

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE
TRITERPENOS ISOLADOS DE ÓLEO-RESINAS DE *Protium*
paniculatum Engler (Burseraceae)

PATRÍCIA DANIELLE OLIVEIRA DE ALMEIDA

MANAUS
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

PATRÍCIA DANIELLE OLIVEIRA DE ALMEIDA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE
TRITERPENOS ISOLADOS DE ÓLEO-RESINAS DE *Protium*
paniculatum Engler (Burseraceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Bioanálises e Desenvolvimento de Produtos Farmacêuticos, linha de pesquisa: Avaliação da eficácia e segurança de insumos e produtos farmacêuticos e cosméticos.

Orientador: Prof^o Dr^o Emerson Silva Lima

Co-orientadora: Dr^a Ana Paula de Araújo Boleti

MANAUS
2013

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

A447a Almeida, Patrícia Danielle Oliveira de
Avaliação da atividade anti-inflamatória de triterpenos isolados
de óleo-resinas de *Protium paniculatum* Engler (Burseraceae) / Patrícia
Danielle Oliveira de Almeida. - Manaus: UFAM, 2013.
70 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) —
Universidade Federal do Amazonas.
Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Co-Orientadora: Dra. Ana Paula de Araújo Boleti

1. Burserácea - Agentes antiinflamatórios 2. Farmácia I. Lima,
Emerson Silva (Orient.) II. Boleti, Ana Paula de Araújo (Orient.) III.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU (1997): 615.276:582.752.2(043.2)

**“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE TRITERPENOS
ISOLADOS DE ÓLEO-RESINA DE *Protium paniculatum* Engler (Burseraceae)”**

PATRÍCIA DANIELLE OLIVEIRA DE ALMEIDA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração: Bioanálises e Desenvolvimento de Produtos Farmacêuticos, Linha de pesquisa: Avaliação da eficácia e segurança de insumos e produtos farmacêuticos e cosméticos. Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Prof^a. Dra Marne Carvalho de Vasconcelos
Coordenadora PPGCF

Apresentada perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:

Prof. Dr. Emerson Silva Lima – Presidente e Orientador
Universidade Federal do Amazonas

Dra. Ana Paula de Araújo Boleti – Co-orientadora

Prof^a. Dra. Geane Antiques Lourenço – Membro Interno
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a. Dra Raquel Carvalho Montenegro – Membro Externo
Universidade Federal do Pará

Manaus, 28 de fevereiro de 2013

AGRADECIMENTOS

Escrever uma dissertação de Mestrado é uma experiência enriquecedora e de plena superação. Nos modificamos a cada tentativa de buscar respostas às nossas aflições de ‘pesquisador’. Para aqueles que compartilham conosco desse momento, parece uma tarefa interminável e enigmática que só se torna realizável graças a muitas pessoas que participam, direta ou indiretamente, mesmo sem saber realmente o que e para que nos envolvemos em pesquisa. E é a essas pessoas que gostaria de agradecer.

Primeiramente agradecer a Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Ao meu orientador prof Dr. Emerson Silva Lima por acreditar em mim, me mostrar o caminho da ciência e não poupar esforços para a realização deste trabalho.

À minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo. Aos meus pais Walter & Nazaré pelos momentos de plenitude e apoio familiar incondicionais. A vocês, minha eterna gratidão. Aos meus irmãos Wanderson e Júnior pelo incentivo e pela presença embora distante sempre constante em minha vida.

A minha co-orientadora Dra. Ana Paula de Araújo Boleti que sempre esteve do meu lado dando força e apoio.

Aos professores Valdir Florêncio da Veiga Júnior, José Pereira de Moura-Neto, Fernanda Guilhon Simplício pela parceria na realização desse trabalho.

A colega Ellen Suanny Pereira Aranha pela ajuda incondicional em um determinado momento.

A todos os colegas e professores da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo convívio e aprendizado.

E, por fim, a todos aqueles que por um lapso não mencionei, mas que colaboraram para esta pesquisa: abraços fraternos a todos!

