos obtidos a partir da *Mikania glomerata* Sprengel. Para tanto, foi realizado um planejamento fatorial, o qual consiste de uma técnica extremamente econômica que pode ser utilizada para avaliar, qualiquantitativamente, a influência de vários fatores simultâneos sobre a resposta de interesse, bem como as possíveis interações entre esses fatores (BARROS, 2003). Neste estudo, também verificou-se a influência do aumento da temperatura e da proporção de Aerosil[®]200 sob a umidade residual, no rendimento líquido, no aspecto físico, no teor de cumarina e na atividade antioxidante dos extratos secos. Além disso, realizou-se a análise microbiológica dos extratos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Extrato vegetal

O extrato vegetal, obtido da Schraiber (São Paulo, Brasil), foi produzido a partir da *M. glomerata* oriunda da região sul do Brasil. Esse extrato apresentava as seguintes propriedades: líquido límpido e homogêneo, cor castanho escuro, pH de 5,97, teor alcoólico de 36%, densidade de 0,903 g/ml (conforme descrito na farmacopeia 5ª edição), resíduo seco de 2,7% (mensurado por sistema de secagem por infravermelho) e índice de refração de 1,350 nD. Além disso, na análise microbiológica foi encontrado

uma quantidade de bactérias heterotróficas de 3×10^2 UFC/ml ($35^\circ\text{C}/48\text{h}$) e de fungos e leveduras de $< 10^2$ UFC/ml.

2.2 Secagem do extrato por aspersão e liofilização e análise da influência dos fatores

O cálculo da quantidade de Aerosil[®]200 a ser adicionado foi feito a partir do resíduo seco do extrato, conforme equação 1.

$$\frac{RS (\%) \times VS (mL) \times PA (\%)}{PA (\%) - 100\%}, \quad \text{Eq. (1)}$$

onde: RS = resíduo seco, VS = volume secado, PA = percentagem de Aerosil[®]200

Todas as secagens foram realizadas em duplicata. A secagem por aspersão foi realizada em Mini *Spray Dryer* (BÜCHI B-290). Os parâmetros de secagem foram mantidos constantes durante todo o processo de secagem. Foram realizadas seis secagens organizadas em três planejamentos fatoriais 2^2 : aumento de temperatura de 120 a 140°C , de 140 a 170°C e de 120 a 170°C , com 15 e 30% de Aerosil[®]200. A junção dos três planejamentos pode ser visto na tabela 1. Nesses planejamentos, é possível avaliar, quantitativamente, a influência das três temperaturas (120°C , 140°C e 170°C) e das duas percentagens de Aerosil[®]200 (15 e 30%) sobre as respostas de interesse, bem como as possíveis interações desses dois fatores. A análise dos dados desse planejamento foi realizada conforme descrito anteriormente (BARROS, 2003). Durante a secagem, as soluções extrativas adicionadas dos adjuvantes tecnológicos foram mantidas sob agitação durante todo processo de secagem. Para os seis extratos foi utilizada uma velocidade de fluxo de $7,0$ mL/min. e pressão de 600 mmHg. Na secagem a frio, o solvente etanólico do extrato foi evaporado, a 45°C e sob pressão reduzida, em seguida a água foi retirada por liofilização, conforme descrito anteriormente (SANTOS et al., 2012).

Tabela 1: Planejamento fatorial dos experimentos realizados.

Planejamento	Temperatura de admissão	Percentagem de Aerosil [®] 200
1°	120 °C	15%
	140 °C	30%
2°	140 °C	15%
	170 °C	30%
3°	120 °C	15%
	170 °C	30%

Fonte: Acervo pessoal.

2.3 Rendimento

O rendimento bruto obtido após o processo de secagem dos extratos foi calculado em relação à massa teórica de sólidos totais presente nas soluções extrativas. Os sólidos totais correspondem ao teor de resíduo seco da solução extrativa, que é o resíduo seco (%) vezes o volume secado (ml), somada ao peso do adjuvante adicionado (resultado da equação 1).

2.4 Análise do tamanho de partícula

Para a análise do tamanho de partícula, foram contabilizadas 500 partículas, em triplicata, na objetiva de 40X e com a utilização de uma lente óptica especial que permitia a quantificação do tamanho de partícula. A contagem foi realizada em um microscópio óptico Olympus BX41 (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

2.5 Teor de umidade

A determinação da umidade residual presente em todos os extratos secos foi realizada logo após a secagem, seguindo metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira 5ª edição. Os resultados foram expressos em perda percentual de umidade em massa através da média de três determinações.

2.6 Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro*

Para avaliar a ação antioxidante foi utilizado o método baseado na eliminação do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•). A molécula de DPPH•, ilustração 1, é bastante conhecida por caracteriza-se como um radical orgânico livre estável que tem muitas vantagens, tais como uma boa estabilidade na ausência da luz, aplicabilidade, simplicidade e viabilidade (SCHERER; GODOY, 2009; DENG; CHENG; YANG, 2011). O método DPPH é utilizado em mais de 90% dos estudos de avaliação antioxidante de substâncias puras, misturas ou matrizes complexas (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

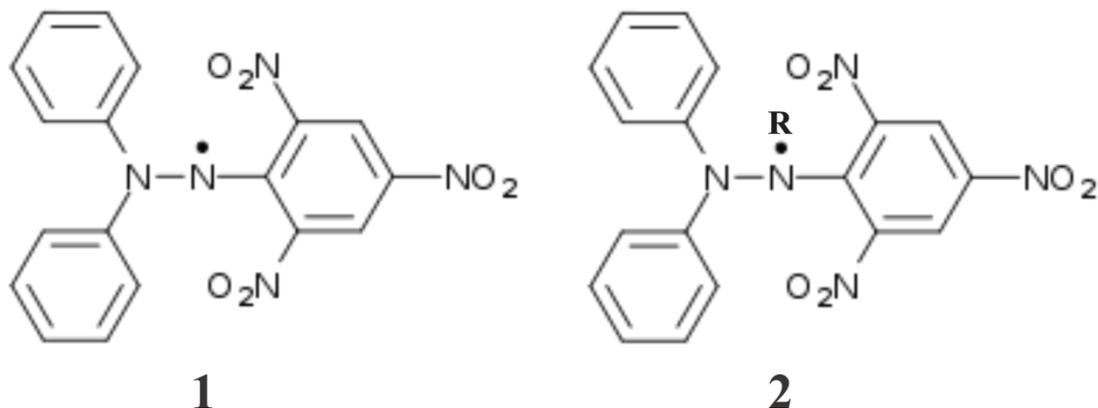


Ilustração 1: Forma radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH. Acervo pessoal.

2.7 Análise do teor de cumarina por espectrofotômetro-UV

A análise do teor de cumarina foi realizada em um Espectrofotômetro UV (Micronal AJX-3000PC) em 275 nm. A curva de calibração foi preparada usando como padrão a cumarina padrão 2H-1-benzopiran-2-ona (Sigma - Aldrich, São Paulo, Brasil). Como solvente, foi utilizado metanol/água na proporção de 80:20. Para a determinação da curva de calibração, foram preparadas sete diluições a partir da solução inicial de 480 µg/mL. Assim, a curva de calibração foi determinada, em triplicata, utilizando soluções com concentrações de 4,80 µg/mL, 5,76 µg/mL, 6,72 µg/mL, 7,68 µg/mL, 8,64 µg/mL, 9,60 µg/mL e 10,56 µg/mL. A equação de linha foi: $Y = 0,089x + 0,5601$ e $R^2 = 0,9966$.

Para determinar o nível de cumarina dos extratos secos, inicialmente, uma solução inicial de 480 µg/ml foi preparada por diluição de 24 mg do extrato seco, em 50 mL de uma solução de metanol/água (4:1). Em seguida, uma segunda diluição foi efetuada, retirando-se uma alíquota de 8 mL da solução-inicial em 25 mL de uma solução de metanol/água (4:1), obtendo-se uma concentração teórica final de 153,6 mg/mL.

O valor inicial da cumarina (antes do processamento) foi determinado através da análise da absorvância de uma alíquota de 0,8 mL do extrato fluido de guaco que foi diluído em 100 ml de uma solução metanol/água (4:1) e lido no espectrofotômetro a 275 nm. O valor obtido foi utilizado na equação de linha revelando o nível de cumarina presente no extrato fluido. Esta metodologia foi realizada conforme descrito anteriormente (CARVALHO; MARTINS, 2004; SOARES et al., 2012).

4.2 Análise microbiológica

2.8.1 Preparação das amostras e diluições seriadas

Na pesquisa por microrganismos mesófilos em superfície, bolores e leveduras e *Escherichia coli*, foram realizadas três diluições com solução salina 0,85% (NaCl). Na pesquisa por *Salmonella spp* foi realizado o mesmo número de diluições, no entanto, utilizando como solvente a água peptonada (APT) 0,1% na proporção de 1:10 (pré-enriquecimento) (SILVA, 1997; BRASIL, 2010).

2.8.2 Contagem total de microrganismos mesófilos em superfície

A contagem total de microrganismos mesófilos em superfície foi realizada em meio de cultura ágar padrão para contagem (PCA) através da inoculação de 0,1 ml da amostra. Após o espalhamento com alça de drigalski, foi realizada a incubação em estufa a 35-36°C/48h (SILVA, 1997).

2.8.3 Pesquisa de *Escherichia coli*

A pesquisa por *Escherichia coli* foi realizada através de diluições seriadas com inoculação de 1 mL da amostra em 3 séries de 3 tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), incubados em estufa a 35-36°C/24-48h (SILVA, 1997).

2.8.4 Contagem de bolores e leveduras

A contagem de bolores e leveduras foi realizada em meio de cultura ágar sabouraud-dextrose inoculando 0,1 ml da amostra. Após espalhamento com Alça de Drigalski, foi realizada a incubação em estufa a 24-25°C/ 7dias (BRASIL, 2010).

2.8.5 Pesquisa de *Salmonella spp*

Na determinação da presença de *Salmonella spp*, inicialmente o extrato foi diluído em água peptonada 0,1% e incubado a 35-36°C/24h em estufa para o pré-enriquecimento. Em seguida uma alíquota de 0,1 mL foi retirada da APT e inoculadas em Caldo Rappaport, para seleção dos microrganismos, e incubadas em banho-maria a 42°C/24h (RODRIGUES, 2003). Então, uma alçada foi retirada do Caldo Rappaport e estriadas em placas contendo meios diferenciais, ágar enteric hecktoen (HE) e ágar salmonella-shigela (SS), sendo em seguida incubados em estufa a 35-36°C/24h (PAIVA, 2006). Por fim, com uma agulha de inoculação, removeu-se a porção central

da colônia desejada e inoculou-se em tubos com meios de provas bioquímicas, ágar três açúcares ferro (TSI) e ágar lisina ferro (LIA), que foram incubados a 35-36°C/24h em estufa. A identificação de *Salmonella spp* foi feita com base nas características das colônias nos meios TSI e LIA.

4.3 Planejamento fatorial e análise estatística

Foi utilizado o planejamento fatorial 2², conforme descrito anteriormente (BARROS, 2003). Para a análise estatística da média ± E.P.M. foi utilizado o GraphPad Prism 5, que também foi utilizado para realizar a análise estatística da eliminação do radical DPPH·, nesse caso, foi realizado pelo método ANOVA seguida de Newman-Keuls, sendo utilizado p<0,0001.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Rendimento líquido dos processos de secagem

Devido à aderência do extrato seco nos compartimentos do *Spray Dryer*, houve uma perda de massa no produto seco obtido a partir do processo de secagem por aspersão em comparação com o processo de liofilização, por conseguinte, o rendimento líquido médio do processo de secagem por atomização foi de 80%. Tendo por base outros estudos de otimização do processo de secagem, esse valor apresentou-se dentro do esperado. Caso o rendimento fosse inferior a 80%, poderia ser realizado uma diminuição da alimentação, velocidades de alimentação excessivas conduzem à diminuição da temperatura de saída e ao acúmulo do material sobre as paredes da câmara (ROCHA, LUCIO et al., 2008; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Na ilustração 2, é apresentado a influencia dos fatores sobre o rendimento das secagens por aspersão. Ao analisarmos os dados do rendimento líquido das secagens por aspersão, ilustração 2, pode-se observar que houve influência apenas da concentração de Aerosil[®]200, ou seja, o aumento da percentagem de 15 para 30%, em qualquer uma das temperaturas analisadas (120°C, 140°C e 170°C), propiciou, estatisticamente, o aumento no rendimento.

Esse comportamento, onde os melhores rendimentos foram obtidos nas concentrações mais altas de Aerosil[®]200, também foi observado utilizando a metodologia da superfície de resposta.

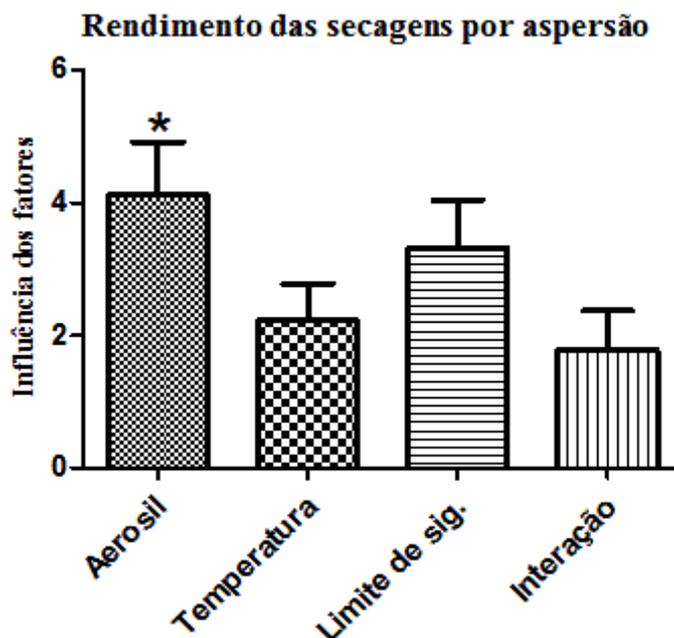


Ilustração 2: Rendimento das secagens por aspersão. Os valores representam a média \pm E.P.M. dos resultados obtidos, em duplicata ($n=4$), dos planejamentos fatoriais 2^2 . * superior ao limite de significância.