Resumo

Protium é o principal gênero pertencente à família Burseraceae e um dos gêneros mais comuns na América do Sul, sendo representativo na flora da Região Amazônica. Na medicina popular, gomas e óleo-resinas de espécies de *Protium* são utilizadas para diversas enfermidades, como tônico e estimulante, para o tratamento de ulcerações e inflamações. O presente trabalho teve como objetivo investigar a atividade antiinflamatória dos compostos triterpênicos isolados de óleo-resina de *Protium paniculatum* Engler (Burseraceae). Foi avaliado o potencial citotóxico dos triterpenos pentacíclicos na linhagem de macrófagos murinos J774 pelo método Alamar Blue. As células foram tratadas com os triterpenóides e estimuladas com LPS após 24 horas e o sobrenadante celular foi coletado para avaliação da produção de óxido nítrico (NO[•]) pela reação de Griess, e das citocinas (TNF- α , IL-6, IL-10 e IFN- γ) por citometria de fluxo. A atividade antiinflamatória do triterpeno $\alpha\beta$ -amirona foi evidenciada pela expressão da COX-2 pelo método de western blotting e no edema de pata em ratos induzido por carragenina. Na avaliação da citotoxicidade foi observado que os triterpenos pentacíclicos $\alpha\beta$ -amirina, $\alpha\beta$ -amirina acetilada, $\alpha\beta$ -amirona e breína/maniladiol não alteraram a viabilidade de macrófagos murino J774 (CI₅₀ > 20 μ g/mL), com exceção do triterpeno breína/maniladiol que apresentou atividade citotóxica moderada. Analisando os efeitos sobre a produção de mediadores inflamatórios, foi observado que os compostos triterpênicos na concentração de 10 μ g/mL inibiram acima de 80% a produção de NO[•], embora apenas os triterpenos α,β -amirina tenham apresentado a capacidade de inibir a produção de TNF- α (52,03 \pm 2,4%), todos os compostos triterpênicos analisados inibiram a produção de IL-6 e induziram a produção de IL-10 em macrófagos murino J774 estimulados por LPS. O triterpeno $\alpha\beta$ -amirona inibiu a expressão de COX-2, da mesma forma em que inibiu a formação do edema de pata em ratos induzido por carragenina. Este estudo pode fornecer uma base para investigações futuras sobre o papel terapêutico da α,β -amirona no tratamento da inflamação.

Palavras-chave: triterpenóides; inflamação; macrófagos, protium, amirona

ABSTRACT

Protium is the main genus of the Burseraceae family and one of the most common genera in South America, being representative of the flora of the Amazon region. In folk medicine, gums and oil-resins *Protium* species are used for various diseases, as a tonic and stimulating, for the treatment of ulcers and inflammation. The present study aimed to investigate the anti-inflammatory activity of triterpene compounds isolated from the oil-resin of *Protium paniculatum* Engler (Burseraceae). We evaluated the cytotoxic potential of pentacyclic triterpenes in murine J774 macrophage lines by Alamar Blue method. Cells were treated with triterpenoids and stimulated with LPS after 24 hours and the cell supernatant was collected for evaluation of nitric oxide (NO[•]) by Griess reaction and cytokines (TNF- α , IL-6, IL-10 and IFN- γ) by flow cytometry. In the assessment of cytotoxicity it was observed that triterpenes pentacyclic $\alpha\beta$ -amyrin, $\alpha\beta$ -amyrin acetylated, $\alpha\beta$ -amyrone and brein/maniladiol did not alter the viability of murine J774 macrophages (IC₅₀ > 20 μ g/mL), with the exception of triterpene brein/maniladiol which showed moderate cytotoxic activity. Analyzing the effects on the production of inflammatory mediators, it was observed that the triterpene compounds at 10 μ g/mL inhibited more than 80% production of NO[•], although only $\alpha\beta$ -amyrin was able to inhibit the production of TNF- α (52.03 \pm 2.4%). All analyzed triterpene compounds inhibited the production of IL-6 and induced the production of IL-10 in murine J774 macrophages stimulated by LPS. The triterpene $\alpha\beta$ -amyrone inhibited the expression of COX-2 in the same way that inhibited the formation of paw edema in rats induced by carrageenan, producing a quick and immediate effect. This study may provide a basis for future investigations on the therapeutic role of α , β -amirone in treating inflammation.

Keywords: triterpenes; inflammation; macrophages, *protium*, amyrone

Lista de Siglas

TRL4	Receptor toll-like tipo 4
CD14	Receptor CD14
MD2	Proteína extracelular do tipo MD2
NF-κB	Fator nuclear kappa beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
PGE₂	Prostaglandina E ₂
FOA₂	Fosfolipase A ₂
AA	Ácido aracdônico
LOX	Lipoxigenase
CIO	Ácido hipocloroso
COX-1	Ciclooxigenase – 1
COX-2	Ciclooxigenase – 2
ROS	Espécies reativas de oxigênio
LT	Leucotrienos
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
NO[•]	Óxido nítrico
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL1-β	Interleucina 1 beta
ROI	Intermediários reativos do oxigênio
RNI	Intermediários reativos do nitrogênio
Cl⁻	Íons cloreto
LPS	Lipopolissacarídeo
MPO	Mieloperoxidade
NO₃⁻	Nitrato
NO₂⁻	Nitrito
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
PGE₂	Prostaglandina E ₂
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil Sulfato de Sódio

SUMÁRIO

1. Introdução	10
2. Revisão da Literatura	13
2.1 Inflamação	13
2.2 Mediadores da Inflamação	14
2.3 Estudo do processo inflamatório baseado em modelos experimentais	18
2.4 O uso de plantas com propriedades antiinflamatórias	23
2.5 Estudos de plantas pertencentes ao gênero <i>Protium</i>	23
3. Objetivos	29
4. Materiais e métodos	30
4.1 Matéria-prima vegetal	30
4.2 Procedimentos em cultura e manutenção de células	30
4.3 Ensaio em cultura de células	31
4.3.1 Ensaio de viabilidade celular	31
4.3.2 Inibição da ativação de macrófagos por LPS	32
4.3.3 Quantificação de nitrito	32
4.3.4 Quantificação de TNF- α , IL-6, IL-10 e IFN- γ em sobrenadantes de cultura de células J774	33
4.3.5 Ensaio de avaliação da expressão de proteínas	33
4.4 Avaliação da atividade antiinflamatória de compostos triterpenóides <i>in vivo</i>	35
4.4.1 Animais	35
4.4.2 Administração das drogas	36
4.4.3 Edema de pata induzido por carragenina	36
4.5 Análise estatística	37
5. Resultados e Discussão	38
5.1 Efeito dos compostos triterpênicos sobre a viabilidade celular de macrófagos J774	39
5.2 Efeito dos compostos triterpênicos sobre a produção de NO \cdot	42
5.3 Efeito dos compostos triterpênicos sobre a produção de citocinas	45
5.4 Efeito de α,β -amirona sobre a expressão de COX-2	52
5.5 Efeito do triterpeno α,β -amirona no edema de pata induzido por carragenina	56
6. Conclusões	59
7. Referências Bibliográficas	60

1. Introdução

As plantas medicinais têm sido utilizadas tradicionalmente para o tratamento de várias enfermidades. Além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído ao longo dos anos para a obtenção de vários fármacos (SILVA; CARVALHO, 2004; CALIXTO, 2000). O potencial das plantas como fonte de novas drogas ainda oferece grande campo para investigação científica, das milhares de espécies conhecidas, uma pequena porcentagem já foi investigada fitoquimicamente e apenas uma fração destas já foram avaliadas quanto ao potencial farmacológico (RATES, 2001). Na última década, registrou-se um aumento expressivo no interesse em substâncias derivadas de espécies vegetais, evidenciado pelo crescimento de publicações dessa linha de pesquisa nas principais revistas científicas das áreas de química e farmacologia (CALIXTO, 2000).