Entretanto, se houvesse um aumento ainda maior na percentagem de Aerosil[®]200, provavelmente, ocorreria um aumento na quantidade de sólidos, o que provocaria um aumento da viscosidade do meio, dificultando assim a aspersão da solução extrativa. Isso, além de influenciar o rendimento, diminuiria a concentração de ativos vegetais (VASCONCELOS, MEDEIROS et al., 2005).

3.6 Tamanho de partícula

Com relação ao tamanho de partícula, foi verificado que todos os extratos secos por aspersão apresentaram um tamanho variando de 1 a 2 μm . Partículas com tamanho entre 1-5 μm possuem uma maior probabilidade de se atingir a porção inferior do sistema respiratório. Então, se o objetivo terapêutico for as porções superiores deste sistema, um aumento do tamanho das partículas deverá ser realizado (HASSAN; LAU, 2011).

Esse aumento poderá ser feito através de modificações na viscosidade, no conteúdo de sólidos, na tensão superficial do produto fluido a secar e no fluxo de alimentação (SANTOS; SHARAPIN, 2000). O aumento no conteúdo de sólidos eleva a viscosidade, resultando em pós com maior densidade. Além disso, quanto menor o

conteúdo de sólidos em uma suspensão, maior o espaço vazio no interior da partícula (*ballooning*) e menor a espessura das paredes (CAO et al., 2000). A tensão superficial do material a ser seco também exerce influencia proporcional sobre a energia gasta para formar as gotículas. Nesse caso, a adição de tensoativos é utilizada com a finalidade de reduzir a tensão superficial, propiciando a formação de gotículas menores e ao aumento na velocidade de aspersão (DE CAMPOS, 1996; SOARES, 2002). O aumento na temperatura do material de entrada, normalmente, pode reduzir a tensão superficial e a viscosidade das amostras, o que também influencia o tamanho de partícula (SOARES, 2002). Além disso, a distribuição e o tamanho de partícula estão relacionados ao tamanho das gotículas formadas pelo processo de aspersão. Portanto, a escolha do tipo do aspersor é extremamente relevante (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

No entanto, é importante levar em consideração que o aumento no tamanho das partículas, embora não alterem as forças de adesão entre as superfícies dos carreadores, estão relacionados com a diminuição da aerolização (OOI et al., 2011). Além disso, foi observado que o desempenho da aerolização é governado por colisões entre as partículas carreadoras, quando transportadores homogêneos são utilizados, permanecendo constante em relação à concentração da droga (YOUNG et al., 2011). Logo, pode-se inferir que uma forma de aumentar o tamanho das partículas e manter seu desempenho é aumentar o fluxo de aerolização (OOI et al., 2011).

Caso se objetive a entrega de partículas grandes na porção inferior do sistema respiratório, uma diminuição da densidade da partícula deverá ser realizada pela adição de agentes porogênicos. Uma das primeiras pesquisas com partículas porosas foi realizada em 1997. Nessa pesquisa, grandes partículas porosas com densidades de massa $<0,4 \text{ g/cm}^3$ e diâmetro médio $>5 \text{ }\mu\text{m}$ forneceram deposição pulmonar profunda da droga inalada. A utilização dessas partículas grandes se mostra interessante, principalmente, se a permanência prolongada da partícula for o desejável. Isso ocorre porque partículas grandes ajudam a contornar os mecanismos de limpeza nos pulmões. Para uma deposição profunda, deverá ser mantida uma densidade $<1.0 \text{ g/cm}^3$. Para tanto, poderá ser utilizado, por exemplo, o bicarbonato de amônio (EDWARDS et al., 1997; GUPTA; AHSAN, 2011; OGAIN et al., 2011; OH et al., 2011; YOO et al., 2011).

3.7 Teor de umidade

Outro parâmetro que foi analisado por meio do planejamento fatorial foi o teor de umidade. O teor de umidade variou de 5 a 10%, no extrato seco a 120°C e com 15%

de Aerosil®200 e no extrato seco a 170°C e com 30% de Aerosil®200, respectivamente, ou seja, os fatores temperatura de secagem e percentagem de Aerosil®200 são inversamente proporcionais. Assim, quanto maior a percentagem de adjuvante e da temperatura de entrada, menor foi o teor de umidade encontrado. A influência dos parâmetros avaliados, sobre o teor de umidade, podem ser vistos na ilustração 3.

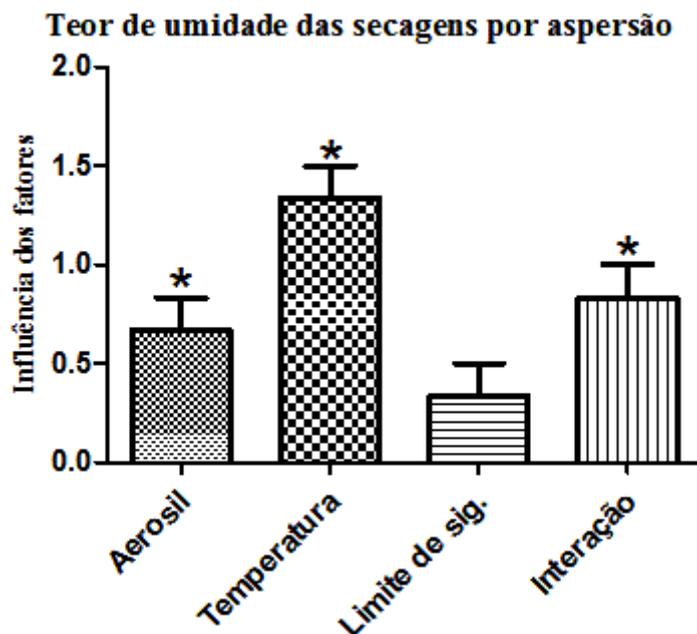


Ilustração 3: Teor de umidade das secagens por aspersão. Os valores representam a média ± E.P.M. dos resultados obtidos, em duplicata (n=4), dos planejamentos fatoriais 2². * superior ao limite de significância.

Na ilustração 3, é possível observar que, logo após a secagem do extrato, o fator com maior influencia sobre o teor de umidade foi a temperatura. Entretanto, transcorridos 6 meses da secagem por aspersão, independente da temperatura de secagem, todos os extratos secos que continham 15% de Aerosil®200 apresentavam-se na forma semi-sólida e com coloração enegrecida, fato que não foi observado nos extratos secos com 30% de Aerosil®200. Esses últimos extratos, permaneceram com as mesmas características físicas observadas logo após a secagem, ilustração 4.

Na ilustração 4 também é possível observar outra mudança quanto ao aspecto físico visual. Nos extratos secos com 30% de adjuvante é possível observar que o extrato seco se torna mais claro a medida que aumenta a temperatura de secagem. O aspecto de um pó bege claro, homogêneo e seco, é observado no extrato seco a 170°C e

30% de adjuvante. Essa característica é considerada de boa aparência para o desenvolvimento de cápsulas (SOARES et al., 2012).

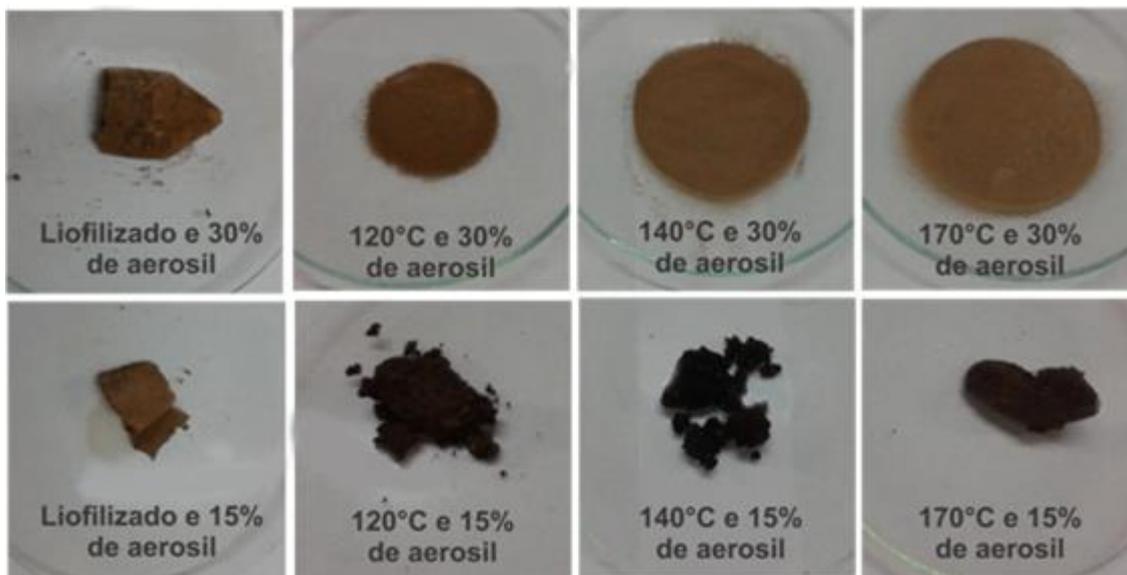


Ilustração 4: Análise macroscópica dos extratos após seis meses da secagem.

Esses resultados corroboram com outra pesquisa onde a análise descritiva dos dados de umidade residual dos extratos secos de *Schinus terebinthifolius* Raddi mostrou que o nível que produz os menores valores para teor de umidade é o de 30% de concentração de Aerosil[®]200, independente da temperatura. Além disso, a análise de superfície de resposta ajustada aos dados de umidade residual dos extratos secos mostra que, à medida que o parâmetro de temperatura é aumentado em associação ao aumento do percentual de adjuvante, a umidade residual diminui e ocorre uma maior estabilidade aos efeitos da higroscopicidade (VASCONCELOS et al., 2005). Essa estabilidade pode ser atribuída a uma possível microencapsulação das partículas do extrato seco pelo Aerosil[®]200 (CORNEC, 1990).

A influência da concentração de Aerosil[®]200 também foi analisada na secagem de soluções extrativas da *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reissek. Nessa secagem, o aumento da adição do adjuvante, de 10 para 20%, causou uma redução significativa da higroscopicidade dos produtos secos (OLIVEIRA, 2010; WANG; WANG, 2000). A escolha pelo emprego de Aerosil[®]200 na concentração de 30% também foi observada em outras pesquisas (SILVA, 2007; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Entretanto, uma vez que a umidade residual para os medicamentos fitoterápicos sólidos deve permanecer entre 8% e 14%, apenas os extratos secos a 120 e 140°C estariam dentro do determinado (MICHELIN et al., 2010). Uma forma de se adequar o teor de umidade do extrato seco a 170°C seria aumentando o fluxo de alimentação. Esse aumento de fluxo causaria a diminuição da temperatura de saída, a qual é a responsável pelo teor de umidade final do extrato seco (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). As temperaturas de saída podem ser visualizadas na tabela 2.

Tabela 2: Temperaturas de saída dos ensaios

Ensaio	Temperatura de admissão	Temperatura de saída
1	120 °C	74 °C
2	140 °C	89 °C
3	170 °C	106 °C

Fonte: Acervo pessoal.

Além do uso do adjuvante, que mostrou-se crucial para a estabilidade do extrato seco a longo prazo, poderia ser observada a influência da utilização de algum excipiente farmacotécnico. Em várias pesquisas, a utilização conjunta de adjuvantes e excipientes trouxe melhor preservação da droga transportada e melhora da fração de partícula fina (FPF), força de aderência e morfologia, uma vez que a incorporação diminuiu as forças coesivas e auxiliou no fluxo (DEVIRIM; CANEFE, 2011; LEBHARDT et al., 2011; OSMAN et al., 2011; POURSHAHAB et al., 2011; TAKAMI; MURAKAMI, 2011; YOUNG et al., 2011; TULI et al., 2012).

Entretanto, uma vez que existe o desafio técnico de entregar uma dosagem significativa de fitoterápico, sem que exceda o tamanho de partícula ou a densidade de entrega pulmonar, neste estudo, optou-se pela não utilização do excipiente. Essa mesma estratégia já havia sido utilizada anteriormente (DOAN et al., 2011; SON; MCCONVILLE, 2011). Porém, a ausência de excipiente pode, em alguns casos, não ser adequada em relação à eficiência e segurança no tratamento, uma vez que permite a liberação imediata (DOAN et al., 2011).

Nesse contexto, poderia ser utilizado um carreador que propiciasse uma entrega pulmonar com liberação sustentada. Uma opção para tal fim é a incorporação do polietilenoglicol (PEG), que gera compostos biodegradáveis e mucoadesivos, principalmente quando o PEG é associado a outros compostos, como a quitosana, que permite o entumescimento da partícula, o que aumenta a absorção do fármaco por evitar

a depuração pelos macrófagos. Outra opção é o copolímero–poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico)–PLGA (BEYERLE et al., 2011; DOAN et al., 2011; SELVAM et al., 2011; TAKAMI; MURAKAMI, 2011; E-SHERBINY; SMYTH, 2012).

3.5 Atividade antioxidante

Por meio do método baseado na eliminação do DPPH• foi possível observar que houve uma perda da atividade antioxidante quando o extrato foi seco a 170°C. Nessa temperatura, não foi observada nenhuma atividade antioxidante. Entretanto, ainda que a temperatura de entrada de 170°C possa ser consideravelmente elevada, os sólidos em cada partícula nunca são aquecidos acima da temperatura de saída. Dessa forma, foi a temperatura de saída de 106°C quem inviabilizou a atividade antioxidante. Como já foi discutido anteriormente, seção 3.4, uma forma de reduzir a temperatura de saída seria aumentar o fluxo de alimentação. Porém, uma vez que trabalhando com solventes com ponto de ebulição baixo, a secagem com temperatura de entrada de 170°C, torna-se desnecessária (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Na ilustração 5 são apresentados os dados da análise da eliminação do radical DPPH.