Grande parte das plantas nativas brasileiras ainda não tem estudos para permitir a elaboração de monografias completas e modernas. Muitas espécies são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança, o que demonstra que em um país como o Brasil, com enorme biodiversidade, existe uma enorme lacuna entre a oferta de plantas e poucas pesquisas. Desta forma, considera-se este um fator de grande incentivo ao estudo com plantas, visando sua utilização como fonte de recursos terapêuticos, visto que o reino vegetal representa um vasto celeiro de moléculas a serem descobertas (FOGLIO *et al.*, 2006). Como parte de vários projetos desenvolvidos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e em parceria com outras instituições de pesquisa na área de química e atividade biológica, têm sido investigadas algumas plantas da flora brasileira usadas na medicina popular.

O processo inflamatório é fundamentalmente um mecanismo de proteção, com a função de livrar o organismo de agentes que causam danos em células e tecidos, além de remover restos celulares que foram danificados em consequência de uma injúria. No entanto, os processos de inflamação e reparo podem ser potencialmente danosos ao organismo quando sua intensidade ou duração ultrapassam o suficiente e necessário para conter o agente agressor (RANKIN, 2004). Por esta razão muitas drogas com a capacidade de interferir no processo inflamatório, atenuando sua intensidade ou reduzindo seu tempo de duração, são objeto de interesse e pesquisa (SOLEDADE, 2008).

O gênero *Protium* está amplamente distribuído na América do Sul e estima-se que mais de 80% das espécies da família Burseraceae pertencente a este gênero são encontradas na Região Amazônica (KHALID, 1983; SIANI *et al.*, 1999; SIANI *et al.*, 2004;). As óleo-resinas produzidas pelas espécies do gênero *Protium* são popularmente conhecidas nesta região como “breus”. Na medicina popular, são utilizadas para diversas enfermidades, como tônico e estimulante, para o tratamento de ulcerações e inflamações (SIANI *et al.*, 1999; SIANI *et al.*, 2004). Também existem relatos populares de usos como expectorante e cicatrizante (BANDEIRA *et al.*, 2002) e como incensos em rituais religiosos (MAIA *et al.*, 2000).

A espécie *Protium heptaphyllum* é a mais estudada e existem diversos relatos na literatura sobre estudos fitoquímicos e farmacológicos desta espécie. A partir da resina de *Protium heptaphyllum*, misturas binárias de triterpenos já foram isoladas e caracterizadas sendo o constituinte majoritário a mistura de α,β -amirina (MAIA *et al.*, 2000; SUSUNAGA *et al.*, 2001). Este composto tem sido descrito como possuidor de propriedades antimicrobianas, antiinflamatórias, antinociceptivas, ansiolítica e antidepressiva, e gastroprotetoras (KATERERE *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005; ARAGAO *et al.*, 2006; LIMA-JUNIOR *et al.*, 2006).

Vários são os estudos que mostram os efeitos farmacológicos dos exsudatos resinosos (resina) coletado de diferentes espécies de *Protium sp.* Estes efeitos têm sido atribuídos especificamente pela presença dos triterpenóides pentacíclicos $\alpha\beta$ -amirina, maniladiol e breína (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Dentre estes, a ação antiinflamatória de $\alpha\beta$ -amirina tem sido comprovada em diferentes modelos de inflamação *in vivo*. Com base nesses dados, foram isolados de óleo resinas extraídos de *Protium paniculatum* misturas dos triterpenos breína/maniladiol e $\alpha\beta$ -amirina. A partir do triterpeno $\alpha\beta$ -amirina foram obtidos os derivados sintéticos $\alpha\beta$ -amirina-acetilada e $\alpha\beta$ -amirona. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antiinflamatória dos triterpenóides naturais e sintéticos que foram isolados, considerando que de acordo com a literatura são poucos os estudos que mostram uma possível atividade biológica.