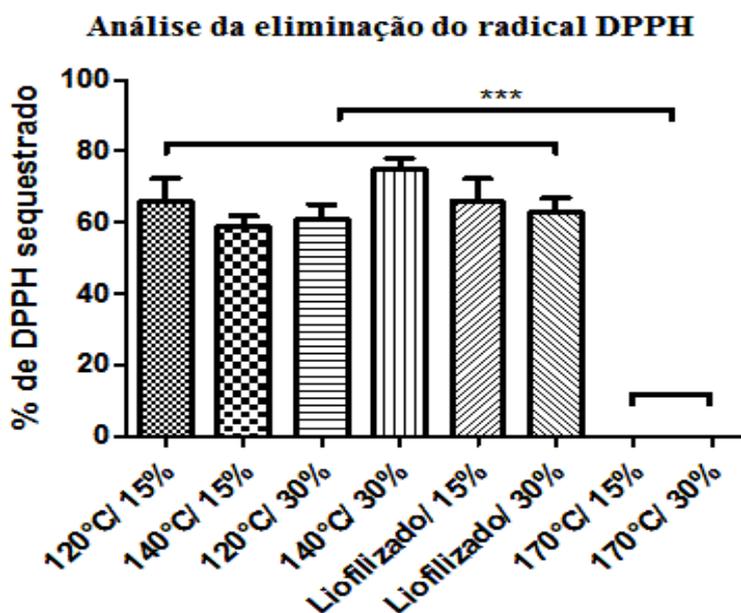


Ilustração 5: Análise da eliminação do radical DPPH. Os valores representam a média \pm E.P.M. dos resultados obtidos. *** estatisticamente significativos, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls, $p < 0,0001$.

Todas as outras temperaturas de secagem, o que também inclui a secagem por liofilização, apresentaram, estatisticamente, a mesma atividade antioxidante. Além disso, não foi observada diferença estatisticamente significativa com relação a percentagem de Aerosil[®]200 e a atividade antioxidante, ilustração 5. Esse resultado da atividade antioxidante acabou por direcionar a escolha pelo extrato seco a 140°C. Além disso, pela relevância que foi mostrada, pode vir a se tornar uma análise constante na otimização de secagens por aspersão.

3.6 Análise do teor de cumarina

As principais técnicas para a determinação de cumarinas na *M. glomerata* e seus derivados são a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia gasosa (GC) (CELEGHINI; VILEGAS; LANÇAS, 2001). No entanto, devido à natureza e à posição dos substituintes químicos, as cumarinas podem ser identificadas por espectrofotometria UV (AMARAL et al.; WAND; LIU, 2009). Essa técnica analítica, para identificação de cumarinas, tem algumas vantagens em comparação com a de HPLC-UV, tais como a redução dos custos de operação e tempo de análise, o fato de ser uma técnica simples e com um menor impacto ambiental, uma vez que o reagente utilizado no método de HPLC-UV, acetonitrilo, é teratogênico com um perfil tóxico por várias vias de absorção (SOARES et al., 2012).

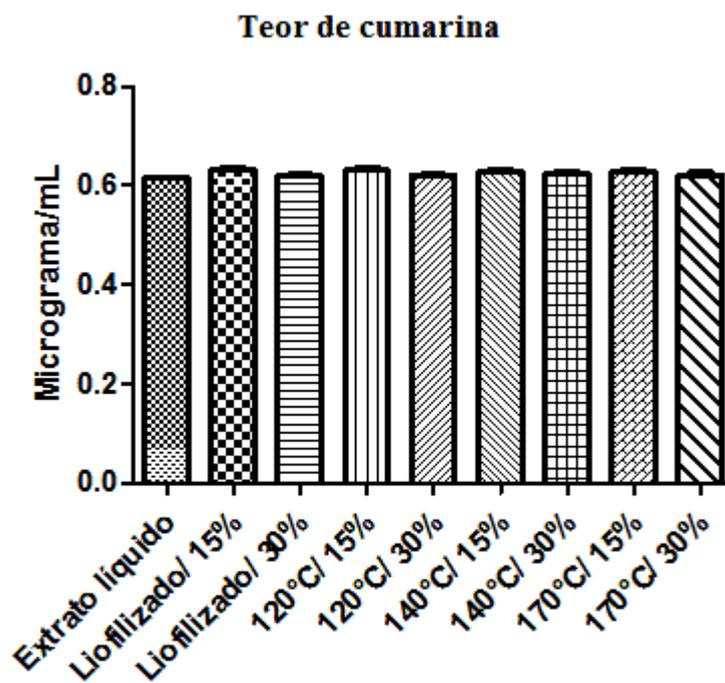


Ilustração 6: Análise do teor de cumarina. Os valores representam a média \pm E.P.M. dos resultados obtidos. ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls, $p < 0,005$.
TROCAR

Dessa forma, foi utilizada a análise do teor de cumarina por meio de um espectrofotômetro-UV. Nessa análise, foi possível observar que não ocorreu perda de cumarina ao elevar a temperatura da secagem por aspersão. Os valores encontrados na secagem por aspersão são semelhantes, estatisticamente, aos encontrados no extrato seco por liofilização, ilustração 6.

Na ilustração 6, é possível observarmos que, embora não tenha sido estatisticamente significativa, ocorreu uma discreta perda de cumarina ao aumentarmos a percentagem de Aerosil[®]200. Isso já era o esperado uma vez que a percentagem de extrato seco diminui ao se aumentar a percentagem do adjuvante de secagem.

Porém, a semelhança estatística do teor de cumarina nos extratos secos por aspersão e liofilização difere de outro estudo. Nesse, constatou-se que o extrato de guaco seco por liofilização apresentou um nível mais elevado de cumarina em comparação ao seco por atomização, onde foi utilizada a temperatura de entrada de 170°C e de saída de 80°C (SOARES et al., 2012). No entanto, esses pesquisadores utilizaram baixos teores de Aerosil[®]200, 8 e 10%. Dessa forma, uma vez que a propriedade de microencapsulação do Aerosil[®]200 há muito encontra-se fundamentada (CORNEC, 1990), a utilização de teores mais elevados de Aerosil[®]200, 15 e 30%, pode ter permitido a preservação da cumarina, mesmo com temperaturas de saída chegando a 106°C, temperatura essa superior a temperatura de degradação da cumarina, cerca de 69 a 73 °C (MERCK, 2006; SANTOS; SILVA, 2008; ARAÚJO; ECHEVERRIA; PASTORE, 2012).

Uma vez que a atividade antioxidante não foi preservada quando se utilizou temperaturas de entrada de 170°C, a cumarina, isoladamente, não deve estar associada a essa atividade. Além disso, outros compostos mais termolábeis que ela devem ser os responsáveis por essa atividade antioxidante.

3.7 Análise microbiológica

A contagem total da análise microbiológica, nos extratos secos por aspersão e liofilização, foi estatisticamente semelhante. No extrato seco por aspersão foi

encontrado $5,2 \times 10^2$ UFC/g de bactérias e $1,8 \times 10^2$ UFC/g de fungos. As pesquisas por *Escherichia coli* e *Salmonella sp* deram negativas. Embora muitos microrganismos, como a *Escherichia coli* (REMILI; BOUSSARD; DEVLEESCHOUWER, 1994), sejam sensíveis as temperaturas utilizadas na secagem por aspersão (SILVA et al., 2012), os fungos e as micotoxinas são, em sua maioria, termoestáveis mantendo-se ativos após tratamentos térmicos (BATTAGLINI, 2010).

Em 1994, uma pesquisa com 82 extratos de plantas secos por aspersão, de diferentes lotes e fabricantes, estabeleceu como parâmetro de avaliação o limite de 10^3 UFC/g para bactérias e de 10^2 UFC/g para os fungos. Dessa forma, os valores encontrados estão dentro dos limites aceitáveis (SILVA et al., 2012).

Tendo em vista que o crescimento microbiano é improvável nos extratos secos a 140 e 170°C, devido ao baixo teor de água, (BOSS, 2004), que a contagem total se mostrou estatisticamente semelhante na liofilização e na secagem por aspersão e que os valores encontrados no produto acabado foi semelhante ao do extrato bruto, seção 2.1, os cuidados para o desenvolvimento de uma formulação para a entrega por via aérea teriam que ser direcionados para a carga biológica da planta original. Logo, uma solução seria o tratamento físico ou químico do extrato líquido antes do processo de secagem, o que possibilitaria a diminuição da população microbiológica e tornaria mais segura à entrega do extrato seco por via aérea.

4 CONCLUSÃO

Tendo em vista a perda de atividade antioxidante que ocorreu na secagem com temperatura de entrada de 170°C, e a preservação das características físicas, a longo prazo, nos extratos secos com 30% de Aerosil[®]200, podemos concluir que o melhor método de secagem do extrato da *M. glomerata* é o que utiliza 30% de Aerosil[®]200 e temperatura de entrada de 140°C. Essa escolha da temperatura baseia-se, também, nas melhores características físicas do extrato seco a 140°C em relação ao seco a 120°C.

Além disso, podemos concluir que a semelhança estatística do teor de cumarina do extrato liofilizado em relação ao seco por aspersão, mesmo com a utilização de temperaturas de saída de 106°C, se deve, provavelmente, a microencapsulação promovida pelo Aerosil[®]200, uma vez que a cumarina deveria se degradar na faixa de temperatura entre 69 e 73 °C. Podemos concluir ainda que, como a atividade antioxidante não foi preservada quando se utilizou essa mesma temperatura de saída e a

percentagem mais alta de Aerosil[®]200, a atividade antioxidante não deve estar associada a cumarina. Dessa forma, outros compostos mais termolábeis que ela devem ser os responsáveis por essa atividade.

Como as formas de secagem, aspersão e liofilização, mantiveram, estatisticamente, a mesma população microbiológica, e a análise microbiológica do extrato bruto foi semelhante ao do produto acabado, uma atenção maior deverá ser dada ao extrato líquido. Por fim, podemos concluir que, uma vez que foi conseguida um tamanho de partícula entre 1-5 μm , fluidez, estabilidade e atividade do extrato seco, essa formulação poderá ser uma candidata para estudos que permitam sua utilização por via pulmonar.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, M. D. P. H. D.; VIEIRA, F. P.; LEITE, M. N.; AMARAL, L. H. D.; PINHEIRO, L. C.; FONSECA, B. G.; VAREJÃO, E. V. Coumarin content of guaco syrup stored at different temperatures. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 607-611, 2009.
- ARAÚJO, V. F.; ECHEVERRIA, R. M.; PASTORE JR, F. **Sistema de extração de sementes de Cumaru**. 2004. 12 f. In Projeto ITTO—Organização Internacional de Madeiras Tropicais—PD31/99 Rev.3. UnB. Instituto de Química (IQ), Laboratório de Tecnologia Química (LATEQ): Brasília, Brasil.
- BATTAGLINI, A. P. P. **Qualidade microbiológica do ambiente, alimentos e água, em restaurantes da Ilha do Mel/Pr**. 2010. Dissertação, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.
- BARROS, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. São Paulo: **Editora Unicamp**, p. 5 e 83, 2003.
- BEYERLE, A.; BRAUN, A.; BANERJEE, A.; ERCAL, N.; EICKELBERG, O.; KISSEL, T. H.; STOEGER, T. Inflammatory responses to pulmonary application of PEI-based siRNA nanocarriers in mice. **Biomaterials**, v. 32, n. 33, p. 8694-8701, 2011.
- BOSS, E.A. **Modelagem e otimização do processo de liofilização: aplicação para leite desnatado e café solúvel**. 2004. 129 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
- CAO, X. Q. et al. *Spray-drying* of ceramics for plasma-spray coating. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 20, n. 14, p. 2433-2439, 2000.
- BRASIL, Farmacopéia Brasileira, 5ª Ed, 2010.
- CAMPOS, A. M. **Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de Ilex paraguariensis St. Hill. Aquifoliaceae (erva-mate)**. 1996. f 149. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.
- CAO, X. Q.; VASSEN, R.; SCHWARTZ, S.; JUNGEN, W.; TIETZ, F.; STÖEVER, D. *Spray-drying* of ceramics for plasma-spray coating. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 20, n. 14, p. 2433-2439, 2000.
- CARVALHO, A. O.; MARTINS, J. L. S. Determinação de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco por espectrofotometria derivada de primeira ordem. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 4, p. 481-485, 2004.

CARR, A. G.; MAMMUCARI, R.; FOSTER, N. R. Particle formation of budesonide from alcohol-modified subcritical water solutions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 405, n. 1-2, p. 169-180, 2011.

CELEGHINI, R.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Spreng: ("guaco") leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 6, p. 706-709, 2001.

CORNEC, M. Aérosil: um adjuvant efficace pour lês formes sèches, liquids et pâteuses. **STP Pharma Sciences**, v. 6, p. 110-112, 1990.

CRAPARO, E. F.; TERESI, G.; BONDI, M. L.; LICCIARDI, M.; CAVALLARO, G. Phospholipid-polyaspartamide micelles for pulmonary delivery of corticosteroids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 406, n. 1-2, p. 135-144, 2011.

DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1430-1435, 2011.

DEVIRIM, B.; BOZKIR, A.; CANEFE, K. Preparation and evaluation of poly (lactic-co-glycolic acid) microparticles as a carrier for pulmonary delivery of recombinant human interleukin-2: II. In vitro studies on aerodynamic properties of dry powder inhaler formulations. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 37, n. 11, p. 1376-1386, 2011.

DOAN, T. V. P.; COUET, W.; OLIVIER, J. C. Formulation and in vitro characterization of inhalable rifampicin-loaded PLGA microspheres for sustained lung delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 414, n. 1-2, p. 112-117, 2011.

E-SHERBINY, I. M.; SMYTH, H. D. C. Controlled Release Pulmonary Administration of Curcumin Using Swellable Biocompatible Microparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 2, p. 269-280, 2012.

EDWARDS, D. A.; HANES, J.; CAPONETTI, G.; HRKACH, J.; BENJEBRIA, A.; ESKEW, M. L.; MINTZES, J.; DEEVER, D.; LOTAN, N.; LANGER, R. Large porous particles for pulmonary drug delivery. **Science**, v. 276, n. 5320, p. 1868-1871, 1997.

GILANI, K.; MOAZENI, E.; RAMEZANLI, T.; AMINI, M.; FAZELI, M. R.; JAMALIFAR, H. Development of Respirable Nanomicelle Carriers for Delivery of Amphotericin B by Jet Nebulization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 1, p. 252-259, 2011.

GUPTA, V.; AHSAN, F. Influence of PEI as a core modifying agent on PLGA microspheres of PGE1, a pulmonary selective vasodilator. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 413, n. 1-2, p. 51-62, 2011.

HASSAN, M. S.; LAU, R. Inhalation performance of pollen-shape carrier in dry powder formulation: Effect of size and surface morphology. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 413, n. 1-2, p. 93-102, 2011.