2. Revisão da Literatura

2.1 Inflamação

A inflamação é uma resposta localizada e altamente regulada que o organismo dispõe para localizar, neutralizar e eliminar um agente agressor, assim como reparar os danos causados e promover a cicatrização (PAVLOV; TRACEY, 2006). Desta forma, a inflamação pode ser caracterizada pelo conjunto de fenômenos bioquímicos, morfológicos e fisiológicos, sucessivos, ativos e complexos, pelos quais se exterioriza a reação vascular e tissular dos tecidos vivos a qualquer agressão, promovendo alterações no sistema vascular, nos componentes líquidos e celulares, visando destruir, diluir ou isolar o agente lesivo (ADER *et al.*, 2006).

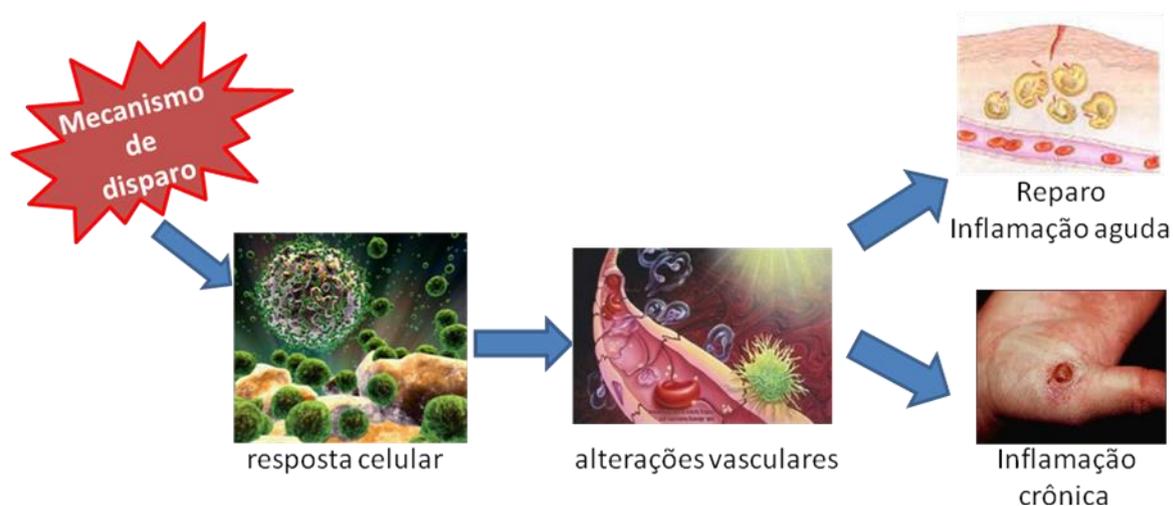


Figura 1: Etapas do processo inflamatório – O processo inflamatório pode ser iniciado por mecanismos de disparo como: fatores imunológicos, biomecânicos e físicos. Estes induzem a uma resposta celular como: ativação de receptores, formação de espécies reativas de oxigênio, liberação de mediadores inflamatórios que levarão a alterações microvasculares como: sequestro de leucócitos nos capilares, redução da taxa de perfusão tecidual, adesão / rolamento e migração de leucócitos por meio de quimiotaxia. Simultaneamente ocorre síntese de fatores de crescimento, angiogênese e formação de tecido (cicatrização e remodelação). Este processo pode levar minutos, horas, dias e semanas, caracterizando desta forma a inflamação aguda. Caso o agente agressor ou os fatores envolvidos no processo não sejam eliminados, a inflamação pode evoluir para uma inflamação crônica.