JAAFAR-MAALEJ, C.; ANDRIEU, V.; ELAISSARI, A.; FESSI, H. Beclomethasone-Loaded Lipidic Nanocarriers for Pulmonary Drug Delivery: Preparation, Characterization and In Vitro Drug Release. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, n. 3, p. 1841-1851, 2011.

KAIALY, W.; MARTIN, G. P.; TICEHURST, M. D.; ROYALL, P.; MOHAMMAD, M. A.; MURPHY, J.; NOKHODCHI, A. Characterisation and Deposition Studies of Recrystallised Lactose from Binary Mixtures of Ethanol/Butanol for Improved Drug Delivery from Dry Powder Inhalers. **Aaps Journal**, v. 13, n. 1, p. 30-43, 2011a.

KAIALY, W.; TICEHURST, M. D.; MURPHY, J.; NOKHODCHI, A. Improved Aerosolization Performance of Salbutamol Sulfate Formulated with Lactose Crystallized from Binary Mixtures of Ethanol-Acetone. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 7, p. 2665-2684, 2011b.

KAWASHIMA, Y., SERIGANO, T., HINO, T., YAMAMOTO, H.; TAKEUCHI, H. Design of inhalation dry powder of pranlukast hydrate to improve dispersibility by the surface modification with light anhydrous silicic acid (Aerosil[®]200). **International journal of pharmaceutics**, v. 173, n. 1, p. 243-251, 1998.

KHANDWEKAR, A. P.; PATIL, D. P.; SHOUCHE, Y.; DOBLE, M. Surface Engineering of Polycaprolactone by Biomacromolecules and their Blood Compatibility. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 26, n. 2, p. 227-252, 2011.

LEBHARDT, T.; ROESLER, S.; UUSITALO, H. P.; KISSEL, T. Surfactant-free redispersible nanoparticles in fast-dissolving composite microcarriers for dry-powder inhalation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 78, n. 1, p. 90-96, 2011.

LEITE, M. D. G. R.; SOUZA, C. L. D.; SILVA, M. A. M.; MOREIRA, L. K. A.; MATOS, F. J. D. A.; VIANA, G. S. Estudo farmacológico comparativo de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco), *Justicia pectoralis* Jacq (anador) e *Torresea cearensis* (cumaru). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 74, p. 12-15, 1993.

MANCA, M. L.; MANCONI, M.; VALENTI, D.; LAI, F.; LOY, G.; MATRICARDI, P.; FADDA, A. M. Liposomes coated with chitosan-xanthan gum (chitosomes) as potential carriers for pulmonary delivery of rifampicin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 2, p. 566-575, 2012.

MERCK INDEX. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 14th ed.; **Merck: Whitehouse Station**, NJ, USA, p. 1741, 2006.

MICHELIN, D. C.; FINATI, S. C. G.; SACRAMENTO, L. V. S.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. R. N. The Quality control of *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb. roots (Convolvulaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 18-22, 2010.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 5, p. 1655-1666, 2009.

OGAIN, O. N.; LI, J. H.; TAJBER, L.; CORRIGAN, O. I.; HEALY, A. M. Particle engineering of materials for oral inhalation by dry powder inhalers. I-Particles of sugar

excipients (trehalose and raffinose) for protein delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 405, n. 1-2, p. 23-35, 2011.

OH, Y. J.; LEE, J.; SEO, J. Y.; RHIM, T.; KIM, S. H.; YOON, H. J.; LEE, K. Y. Preparation of budesonide-loaded porous PLGA microparticles and their therapeutic efficacy in a murine asthma model. **Journal of Controlled Release**, v. 150, n. 1, p. 56-62, 2011.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 641-650, 2010.

OOI, J.; TRAINI, D.; HOE, S.; WONG, W.; YOUNG, P. M. Does carrier size matter? A fundamental study of drug aerosolisation from carrier based dry powder inhalation systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 413, n. 1-2, p. 1-9, 2011.

OSMAN, R.; KAN, P. L.; AWAD, G.; MORTADA, N.; EL-SHAMY, A.; ALPAR, O. Enhanced properties of discrete pulmonary deoxyribonuclease I (DNaseI) loaded PLGA nanoparticles during encapsulation and activity determination. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, n. 1-2, p. 257-265, 2011.

PAIVA, J.B. de; STERZO, E.V.; RIBEIRO, S.A.; PEREIRA E.A. **Isolamento de salmonella: comparação das etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento direto de amostras de fezes armazenadas por 24 e 96 horas**, Arquivos do Instituto Biológico, v. 73, n. 3, p. 263-269, 2006.

PARDEIKE, J.; WEBER, S.; HABER, T.; WAGNER, J.; ZARFL, H. P.; PLANK, H.; ZIMMER, A. Development of an Itraconazole-loaded nanostructured lipid carrier (NLC) formulation for pulmonary application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 419, n. 1-2, p. 329-338, 2011.

POURSHAHAB, P. S.; GILANI, K.; MOAZENI, E.; ESLAHI, H.; FAZELI, M. R.; JAMALIFAR, H. Preparation and characterization of spray dried inhalable powders containing chitosan nanoparticles for pulmonary delivery of isoniazid. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 7, p. 605-613, 2011.

RADÜNZ, L. L.; MELO, E. C.; BARBOSA, L. C. A.; ROCHA, R. P.; BERBERT, P. A. Rendimento extrativo de cumarina de folhas de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) submetidas a diferentes temperaturas de secagem. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 453-457, 2012.

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. **Journal of food engineering**, v. 49, n. 4, p. 311-319, 2001.

REMILI, H.; BOUSSARD, P.; DEVLEESCHOUWER, M. Microbiological quality of spray-dried pharmaceutical plant extracts. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 5, p. 265-268, 1994.

ROCHA, L.; LUCIO, E. M.; FRANÇA, H. S.; SHARAPIN, N. *Mikania glomerata* Spreng: Desenvolvimento de um produto fitoterápico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 744-747, 2008.

RODRIGUES, K. L.; GOMES, J. P.; CONCEIÇÃO, R. C. S.; BROD, C. S.; ALEIXO, J. A. G. **Condições Higiênico-Sanitárias no Comércio Ambulante de Alimentos em Pelotas-RS – Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 2003. p. 447-552. Campinas, Pelotas, Rio Grande do Sul.

SANTOS, E. V. M.; SHARAPIN, N. Extração de matérias-primas vegetais. Sharapin N. Fundamentos tecnológicos de produtos fitoterápicos. **Bogotá: Andrés Bello**, p. 57-60, 2000.

SANTOS, P. H. S.; SILVA, M. A. Retention of Vitamin C in Drying Processes of Fruits and Vegetables—A Review. **Dry Technology**, v. 26, p. 1421–1437, 2008.

SANTOS, F. J. B.; LIMA, S. G.; CERQUEIRA, G. S.; CITÓ, A. M. G. L.; CAVALCANTE, A. A. C. M.; HENRIQUE, T.; MARQUES, C.; FREITAS, R. M. Chemical composition and anxiolytic-like effects of the *Bauhinia platypetala*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 3, p. 507-516, 2012.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 654-658, 2009.

SELVAM, P.; EL-SHERBINY, I. M.; SMYTH, H. D. C. Swellable Hydrogel Particles for Controlled Release Pulmonary Administration Using Propellant-Driven Metered Dose Inhalers. **Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery**, v. 24, n. 1, p. 25-34, 2011.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos. 3.ed. São Paulo: **Livraria Varela**, 2007.

SILVA, F. A. **Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por spray-drying de *Ilex paraguariensis* A. St. Hill. – Aquifoliaceae (erva-mate)**. 2007. 243 f. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

SILVA, R. M. F.; GOMES, T. C. B. L.; ALBUQUERQUE, M. M.; SILVA JUNIOR, J. O. C.; BARBOSA, W. L. R.; ROLIM NETO, P. J. Abordagem sobre os diferentes processos de secagem empregados na obtenção de extratos secos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 103-109, 2012.

SOARES, L. A. L. **Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Rissek – Celastraceae. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final**. 2002. 285 f. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

SOARES, L. S.; SILVA, L. S.; BRUMANO, L.; STRINGHETA, P. C.; PINTO, M. A. O.; DIAS, L. O. M. Preparation of Dry Extract of *Mikania glomerata* Sprengel (Guaco) and Determination of Its Coumarin Levels by Spectrophotometry and HPLC-UV. **Molecules**, v. 17, n. 9, p. 10344-10354, 2012.

SON, Y.-J.; MCCONVILLE, J. T. A new respirable form of rifampicin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 78, n. 3, p. 366-376, 2011.

STRÅLSJÖ, L.; ALKLINT, C.; OLSSON, M. E.; SJÖHOLM, I. Total folate content and retention in rosehips (*Rosa* ssp.) after drying. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 15, p. 4291-4295, 2003.

TAKAMI, T.; MURAKAMI, Y. Development of PEG-PLA/PLGA microparticles for pulmonary drug delivery prepared by a novel emulsification technique assisted with amphiphilic block copolymers. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 87, n. 2, p. 433-438, 2011.

TANG, X. C.; PIKAL, M. J. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. **Pharmaceutical research**, v. 21, n. 2, p. 191-200, 2004.

THAMBI, P. T.; KUZHIVELIL, B.; SABU, M. C.; JOLLY, C. I. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the flowers of *Tabernaemontana coronaria* (L) R. Br. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, n. 3, p. 352-55, 2006.

TULI, R. A.; DARGAVILLE, T. R.; GEORGE, G. A.; ISLAM, N. Polycaprolactone microspheres as carriers for dry powder inhalers: Effect of surface coating on aerosolization of salbutamol sulfate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 2, p. 733-745, 2012.

VASCONCELOS, E. A. F.; MEDEIROS, M. G. F.; RAFFIN, F. N.; MOURA, T. F. A. L. 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.

WAND, L.H.; LIU, H.H. Electrochemical Reduction of Coumarins at a Film-Modified Electrode and Determination of Their Levels in Essential Oils and Traditional Chinese Herbal Medicines. **Molecules**, v. 14, p. 3538–3550, 2009.

WANG, L. H.; LIU, H. H.. Electrochemical Reduction of Coumarins at a Film-Modified Electrode and Determination of Their Levels in Essential Oils and Traditional Chinese Herbal Medicines. **Molecules**, v. 14, n. 9, p. 3538-3550, 2009.

WANG, Y. J.; WANG, L. Structures and properties of commercial maltodextrins from corn, potato, and rice starches. **Starch-Stärke**, v. 52, n. 8-9, p. 296-304, 2000.

WANG, L. H.; LIU, H. H. Electrochemical Reduction of Coumarins at a Film-Modified Electrode and Determination of Their Levels in Essential Oils and Traditional Chinese Herbal Medicines. **Molecules**, v. 14, n. 9, p. 3538-3550, 2009.

WANG, Y. J.; WANG, L. Structures and properties of commercial maltodextrins from corn, potato, and rice starches. **Starch-Stärke**, v. 52, n. 8-9, p. 296-304, 2000.

YOO, N. Y.; YOUN, Y. S.; OH, N. M.; OH, K. T.; LEE, D. K.; CHA, K. H.; OH, Y. T.; LEE, E. S. Antioxidant encapsulated porous poly(lactide-co-glycolide) microparticles for developing long acting inhalation system. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 88, n. 1, p. 419-424, 2011.

YOUNG, P. M.; WOOD, O.; OOI, J.; TRAINI, D. The influence of drug loading on formulation structure and aerosol performance in carrier based dry powder inhalers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 416, n. 1, p. 129-135, 2011.

CAPÍTULO III: Avaliação do efeito da *Mikania glomerata* Spreng. ao ser pulverizada no pulmão de animais com enfisema induzido por papaína

Artigo submetido à revista Journal of Pharmaceutical Sciences



Avaliação do efeito da *Mikania glomerata* Spreng. ao ser pulverizada no pulmão de animais com enfisema induzido por papaína

DANTAS, R.L.¹; CAMPELO, N.B.²; REIS, E. V. S.³
ALVES W. S.⁴; NUNES, L.C.C.¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

²Curso de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, Brasil.

⁴Programa de Pós-Graduação em Ciência da Reabilitação da Universidade Nove de Julho, São Paulo, Brasil

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da *M. glomerata* sobre o enfisema pulmonar induzido por papaína. A formulação foi desenvolvida por aspersão e aplicada por via pulmonar. No grupo controle positivo, foi utilizado o glicocorticoide budesonida. De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que a utilização do extrato seco da *M. glomerata* no tratamento do efisema pulmonar mostrou-se muito eficiente, uma vez que houve uma diminuição significativa no recrutamento neutrofílico e na contagem total de células. Devido seu potencial terapêutico, há a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a sua utilização, por via pulmonar, para o tratamento de patologias com predominância de achados inflamatórios. Entretanto, como o recrutamento de neutrófilos foi, proporcionalmente, menor que o de macrófagos, podemos concluir que estava ocorrendo acúmulo do extrato seco da *M. glomerata* no pulmão. Dessa forma, existe a necessidade de otimizar algumas características do extrato seco (como a biodegradabilidade) e a dose entregue sem, contudo, afetar a eficácia de seu efeito terapêutico. Por fim, embora o efeito da *M. glomerata* tenha sido estudado em relação aos achados celulares e histopatológicos, um dos seus maiores benefícios para o enfisema, sua ação broncodilatadora, bem como seus efeitos de toxicidade não foram avaliados. Dessa forma, os benefícios da utilização dessa planta precisam ser estudados a exaustão.

PALAVRAS-CHAVE: Enfisema pulmonar; *Mikania glomerata*; Modelos Animais; Papaína; Histopatologia.

Abstract: Evaluation of the effect of *Mikania glomerata* Spreng. to be sprayed in the lungs of animals with papain-induced emphysema

The present study aimed to evaluate the effect of *M. glomerata* on pulmonary emphysema induced by papain. The spray formulation was developed and applied by the pulmonary route. In the positive control group, the glucocorticoid budesonide was used. According to the obtained results we can conclude that the use of the dry extract of *M. glomerata* in the treatment of pulmonary emphysema proved to be very effective, since a significant reduction in neutrophil recruitment and total cell count was found. Because of its therapeutic potential, there is a need for further studies on its use by the pulmonary route for the treatment of diseases with predominant inflammatory findings. However, as the recruitment of neutrophils was proportionally smaller than that of macrophages, we can conclude that was occurring buildup of the dry extract of *M. glomerata* in the lung. Thus, there is a need to optimize certain characteristics of dry extract (such as biodegradability) and the dose delivered without, however, affecting the efficacy of therapeutic effect. Finally, although the effect of *M. glomerata* has been studied in relation to cellular and histopathological findings, one of its greatest benefit to emphysema, the bronchodilator effect, and its toxicity effects were not assessed. Thus, the benefits of using this plant need to be studied to exhaustion.

KEYWORDS: Pulmonary Emphysema; *Mikania glomerata*; Animal Models; Papain; Histopathology.

1 INTRODUÇÃO

O enfisema pulmonar é uma patologia progressiva caracterizada pelo aumento permanente dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal, acompanhado pela destruição de suas paredes e perda de elasticidade do parênquima. Todas essas consequências, que ocorrem sem fibrose óbvia, contribuem para a redução do volume expiratório forçado em um segundo (VEF1) (KIELTY; SHERRATT; SHUTTLEWORTH, 2002; ROBBESOM et al., 2007; BARR et al., 2010).

Uma vez que o quadro de enfisema esteja estabelecido, nenhum agente anti-inflamatório ou antioxidante e nem mesmo o pilar de tratamento da patologia, o qual envolve β_2 agonistas, anticolinérgicos de longa ação e corticosteróides inalados, conseguirá afetar o declínio da FEV1 e nem o curso da doença (CALVERLEY; RENNARD, 2007; DECRAMER; JANSSENS; MIRAVITLLES, 2012).

Com o enfisema estabelecido, os tratamentos mais promissores são os que utilizam o uso ou recrutamento de células-tronco endógenas e exógenas ao pulmão. Como exemplo, temos o fator de crescimento de hepatócitos (FCH) (HEGAB et al., 2008), a administração exógena de células-tronco (GRIFFITHS; BONNET; JANES, 2005), a utilização do ácido *all-trans-retinóico* e do fator estimulador de colônias de granulócitos humanos (FECGH) (ISHIZAWA et al., 2004).

O primeiro passo para evitar que o enfisema se estabeleça é o diagnóstico precoce. Nesse contexto, os biomarcadores seriam de extrema relevância, uma vez que através deles os primeiros sinais da doença poderiam ser detectados mesmo quando os sintomas ainda não estão presentes e os danos irreversíveis do enfisema ainda não se instalaram. Entretanto, como o enfisema é uma doença multifatorial, esses biomarcadores teriam que ser múltiplos e baseados nos mecanismos patogênicos mais relevantes dessa doença (FU et al., 2010; GALBÁN et al., 2012; ROBINSON et al., 2013).

Porém, mesmo quando o enfisema é diagnosticado em seu estágio inicial, ainda existe uma carência de estratégias de tratamento que evitem sua evolução (CALVERLEY; RENNARD, 2007; DECRAMER; JANSSENS; MIRAVITLLES, 2012). Como forma de reverter esse cenário, o uso da tecnologia farmacêutica é uma opção para otimizar os resultados clínicos de medicamentos que já foram aprovados para uso e que têm o potencial de se tornarem mais eficazes.

Dentre esses, podemos destacar os medicamentos desenvolvidos a partir da *Mikania glomerata* Spreng. Essa planta é um dos 12 fitoterápicos de interesse do SUS (RODRIGUES, SANTOS; AMARAL, 2006), sendo amplamente utilizada no tratamento de alergias e inflamação, principalmente do sistema respiratório. Existem evidências pré-clínicas de sua ação broncodilatadora, anti-inflamatória, antiespasmódica e inibitória da inflamação imunológica (FALCÃO et al., 2005; GASPARETTO et al., 2010; CZELUSNIAK et al., 2012).

Como forma de avaliar o efeito dessa planta no enfisema pulmonar, este estudo teve como objetivo desenvolver uma formulação para a administração pulmonar em ratos com enfisema pulmonar induzido por papaína.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Metodologia com a formulação

2.1.1 Extrato vegetal

O extrato vegetal, obtido da Schraiber (São Paulo, Brasil), foi produzido a partir da *M. glomerata* oriunda da região sul do Brasil. Esse extrato apresentava as seguintes propriedades: líquido límpido e homogêneo, cor castanho escuro, pH de 5,97, teor alcoólico de 36%, densidade de 0,903 g/ml (conforme descrito na farmacopeia 5ª edição), resíduo seco de 2,7% (conforme sistema de secagem por infravermelho) e índice de refração de 1.350 nD. Além disso, na análise microbiológica foi encontrado uma quantidade de bactérias heterotróficas de 3.10^2 UFC/ml (35°C/ 48h) e de fungos e leveduras < 10 UFC/ml.

2.1.2 Secagem do extrato por aspersão

Como adjuvante de secagem foi utilizado o Aerosil®200 (dióxido de silício coloidal). O cálculo da quantidade de Aerosil®200 foi baseado no resíduo seco do extrato, conforme equação 1. A secagem por aspersão foi realizada em Mini *Spray Dryer* (BÜCHI B-290). Foi utilizada temperatura de entrada de 140°C, fluxo da amostra de 7,0 mL/min. e pressão de 600 mmHg. Os parâmetros de secagem foram mantidos constantes e a solução extrativa adicionada do adjuvante tecnológico foi mantida sob agitação durante todo processo de secagem.

$$\frac{RS (\%) \times VS (mL) \times PA (\%)}{PA (\%) - 100\%}, \quad \text{Eq. (1)}$$

onde: RS = resíduo seco, VS = volume secado, PA = percentagem de Aerosil®200

2.2 Metodologia com Animais

Os experimentos com animais foram realizados após sua aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UESPI (CEP-UESPI 007/2012) e foram desenvolvidos em conformidade com as diretrizes do conselho nacional de controle de experimentação animal - CONCEA. Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*), com três meses de vida e peso médio de $300 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$ provenientes do Biotério da UFPI. Os animais foram mantidos sob condições livres de organismos patogênicos. Os procedimentos de anestesia foram realizados com administração subcutânea de 0,2 ml de midazolam e 0,3 ml de ketamina. Para a eutanásia foi utilizada tração cervical.

2.2.1 Grupos experimentais

Foram formados 4 grupos (n=10): grupo controle, grupo papaína, grupo budesonida e grupo *M. glomerata*.

2.2.2 Indução do enfisema

A indução do enfisema pulmonar por papaína foi realizado por meio de três pulverizações de 3 mg de papaína, com intervalos de sete dias entre elas. A pulverização foi realizada utilizando um microspray (Penn-Century®), ilustração 1.a. Para a visualização da via aérea dos animais foi desenvolvido um laringoscópio artesanal, ilustração 1.b. A dosagem de papaína foi estabelecida adaptando o que Fusco determinou em seu modelo experimental (FUSCO et al., 2002).

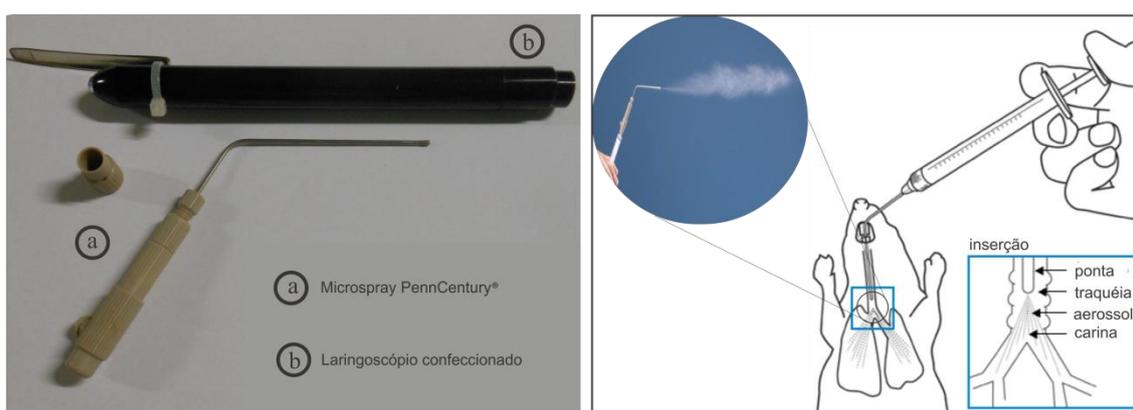


Ilustração 1: Laringoscópio artesanal, microspray e esquema de pulverização

2.2.2 Tratamento dos animais

O tratamento dos animais iniciou no 22º dia após a primeira pulverização de papaína com administração, via microspray (Penn-Century®), de doses diárias de

100mg de Busonid (Biosintética[®]), o que equivale a 200 mcg de budesonida, e 100mg de *M. glomerata* por um período de cinco dias.

2.3 Metodologia com células e tecidos

No 27^o dia de experimento, os animais foram eutanasiados para a realização da análise do lavado broncoalveolar (LBA), análise que permite a contagem total e diferencial de células, e análise histopatológica.

2.3.1 Lavado broncoalveolar

A canulação da traqueia para a realização do lavado é apresentada na ilustração 2.

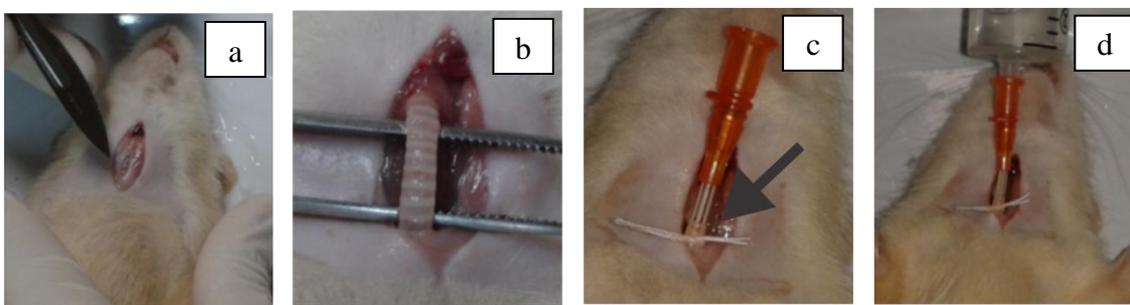


Ilustração 2: Lavado broncoalveolar

Após a anestesia, foram retirados 10 ml de sangue pela artéria abdominal. Em seguida, foi realizada a traqueostomia e o acoplamento da cânula, ilustração 2.a-c, a qual foi fixada à traqueia para evitar o extravasamento da Solução Salina Fosfatada Tamponada (PBS), indicada pela seta na ilustração 2.c. Através da cânula, foram introduzidos 20 ml de PBS, ilustração 2.d. Durante a introdução, foi realizada uma massagem na região torácica e em seguida, foram aspirados de 17 a 20 ml do lavado, o qual foi centrifugado por 10 min a 1500 rpm. Então, foram coletados 0,5 ml para contagem diferenciada (câmera de suta). Ao botão celular, foram adicionados 0,5 ml de PBS e 0,8 ml de cristal violeta. Em seguida foi coletado 0,1 ml da amostra para contagem em câmara de Neubauer. A contagem diferenciada foi realizada após coração com panótico rápido, de acordo com as instruções do fabricante, Laborclin[®].

2.3.2 Histopatológico

Para retirada do pulmão foi realizada uma perfusão cardíaca para a retirada do sangue pulmonar. Em seguida, os animais foram novamente acoplados à cânula. Através dessa, foi introduzido formaldeído a 10% tamponado. Os pulmões foram

conservados por um período de 24 horas e então, transferidos para recipientes contendo álcool etílico a 70%, onde permaneceram por cerca de 72 horas. Em seguida, procedeu-se à desidratação das peças em série alcoólica de concentração crescente (80% por 1 hora, 90% por uma hora, 95% por uma hora e 100% em dois banhos de uma hora cada). Então foram diafanizadas em xilol (duas passagens de duas horas), impregnadas em parafina histológica (duas passagens de duas horas em estufa a 60°C) e colocadas em blocos de parafina. Os blocos foram seccionados em micrótomo Olympus, modelo CUT 4055 II, em seções com 5,0 µm de espessura. As amostras seccionadas foram, em seguida, desparafinizadas em xilol (2/ 3 minutos) e hidratadas em série alcoólica de concentração decrescente até água pura (100%/2 minutos, 95%/2 minutos, 70%/2 minutos e água destilada), conforme descrito anteriormente (SILVA et al., 2004).

As lâminas contendo os cortes histológicos foram, então, coradas com Hematoxilina-Eosina (HE), PAS-Alcian Blue, Tricrômicos de Masson e Picrosírius, de acordo com as instruções do fabricante, Easypath[®].

2.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, em seguida, ao teste Newman-Keuls. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o GraphPad Prism 5. Os resultados foram expressos como a média ± erro-padrão da média (EPM). Valores de $p < 0,001$ foram considerados significativos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

No enfisema pulmonar há aumento de células inflamatórias em várias partes do pulmão. Essas células, que produzem citocinas inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (FNT)- α , IL-1 β , IL-6 e espécies reativas de oxigênio (ERO); em particular, o ânion superóxido, e também produzem quimiocinas e outros quimioatrativos, tais como a interleucina-8 (IL-8), a proteína quimiotática de monócitos-1 (PQM-1) e o leucotrieno B4 (LTB4), promovem a manutenção do acúmulo de células inflamatórias no pulmão e estão diretamente associadas com a gravidade da doença (RUBIO et al., 2004; FORONJY et al., 2006; CALVERLEY; RENNARD, 2007; KINOSHITA et al., 2007). Em outras palavras, existe uma interdependência celular na manutenção da inflamação no enfisema (CHUNG; ADCOCK, 2008; TARANTINO, 2008).

Na ilustração 3, são apresentados os dados da contagem total de células do LBA.