FONTE: adaptado pelo autor

Os mecanismos dos processos inflamatórios no corpo humano são extremamente complicados e não podem ser atribuídos a um único mediador ou fator (SÜLEYMAN *et al.*, 2004). Desta forma a inflamação pode ser mais apropriadamente chamada de cascata inflamatória (SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

A inflamação é caracterizada como aguda e crônica, como mostra a figura 1. A forma aguda se caracteriza por ter uma curta duração (minutos, horas ou até duas semanas), ter predomínio de neutrófilos e exibir fenômenos vasculares e exsudativos intensos. A de feição crônica possui longa duração (além de duas semanas), é mais específica, suas principais células são os linfócitos, plasmócitos e macrófagos e exibe fenômenos mais destrutivos e regenerativos do que o processo agudo (BRUNETTI *et al.*, 2007).

2.2 Mediadores da inflamação

A exposição das células a agentes patogênicos ou a estímulos mecânicos, químicos e físicos resulta na ativação, produção e liberação de diversos mediadores responsáveis pelas características da área inflamada (COUTINHO *et al.*, 2009).

A detecção de um agente patogênico está associada a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Estas são moléculas associadas a grupos de agentes patogênicos que uma vez reconhecidos por células do sistema imune inato ativam uma resposta inflamatória. O lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias é considerado um exemplo típico de PAMP. Esta molécula constitui o principal componente encontrado na membrana externa das bactérias Gram-negativas e que contribui em grande parte para a sua integridade estrutural. Como PAMP este liga-se ao complexo de receptores CD14/TLR4/MD2 ativando a via de sinalização do TLR4 que por sua vez estimula

através da ativação da via do NF- κ B, a expressão de citocinas pró-inflamatórias em muitos tipos de células, especialmente em macrófagos (MEDZHITOV, 2007). Durante a última década, o papel do fator de transcrição NF- κ B na atividade inflamatória tem sido extensivamente investigado. Sendo atualmente considerado peça fundamental na gênese da inflamação e no processo de proliferação, desenvolvimento e apoptose celular (HAYDEN; GHOSH, 2008).

Com a ativação da via do NF- κ B desencadeia-se uma resposta inflamatória que é regra geral caracterizada pela expressão de mediadores pró-inflamatórios como citocinas ou interleucinas (IL), como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), ou a IL-1 β , moléculas de adesão, mediadores vasoativos, espécies reativas de oxigênio, entre outros (PAVLOV; TRACEY, 2006). Os produtos dos genes regulados pelo NF- κ B geram um efeito cíclico, pois, além de serem ativados pelo NF- κ B, eles também o ativam em outras células após se ligarem a receptores específicos, perpetuando a resposta inflamatória (DUNDER, 2009). Enzimas inflamatórias como a ciclooxigenase – 2 indutiva (COX-2) e a óxido nítrico sintase (INOS) também são reguladas pelo NF- κ B (HAYDEN; GHOSH, 2008), como mostra a figura 2.

Nos processos inflamatórios agudos diferentes leucócitos migram para os tecidos a diferentes tempos da resposta inflamatória. Regra geral, os neutrófilos são os primeiros leucócitos a migrar para o local da infecção permanecendo durante 6 a 24 horas. A sua função centra-se na destruição e eliminação de agentes patogênicos. Por fim, e como resultado do seu processo de ativação, entram em apoptose e promovem subsequentemente a entrada de monócitos que se diferenciam em macrófagos. Com o infiltrado de macrófagos ocorre liberação de espécies reativas de oxigênio e de mediadores pró-inflamatórios como as prostaglandinas (PGE₂), a bradicinina e a histamina. No começo da cascata inflamatória encontram-se as fosfolipases A₂ (FOA₂), enzimas da família das catalases com capacidade de hidrolisar fosfolipídios de

membrana. As FOA₂ produzem ácidos de cadeia livre, em particular o ácido aracdônico (AA) (YEDGAR *et al.*, 2006).

O AA, por sua vez, apresenta papel fundamental na inflamação, pois pode ser metabolizado pelas enzimas ciclooxigenase (COX-1 constitutiva, COX-2 indutiva) e lipoxigenase (15-LOX e 5-LOX), por vias diferentes, originando eicosanóides distintos como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. Estas substâncias estão relacionadas aos processos patológicos de inflamação. A PGE₂ é essencial para o controle do fluxo sanguíneo e dilatação das veias (LEVY *et al.*, 2001).