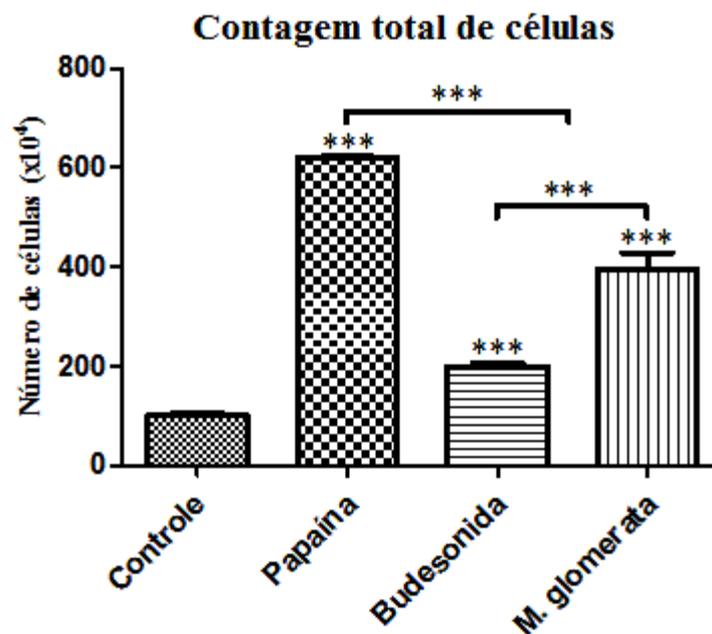


Ilustração 3: Contagem total de células do LBA. Os valores apresentados representam a média \pm E.P.M. dos experimentos realizados ($n = 10$).***, estatisticamente significativo, $p < 0,001$. ANOVA seguida de Newman-Keuls.

Analisando a ilustração 3, podemos notar que ocorreu, em relação ao controle, um aumento significativo na contagem total de células no grupo papaína. Isso mostra que essa enzima é um potente indutor inflamatório. Além disso, ocorreu, em relação ao grupo papaína, uma redução significativa na contagem total de células no grupo budesonida e *M. glomerata*. Essa redução na contagem total de células é fundamental para a interrupção da manutenção do recrutamento celular.

Como resultado de uma lesão, as células epiteliais e endoteliais do pulmão, secretam mediadores inflamatórios que induzem o recrutamento de células inflamatórias. Essas células aparecem no local da lesão em uma sequência de tempo determinada, conforme mostrado na ilustração 3 (SCHWACHA, 2009).

Entretanto, dependendo do agente provocador da lesão, bem como de sua intensidade e frequência de exposição, ocorre a manutenção de tipos específicos de células inflamatórias no pulmão (TARANTINO, 2002). No enfisema pulmonar, por exemplo, ocorre a predominância de neutrófilos (RUFINO; SILVA, 2006; RUFINO et

al., 2007). Dessa forma, ao avaliarmos o efeito da budesonida e da *M. glomerata* sobre o recrutamento celular no enfisema, especial atenção deverá ser dada a ilustração 5.

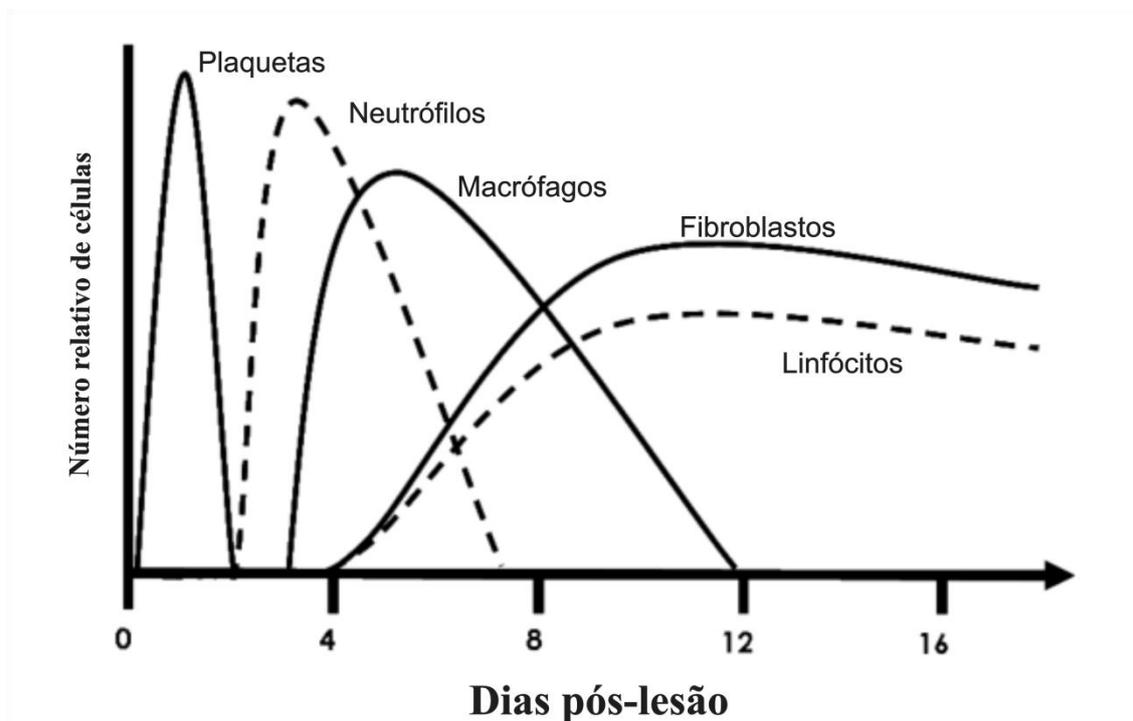


Ilustração 4: Sequência cronológica do recrutamento celular. Adaptada de Schwacha (2009)

Na ilustração 5, são apresentados os dados da contagem de neutrófilos do LBA. Os neutrófilos, uma das principais células presentes na inflamação pulmonar, são responsáveis pela produção de serinas proteases, que são enzimas proteolíticas no tecido pulmonar, sendo umas das poucas enzimas humanas com essa capacidade (SERRA et al., 2008).

Na ilustração 5, é possível observar que a administração da budesonida provocou a redução drástica no recrutamento de neutrófilos. A contagem diferencial de neutrófilos neste grupo foi, estatisticamente, igual ao do grupo controle. Esse resultado, provavelmente, é decorrente da dose significativa de budesonida que foi administrada (200 mcg por dia, durante 5 dias). No mesmo gráfico, é possível observar que a administração do extrato seco da *M. glomerata* também provocou redução significativa no recrutamento das células características do enfisema, os neutrófilos. Tal resultado

deve, provavelmente, a ação anti-inflamatória apresentada pela planta utilizada (FALCÃO et al., 2005; GASPARETTO et al., 2010; CZELUSNIAK et al., 2012).

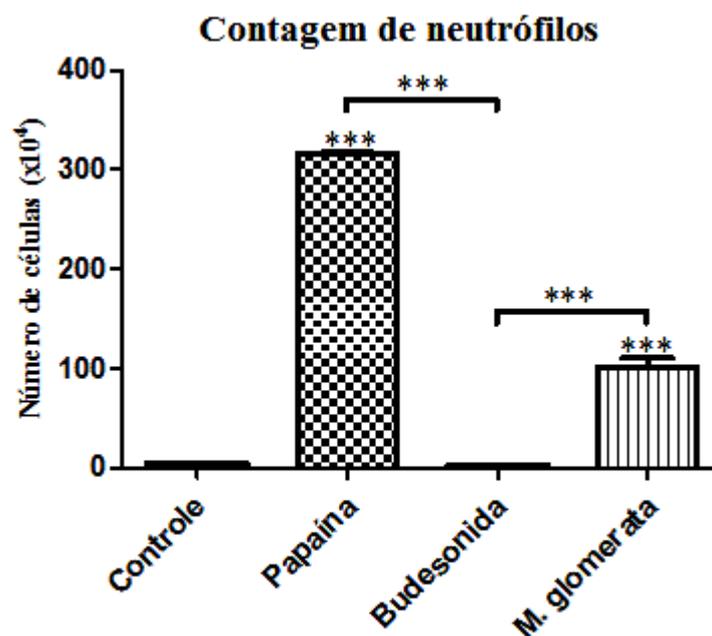


Ilustração 5: Contagem de neutrófilos do LBA. Os valores apresentados representam a média \pm E.P.M. dos experimentos realizados (n = 10).***, estatisticamente significativo, $p < 0,001$. ANOVA seguida de Newman-Keuls.

Na ilustração 6, são apresentados os dados da contagem de macrófagos do LBA. O LBA é mais confiável para quantificar a abundância de neutrófilos, pois essas células migram diretamente dos capilares para o espaço alveolar, mas menos confiável para avaliar a abundância de macrófagos, uma vez que muitos macrófagos permanecem no espaço intersticial. Entretanto, mesmo menos confiável, a quantificação dos macrófagos pelo LBA é crucial para o estudo do enfisema (SHAPIRO et al., 2003).

Analisando a quantidade de macrófagos, ilustração 6, é possível observar que a *M. glomerata* induziu um recrutamento de macrófagos superior ao grupo papaína. Esse comportamento é atribuído, principalmente, ao fato do extrato da *M. glomerata* ter a característica de ser menos biodegradável que o extrato da papaína. Essa característica se deve a presença do Aerosil[®]200, uma sílica amorfa, no extrato seco da *M. glomerata*, que dificulta sua fagocitose pelos macrófagos (REHN et al., 2003). Vale lembrar que, além da fagocitose, os macrófagos são responsáveis pela secreção de citocinas e

quimiocinas (ALNAJAR, 2013). As quimiocinas, por sua vez tem como uma de suas funções, recrutar neutrófilos para pulmão enfisematoso (RUBIO et al., 2004; FORONJY et al., 2006; KINOSHITA et al., 2007).

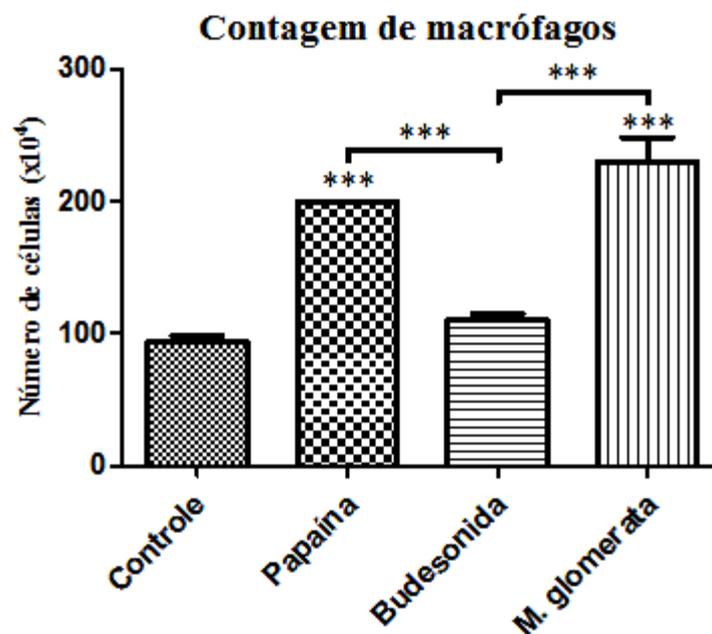


Ilustração 6: Contagem de macrófagos do LBA. Os valores apresentados representam a média \pm E.P.M. dos experimentos realizados (n = 10).***, estatisticamente significativo, $p < 0,001$. ANOVA seguida de Newman-Keuls.

Entretanto, uma vez que o recrutamento de neutrófilos, ilustração 5, foi proporcionalmente menor ao número de macrófagos, ilustração 6, podemos inferir que os macrófagos devem ter atuado, principalmente, no processo de fagocitose. Em outras palavras, estava ocorrendo acúmulo de extrato seco de *M. glomerata* no pulmão. Tal fato não ocorreu com a budesonida, provavelmente, por esta ser um medicamento cuja utilização por via pulmonar já é consolidada.

Na ilustração 7, são apresentados os dados da contagem de linfócitos do LBA. No LBA de pacientes com DPOC ocorre uma diminuição percentual de macrófagos e uma manutenção na contagem total de linfócitos (TARANTINO, 2002; RUFINO; SILVA, 2006; RUFINO et al., 2007). Entretanto, na fase tardia do enfisema ocorre participação adicional dos linfócitos (RUFINO et al., 2007).

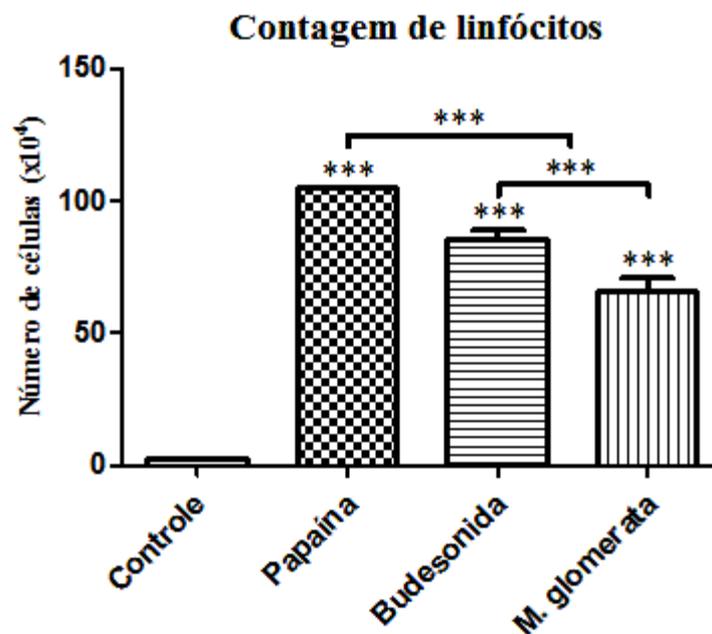


Ilustração 7: Contagem de linfócitos do LBA. Os valores apresentados representam a média \pm E.P.M. dos experimentos realizados ($n = 10$).***, estatisticamente significativo, $p < 0,001$. ANOVA seguida de Newman-Keuls.

Dessa forma, na fase tardia, o tratamento com a *M. glomerata* poderá mostrar-se ainda mais relevante uma vez que no grupo *M. glomerata* ocorreu uma diminuição maior de linfócitos do que no grupo budesonida, ilustração 7.

Corroborando com os resultados do LBA, temos os resultados do histopatológico, que podem ser visualizados na ilustração 8.

Analisando a ilustração 8.a, podemos visualizar o parênquima pulmonar, corado por PAS-Alcian Blue, de um animal do grupo controle. Nessa lâmina, é possível observar que não ocorreu metaplasia de célula caliciforme e nem aumento da produção de muco. Na ilustração 8.b, parênquima pulmonar do grupo controle corado por Picrosírius. Nela é possível observar que também não ocorreu aumento na deposição de colágeno (em vermelho). Na ilustração 8.h, podemos observar que não houve aumento significativo na deposição de colágeno. Isso mostra que a lesão desenvolvida pela papaína é adequada para o estudo do enfisema, uma vez que essa patologia não se caracteriza por fibrose óbvia e nem com metaplasia de célula caliciforme significativa.