Outra via importante na produção de eicosanóides é a via das 5-LOX, que convertem o AA em leucotrienos (LT). O papel principal dos LT na inflamação é de estimular a infiltração de neutrófilos e leucócitos pelas células endoteliais, amplificando a entrada de células no tecido lesionado (CLARKSON *et al.*, 1998).

Com a infiltração celular ocorre a liberação de óxido nítrico (NO^{*}) induzido pela oxido nítrico sintetase (iNOS). A iNOS é ativada por vários estímulos imunológicos que levam à produção de grandes quantidades de NO, com atividade citotóxica contribuindo na inflamação aguda ou crônica (POKHAREL *et al.*, 2006). Outra substância presente nos neutrófilos é a mieloperoxidases (MPO), uma enzima pertencente à superfamília das peroxidase, presente nos grânulos azurófilos de leucócitos polimorfonucleares (PMNs, neutrófilos), catalisa a reação $H_2O_2 + Cl^- \rightarrow H_2O + ClO$, originando espécies reativas de oxigênio (ROS). Os produtos gerados são bactericidas e, se liberados no tecido local ou na circulação sistêmica, podem induzir o estresse oxidativo, com variável grau de citotoxicidade (SCHWARZ *et al.*, 2012; EIVAZI-ZIAEI; DASTGARI, 2004; NAUSEEF, 2007).

Como resultado final do processo inflamatório a interação em conjunto de vários mediadores, conforme mostrado na figura 2, geram modificações morfológicas e

funcionais caracterizadas pelo eritema, rubor, edema, dor ocorrendo perda de função celular ou estrutural (ALENCAR *et al.*, 2005; BALBINO *et al.*, 2005).

O restabelecimento da homeostasia nem sempre ocorre. Uma resposta inflamatória insuficiente pode resultar no aumento de susceptibilidade para infecções e câncer. Por outro lado, uma resposta excessiva está associada a doenças inflamatórias crônicas e autoimunes (LAWRENCE T., GILROY, 2007).