Na ilustração 8.h, por exemplo, podemos visualizar a deposição de colágeno, em azul, no grupo papaína (Masson). A metaplasia de células caliciformes e a fibrose são mais características da bronquite crônica e não do enfisema (MARTINEZ; GOTTSCHALL, 1979; KIELTY; SHERRATT; SHUTTLEWORTH, 2002).

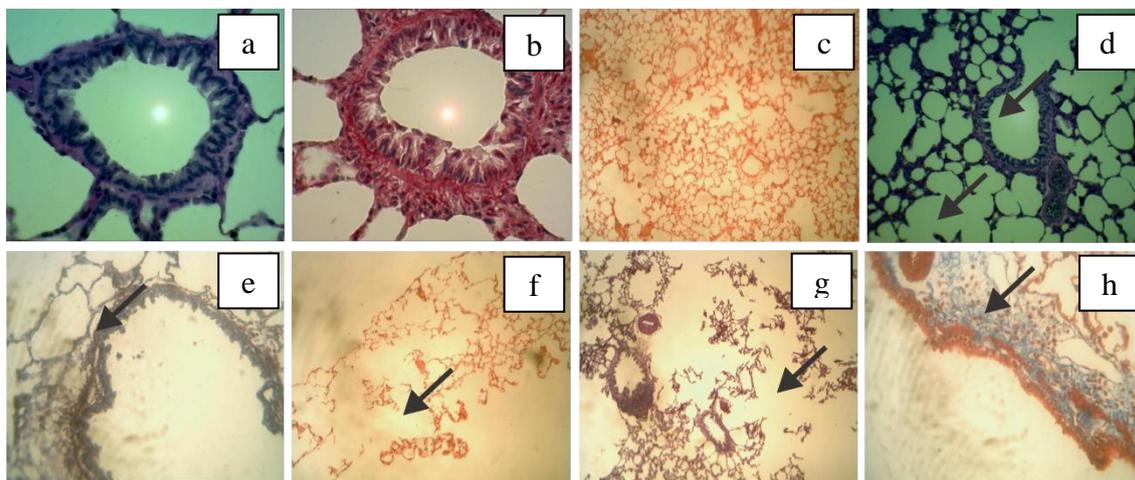


Ilustração 8: Análise histopatológica dos experimentos realizados. Legenda: coloração PAS-Alcian Blue (PAS): (a) do grupo controle, (b) PAS do grupo controle; (c) Hematoxilina-Eosina (HE) do grupo controle; (d) PAS do grupo budesonida; (e) Picrosírius do grupo *M. glomerata*; (f) HE do grupo papaína; (g) PAS do grupo papaína; (h) Tricrômicos de Masson (Masson) do grupo papaína.

Ainda na ilustração 8, podemos observar o que, na verdade já havia sido reportado: embora os agentes anti-inflamatórios revertam a sintomatologia do enfisema, eles não alteram o curso da doença (CALVERLEY; RENNARD, 2007; DECRAMER; JANSSENS; MIRAVITLES, 2012). Isto pode ser visualizado ao se analisar a ilustração 8.d, a qual mostra uma destruição moderada do parênquima pulmonar no grupo budesonida. Já na ilustração 8.e (corada por Tricrômicos de Masson), pode-se observar o indicativo de uma destruição moderada/severa do parênquima no grupo *M. glomerata*.

Por fim, embora o efeito da *M. glomerata* tenha sido estudado em relação aos achados celulares e histopatológicos, um dos seus maiores benefícios para o enfisema, sua ação broncodilatadora, bem como seus efeitos de toxicidade não foram avaliados. Dessa forma, os benefícios da utilização dessa planta precisam ser estudados a exaustão (FALCÃO et al., 2005; GASPARETTO et al., 2010; CZELUSNIAK et al., 2012).

4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que a utilização do extrato seco da *M. glomerata* no tratamento do enfisema pulmonar mostrou-se muito eficiente, uma vez que houve uma diminuição significativa no recrutamento neutrofílico e na contagem total de células. Devido seu potencial terapêutico, há a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a sua utilização, por via pulmonar, para o tratamento de patologias com predominância de achados inflamatórios. Entretanto, como o recrutamento de neutrófilos foi, proporcionalmente, menor que o de macrófagos, podemos concluir que estava ocorrendo acúmulo do extrato seco da *M. glomerata* no pulmão. Dessa forma, existe a necessidade de otimizar algumas características do extrato seco (como a biodegradabilidade) e a dose entregue sem, contudo, afetar a eficácia de seu efeito terapêutico.

Por fim, podemos concluir que embora o efeito da *M. glomerata* tenha sido estudado em relação aos achados celulares e histopatológicos, um dos seus maiores benefícios para o enfisema, sua ação broncodilatadora, bem como seus efeitos de toxicidade não foram avaliados. Dessa forma, os benefícios da utilização dessa planta precisam ser estudados a exaustão.

REFERÊNCIAS

- ALNAJAR, A. A. **The role of the Four and a half LIM only protein 2 (FHL2) in bleomycin induced lung fibrosis**. 2013. 112 f. Tese de doutorado, Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, Münster.
- BARR, R. G.; BLUEMKE, D. A.; AHMED, F. S.; CARR, J. J.; ENRIGHT, P. L.; HOFFMAN, E. A.; JIANG, R.; KAWUT, S. M.; KRONMAL, R. A.; LIMA, J. A. C. Percent emphysema, airflow obstruction, and impaired left ventricular filling. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 3, p. 217-227, 2010.
- CALVERLEY, P.; RENNARD, S. I. What have we learned from large drug treatment trials in COPD? **The Lancet**, v. 370, n. 9589, p. 774-785, 2007.
- CHUNG, K. F.; ADCOCK, J. M. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair destruction. **European Respiratory Journal**, v. 31, p. 1334-56, 2008.
- CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D. F.; FREITAS, G. B. L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 400-409, 2012.
- DECRAMER, M.; JANSSENS, W.; MIRAVITLLES, M. Chronic obstructive pulmonary disease. **Lancet**, v. 379, p. 1341-1351, 2012.
- FALCÃO, H. S.; LIMA, I. O.; SANTOS, V. L.; DANTAS, H. F.; DINIZ, M. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 381-391, 2005.
- FILHO, M. T.; SANTOS, U. P. Silicose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 1, p. 41-47, 2006.
- FORONJY, R.; MIROCHNITCHENKO, O.; PROPOKENKO, O.; LEMAITRE, V.; JIA, Y.; INOUE, M.; OKADA, Y.; D'ARMIENTO, J. M. Superoxide dismutase expression attenuates cigarette smoke-or elastase-generated emphysema in mice. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 173, n. 6, p. 623-631, 2006.
- FU, Q.; SCHOENHOFF, F. S.; SAVAGE, W. J.; ZHANG, P.; EYK, J. E. V. Multiplex assays for biomarker research and clinical application: translational science coming of age. **PROTEOMICS-Clinical Applications**, v. 4, n. 3, p. 271-284, 2010.
- 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. **Jornal de Pneumologia**, v. 28, n. 1, p. 1-7, 2002.

GALBÁN, C. J.; HAN, M. K.; BOES, J. L.; CHUGHTAI, K. A.; MEYER, C. R.; JOHNSON, T. D.; GALBÁN, S.; REHEMTULLA, A.; KAZEROONI, E. A.; MARTINEZ, FERNANDO J. Computed tomography-based biomarker provides unique signature for diagnosis of COPD phenotypes and disease progression. **Nature medicine**, v. 18, p. 1711–1715, 2012.

GASPARETTO, J. C.; CAMPOS, F. R.; BUDEL, J. M.; PONTAROLO, R. *Mikania glomerata* Spreng. e *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae: agronomic, genetic, anatomical, chemical, pharmacological, toxicological studies and its use in herbal therapy programs in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 627-640, 2010.

GRIFFITHS, M. J. D.; BONNET, D.; JANES, S. M. Stem cells of the alveolar epithelium. **The Lancet**, v. 366, n. 9481, p. 249-260, 2005.

HEGAB, A. E.; KUBO, H.; YAMAYA, M.; ASADA, M.; HE, M.; FUJINO, N.; MIZUNO, S.; NAKAMURA, T. Intranasal HGF administration ameliorates the physiologic and morphologic changes in lung emphysema. **Molecular Therapy**, v. 16, n. 8, p. 1417-1426, 2008.

ISHIZAWA, K.; KUBO, H.; YAMADA, M.; KOBAYASHI, S.; NUMASAKI, M.; UEDA, S.; SUZUKI, T.; SASAKI, H. Bone marrow-derived cells contribute to lung regeneration after elastase-induced pulmonary emphysema. **FEBS Letters**, v. 556, n. 1, p. 249-252, 2004.

KIELTY, C. M.; BALDOCK, C.; LEE, D.; ROCK, M. J.; ASHWORTH, J. L.; SHUTTLEWORTH, C. A. Fibrillin: from microfibril assembly to biomechanical function. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 357, n. 1418, p. 207-217, 2002.

KINOSHITA, T.; HOSHINO, T.; IMAOKA, H.; ICHIKI, H.; OKAMOTO, M.; KAWAYAMA, T.; YODOI, J.; KATO, S.; AIZAWA, H. Thioredoxin prevents the development and progression of elastase-induced emphysema. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 354, n. 3, p. 712-719, 2007.

REHN, B.; SEILER, F.; REHN, S.; BRUCH, J.; MAIER, M. Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: untreated and surface treated. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 189, n. 2, p. 84-95, 2003.

ROBBESOM, A. A.; KOENDERS, M. M. J. F.; SMITS, N. C.; HAFMANS, T.; VERSTEEG, E. M. M.; BULTEN, J.; VEERKAMP, J.H.; DEKHUIJZEN, P. N. R.; VAN, T. H. K. Aberrant fibrillin-1 expression in early emphysematous human lung: a proposed predisposition for emphysema. **Modern Pathology**, v. 21, n. 3, p. 297-307, 2007.

ROBINSON, W. H.; LINDSTROM, T. M.; CHEUNG, R. K.; SOKOLOVE, J. Mechanistic biomarkers for clinical decision making in rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 9, p. 267-276, 2013.

RODRIGUES, A. G.; SANTOS, M. G.; AMARAL, A. C. F. Políticas públicas em plantas medicinais e fitoterápicos. **Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de assistência farmacêutica.**

Fitoterapia no SUS eo programa de pesquisas de plantas medicinais da central de medicamentos. Brasília:(DF): MS, p. 9-28, 2006.

RUBIO, M. L.; MARTIN-MOSQUERO, M. C.; ORTEGA, M.; PECES-BARBA, G.; GONZÁLEZ-MANGADO, N. Oral N-acetylcysteine attenuates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. **CHEST Journal**, v. 125, n. 4, p. 1500-1506, 2004.

RUFINO, R.; SILVA, J. R. L. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 3, p. 241-248, 2006.

RUFINO, R.; COSTA, C. H.; SOUZA, H. S.; MADI, K.; SILVA, J. R. Perfil celular do escarro induzido e sangue periférico na doença pulmonar obstrutiva crônica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 5, p. 510-518, 2007.

SHAPIRO, S. D. Neutrophil Elastase Contributes to Cigarette Smoke-Induced Emphysema in Mice. **American Journal of Pathology**, v. 163, n. 6, p. 2329-2335, 2003.

SILVA, F. A. **Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por spray-drying de Ilex paraguariensis A. St. Hill. – Aquifoliaceae (erva-mate).** 2007. 243 f. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

SCHWACHA, M. G. $\gamma\delta$ T-cells: Potential regulators of the post-burn inflammatory response. **Burns**, v. 35, n. 3, p. 318-326, 2009.

TARANTINO, A. B. **Doenças pulmonares.** 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O maior desafio no que se refere ao enfisema pulmonar é encontrar uma forma de reverter/minimizar as suas alterações patológicas, que acabam por ser as responsáveis pela perda da qualidade de vida e os altos custos com as internações dos pacientes. O primeiro passo nesse sentido é o diagnóstico precoce, que deverá ocorrer com o uso de biomarcadores baseados nos mecanismos patogênicos descritos nesta dissertação, seção 3.2 (artigo “**Estado da arte do enfisema pulmonar: mecanismos patogênicos, biomarcadores e extratos vegetais por vetorização pulmonar**”). No estágio inicial do enfisema, uma opção terapêutica que ainda não foi utilizada clinicamente, mas que tem potencial (de acordo com os achados pré-clínicos descritos no artigo “**Avaliação do efeito da *Mikania glomerata* Spreng. ao ser pulverizada no pulmão de animais com enfisema induzido por papaína**”), é a baseada nos constituintes de plantas medicinais (como é o caso da *Mikania glomerata*) que seriam entregues por via pulmonar. Uma vez que as alterações irreversíveis do enfisema já estejam estabelecidas, a terapia mais promissora envolve, sem dúvidas, o uso ou recrutamento de células-tronco endógenas e exógenas ao pulmão.

**PRODUÇÃO CIENTÍFICA
E TECNOLÓGICA**

- *Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)*

DANTAS, R. L., NUNES, L. C. C. Fotobiomodulação experimental na prevenção de enfisema pulmonar In: 1º Workshop de Projetos e Dissertações, 2012, Teresina. **Anais do 1º Workshop de Projetos e Dissertações**. v. 5, 2012.

- *Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)*

CAMPELO, N. B., LEAL, L. H. C., DANTAS, R. L., NUNES, L. C. C. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil®200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Mikania glomerata* Spreng (asteracea) In: III Congresso Piauiense de Saúde Pública e III Seminário de Ensino na Saúde, 2013, Parnaíba. **III Congresso Piauiense de Saúde Pública e III Seminário de Ensino na Saúde**. 2013.

PEREIRA JUNIOR, J. L., DANTAS, R. L., REIS, E. V. S., FONSECA, K. M., CAMPELO, N. B., BESERRA, M. R. S., ALVES, W.S. Ação do laser de baixa intensidade sobre a produção do muco na inflamação pulmonar In: Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia do Nordeste, 2013. **Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia do Nordeste**. 2013.

SOARES, M. R. B. S., DANTAS, R. L. DPOC: influência da ooforectomia na proteção pulmonar contra o enfisema pulmonar induzido por papaína In: IV Congresso Nordestino Médico Acadêmico e XX Congresso Médico Acadêmico do Piauí, 2013, Teresina. **IV Congresso Nordestino Médico Acadêmico e XX Congresso Médico Acadêmico do Piauí**. 2013.

SOARES, M. R. B. S., DANTAS, R. L., NUNES, L. C. C. Enfisema pulmonar: uma alternativa ao modelo experimental com cigarro In: IV Congresso Nordestino Médico Acadêmico e XX Congresso Médico Acadêmico do Piauí, 2013, Teresina. **IV Congresso Nordestino Médico Acadêmico e XX Congresso Médico Acadêmico do Piauí**. 2013.

- *Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)*

CAMPELO, N. B., CARVALHO, I. B., LEAL, L. H. C., DANTAS, R. L., NUNES, L. C. C. Proposition of laryngoscope and technic of sprinkling for development of emphysema models in rats In: I Encontro Estratégico de Ciências Farmacêuticas e I Seminário Ibero Americano de P & D de Medicamentos, 2013, Teresina. **I Encontro Estratégico de Ciências Farmacêuticas e I Seminário Ibero Americano de P & D de Medicamentos. 2013.**

- *Apresentação de trabalho e palestra*

CAMPELO, N. B., DANTAS, R. L., LEAL, L. H. C., NUNES, L. C. C. **Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil®200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Mikania glomerata* Spreng (asteracea)**, 2013. (Congresso, Apresentação de Trabalho).

CAMPELO, N. B., CARVALHO, I. B., LEAL, L. H. C., DANTAS, R. L., NUNES, L. C. C. **Proposition of laryngoscope and technic of sprinkling for development of emphysema models in rats**, 2013. (Congresso, Apresentação de Trabalho).

DANTAS, R. L., NUNES, L. C. C. **Fotobiomodulação experimental na prevenção de enfisema pulmonar**, 2012. (Outra, Apresentação de Trabalho).

PEREIRA JUNIOR, J. L., DANTAS, R. L., REIS, E. V. S., FONSECA, K. M., CAMPELO, N. B., BESERRA, M. R. S., ALVES, W.S. **Ação do laser de baixa intensidade sobre a produção do muco na inflamação pulmonar**, 2013. (Simpósio, Apresentação de Trabalho).

SOARES, M. R. B. S., DANTAS, R. L. **DPOC: influência da ooforectomia na proteção pulmonar contra o enfisema pulmonar induzido por papaína**, 2013. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

SOARES, M. R. B. S., DANTAS, R. L. **Enfisema pulmonar: uma alternativa ao modelo experimental com cigarro**, 2013. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

ANEXOS

ANEXO A: Declaração de aceite do comitê de ética em experimentação animal, 001/12.



GOVERNO DO ESTADO DO PIAUÍ
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ – UESPI
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Rua Olavo Bilac , 2335 Centro - Fone: (86)3221-6658
CEP 64001-280 Teresina-PI

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do projeto: CEP-UESPI 001/12

Título: “**ESTUDO DA INFLAMAÇÃO PULMONAR EXPERIMENTAL EM RATOS**”.

Pesquisador responsável: **WELLINGTON DOS SANTOS ALVES**

Documentos analisados: **Folha de Rosto, carta de encaminhamento, projeto de pesquisa e bibliografia pertinente.**

Data de entrada: **11 de abril de 2012**

Proposição do(a) Relator(a):

Aprovação

Aprovação com pendências

Não aprovação

Data da primeira análise pelo CEP-UESPI: 24.04.2012

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96, que regulamenta a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Piauí, em **Reunião 05/2012** realizada em 24.04.2012, decidiu **APROVAR**, de acordo com o parecer do(a) relator(a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

Teresina, 25 de abril de 2012

Mauro R. Biá da Silva
Domínio: Ciências Exatas, Tecnologia e Engenharia
Rua Olavo Bilac, 2335 - Centro - Teresina - PI
CEP 64001-280

Prof. Mauro Roberto Biá da Silva

Coordenador do CEP-UESPI

ANEXO B: Declaração de aceite do comitê de ética em experimentação animal, 007/12.



GOVERNO DO ESTADO DO PIAUÍ
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ – UESPI
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Rua Olavo Bilac, 2335 Centro - Fone: (86)3221-6658
CEP 64001-280 Teresina-PI

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do projeto: CEP-UESPI 007/12

Título: "LASER TERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA DO TRATAMENTO DA INFLAMAÇÃO PULMONAR EXPERIMENTAL EM (*Rattus norvegicus*) OCACIONADO PELO USO DA PAPAÍNA".

Pesquisador responsável: **Wellington dos Santos Alves**

Documentos analisados: **Folha de Rosto, carta de encaminhamento, projeto de pesquisa e bibliografia pertinente.**

Data de entrada: **28 de junho de 2012**

Proposição do(a) Relator(a):

- Aprovação**
 Com pendências
 Não aprovação

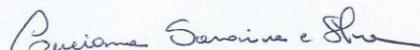
Data da primeira análise pelo CEP-UESPI: 28.07.2012

Data do parecer final do projeto pelo CEP-UESPI: 30.07.2012

PARECER

De acordo com análise ética e em respeito às normas vigentes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), seus princípios éticos e de bem estar animal, o presente projeto de pesquisa apresenta-se **APROVADO**.

Teresina, 30 de julho de 2012


Prof.ª Dr.ª Luciana Saraiva e Silva

Coordenadora do CEP-UESPI
Prof.ª Dr.ª Luciana Saraiva e Silva
Coord. Adjunta CEP/UESPI
Mat.: 179554-6

ANEXO C: Declaração do depósito de pedido de patente submetido ao Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnológica da Universidade Federal do Piauí.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Setor de Convivência L09 e L10
Bairro Ininga CEP: 64049-550 - Teresina-PI Fone/Fax (86)3237-1638

DECLARAÇÃO

Requerente: Rafael Leite Dantas. CPF: 010.670.023-59

Vínculo: Aluno do Programa de Pós-Graduação Nível Mestrado em Ciências Farmacêuticas - UFPI.

Título do Projeto: COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO UM EXTRATO DA MIKANIA GLOMERATA SPRENG. E SEUS COMPOSTOS ISOLADOS TENDO ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E CONTRA O ENFISEMA PULMONAR.

Data de Entrada no NINTEC: 20/02/2014

O Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia – NINTEC -, órgão à Universidade Federal do Piauí, através deste instrumento, declara para as finalidades de direito, a pedido do interessado, que se encontra em nosso poder solicitação para depósito de pedido de PATENTE de autoria do(a) Requerente supra nominado(a) e seu respectivo título, também cima descrito, o(a) qual está em fase de análise dos requisitos necessários à sua formalização junto ao INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

Informamos ainda que para a consecução da postulação pretendida, o objeto deste pleito deve necessariamente atender às seguintes fases:

- a) pré-análise à patenteabilidade da criação;
- b) busca de anterioridade para verificação do estado da técnica;
- c) envio do resultado da busca de anterioridade, juntamente com cópias de pedido já requerido no Brasil e em outros países, bem como orientações para a redação do pedido de patente (AN 127/1997 – INPI);
- d) solicitação de pagamento das taxas de depósito e abertura de processo no Protocolo Geral para depósito de pedido;
- e) apreciação e assinatura da Reitoria da UFPI.
- f) encaminhamento da documentação ao INPI para depósito.

Salientamos ainda que, para cada fase acima descrita, é necessário tempo hábil para as respostas, a fim de cumprir com fidelidade e segurança a pretensão perquerida.

Por ser verdade, firmo a presente.

Teresina (PI), 20 de Fevereiro de 2014.

Prof. Dr^ª-Maria Rita de Moraes Chaves Santos
Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI

RESUMO

Composição farmacêutica compreendendo um extrato da *Mikania glomerata* Spreng. e seus compostos isolados tendo atividade anti-inflamatória e contra o enfisema pulmonar

A presente invenção trata de uma composição farmacêutica compreendendo um extrato seco da planta *Mikania glomerata* Spreng. e seus compostos isolados, visando sua aplicação no tratamento e prevenção de processos inflamatórios do pulmão, destinados principalmente ao tratamento e prevenção do enfisema pulmonar. O extrato seco da planta *Mikania glomerata* Spreng. mostrou-se muito eficiente no tratamento do enfisema induzido por papaína em ratos, uma vez que houve uma diminuição significativa no recrutamento neutrofílico e na contagem total de células. Dessa forma, essa composição pode ser utilizada no desenvolvimento de formulações farmacêuticas para o tratamento e prevenção de processos inflamatórios do pulmão, principalmente no tratamento e prevenção do enfisema pulmonar.

REIVINDICAÇÕES

1. “Composição farmacêutica compreendendo um extrato da *Mikania glomerata* Spreng. e seus compostos isolados tendo atividade anti-inflamatória e contra o enfisema pulmonar”;
2. A composição da reivindicação 1, onde o extrato seco foi obtido por secagem, preferencialmente, em aspensor tipo *spray drier*, podendo ser realizado também por liofilização ou leito fluidizado;
3. A composição da reivindicação 1, em que o gênero *Mikania* compreende o grupo formado por *Mikania laevigata*, *Mikania micrantha*, *Mikania scandens* (L.) Willd, *Mikania glomerata*, *Mikania cordata*, *Mikania stipulacea*, *Mikania hoehnei*, *Mikania vitifolia*, *Mikania rimachii*, *Mikania microptera*, *Mikania hirsutissima*, *Mikania minima*, *Mikania dusenii*, *Mikania ypacarayensis*, *Mikania mendocina*, *Mikania graziellae*, *Mikania periplocifolia*, *Mikania urticifolia*, *Mikania alvimii*, *Mikania triangularis*, *Mikania cordifolia*, *Mikania cynanchifolia*, *Mikania shushunensis*, *Mikania congesta*,

Mikania banisteriae, *Mikania haenkeana*, *Mikania oblongifolia*, *Mikania hookeriana*, *Mikania lindbergii* Baker e *Mikania mongenansis*.

4. A composição da reivindicação 1, onde o extrato vegetal de plantas do gênero *Mikania* pode ser preparado por extração a partir de água, álcool e a mistura desses solventes.

5. A composição da reivindicação 1, onde a referida composição é configurada para ser administrada a um paciente com um veículo farmacologicamente aceitável selecionado a partir do grupo constituído por aditivo, diluente, solvente, filtro, lubrificante, excipiente, aglutinante, estabilizador e suas combinações.

6. A composição da reivindicação 1, onde o tratamento realizado por via sistêmica e/ou local compreende a administração por inalação, via oral, nasal e/ou através de um reservatório.

ANEXO D: Confirmação de submissão do artigo “State of the art of pulmonary emphysema: pathogenic mechanisms, biomarkers and plant extracts via the pulmonary route” à revista Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.

Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada

Todos ▾

[Por Edição](#)
[Por Autor](#)
[Por TI](#)

[Home](#)
[Arquivo](#)
[Submissão](#)
[Corpo Editorial](#)
[Instruções](#)
[Instructions](#)

Home > Usuário > Autor > Submissões > #3457 > Resumo

#3457 Sumário

[RESUMO](#)
[AVALIAÇÃO](#)
[EDIÇÃO](#)

Submissão

Autores	Rafael Leite Dantas, Amanda Freitas Goudinho, Laynne Hellen de Carvalho Leal, Mariana Rodrigues Barros Da Silva Soares, Erik Vinicius de Sousa Reis, Wellington dos Santos Alves, Lívio Cesar Cunha Nunes	
Título	State of the art of pulmonary emphysema: pathogenic mechanisms, biomarkers and plant extracts via the pulmonary route	
Documento Original	3457-12890-2-SM.DOCX 2014-02-26	
Doc. Sup.	Nenhum(a)	INCLUIR DOCUMENTO SUPLEMENTAR
Submetido por	Rafael Leite Dantas 	
Data de submissão	fevereiro 26, 2014 - 02:49	
Seção	Revisão Crítica/Critical Review	
Editor	Nenhum(a) designado(a)	

ANEXO E: Confirmação de submissão do artigo “Animal models of pulmonary emphysema: spraying papain or cigarette smoke?” à revista Brazilian Journal of Medical and Biological Research.



Manuscript #	3943
Current Revision #	0
Submission Date	2014-02-24 14:59:48
Current Stage	Initial QC
Title	Animal models of pulmonary emphysema: spraying papain or cigarette smoke?
Running Title	Animal models of pulmonary emphysema
Manuscript Type	Full Paper
Corresponding Author	Rafael Dantas (Universidade Federal do Piauí)
Contributing Authors	Neylon Campelo , Khetyma Fonseca , Laynê Leal , Vânia Lima , José Pereira Júnior , Erik Reis , Wellington Alves , Lívio Nunes
Abstract	Pulmonary emphysema is a disease with a significant economic and social impact. Nevertheless, we are totally lacking in pharmacologic agents that alter the natural history of the disease and decrease the rate of lung function loss. This lack is due, in great extent, to our limited knowledge of the disease pathogenesis. A way to reverse this scenario is the development and adaptation of animal models of emphysema. In this sense, this research aimed to adapt the papain-induced experimental emphysema model in rats, since its current model uses the instillation of a solution containing the enzyme, which tends to generate changes that are not compatible with the disease. We have proposed a model that is closer to what happens in the development of cigarette smoke-induced emphysema in humans. Therefore, as a comparison, it was used the cigarette smoke-induced experimental emphysema model in rats. We also investigated the influence on the castration on the development of emphysema in rats. Therefore, the study of bronchoalveolar lavage and lung tissue was performed by histological, cell count and X-ray analysis. In the animal model by spraying papain it was found a higher neutrophil recruitment and destruction of the pulmonary parenchyma and a lower goblet cell metaplasia, collagen and mucus deposition than in the animal model by cigarette smoke. Thus, the animal model by spraying papain has proved to be more suitable for the isolated study of emphysema than the model using cigarette smoke. In the radiological and castration effect analysis, no significant differences were found.
Section Editor	Not Assigned
Key Words	Pulmonary Emphysema, Smoke Inhalation Injury, Animal Models, Papain, Histopathology
Subject Areas	Biomedical Sciences/Physiology and Biophysics
Conflict of Interest	No, there is no conflict of interest that I should disclose, having read the above statement.
Publication Charges	RLD