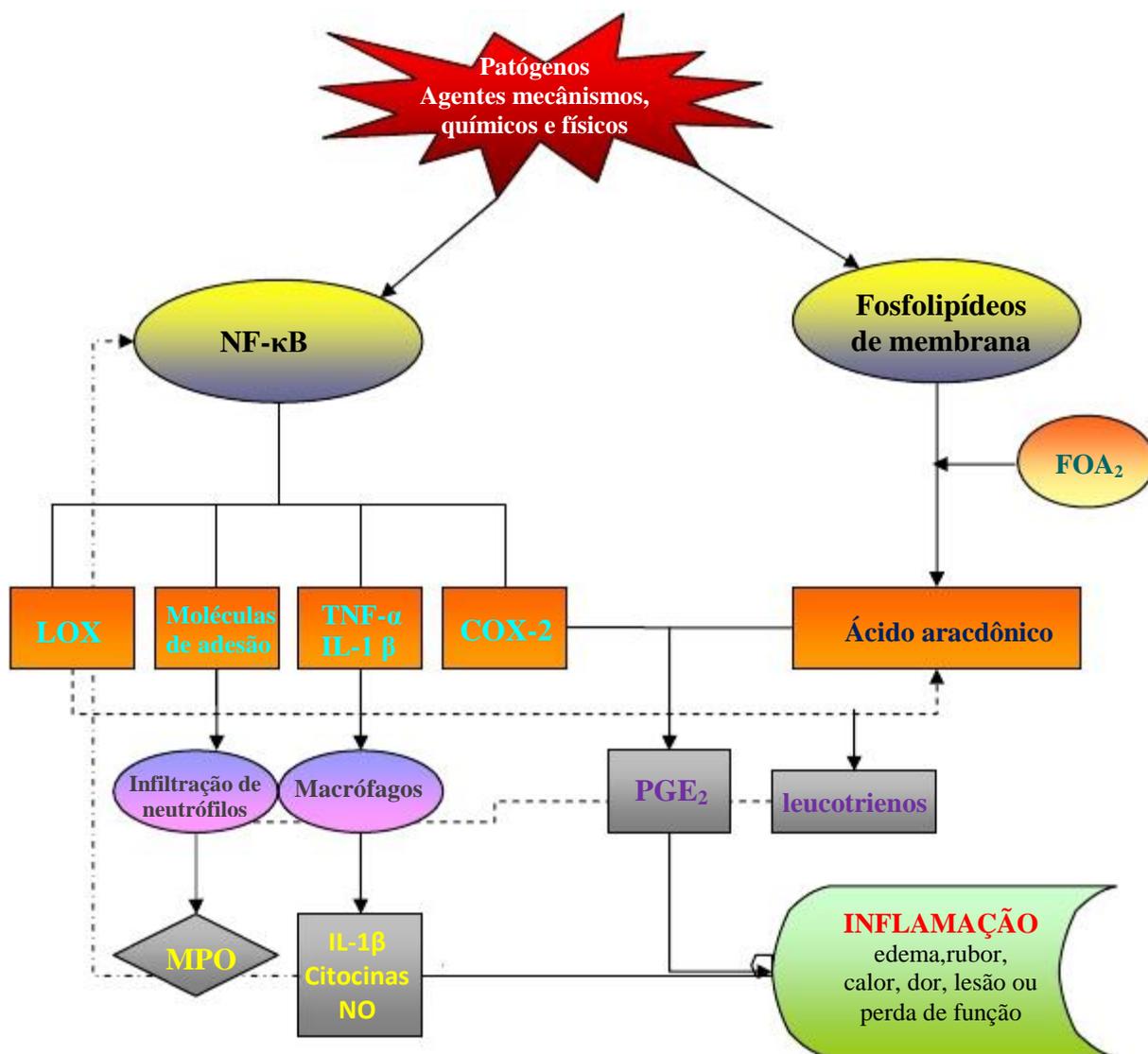


Figura 2: Fluxograma dos Mediadores da Inflamação

Fonte: adaptado de DUNDER, 2006.

2.3 Estudo do processo inflamatório baseado em modelos experimentais

A evolução no entendimento dos aspectos moleculares da fisiopatologia da inflamação favoreceu o estabelecimento de novos sistemas de testes *in vitro* para a seleção de diversas substâncias que permitem a identificação de novos compostos antiinflamatórios (CARVALHO, 2004). Existem vários ensaios *in vitro* que são utilizados para testar a atividade antiinflamatória, porém o procedimento de triagem mais comum é a verificação da inibição da COX e/ou da 5-LOX.

Extratos ou compostos isolados de várias plantas utilizadas na medicina tradicional demonstraram promover a inibição da COX e/ou 5-LOX, como a *Clematis spp.*, *Bacopa monniera*, *Lonicera japonica*, *Terminalia chebula*, *Platycladus orientalis* (LI *et al.*, 2006; VIJI; HELEN, 2008; LEE *et al.*, 2009; REDDY *et al.*, 2009; FAN *et al.*, 2012).

Outras plantas ou compostos isolados revertem o processo inflamatório por atuarem em outros alvos como, por exemplo, a quercetina e kaempferol, dois flavonóis amplamente distribuídos pelo reino vegetal apresentaram significativa ação antiinflamatória, que pode ser atribuída à inibição das enzimas fosfolipase A2, lipoxigenase, ciclooxigenase e inibição da produção de óxido nítrico, através da modulação da enzima iNOS (YOON; BAEK, 2005; SANTANGELO *et al.*, 2007; COUTINHO *et al.*, 2009).

Outros modelos *in vitro* de inflamação consistem geralmente de estimulação de células isoladas com respectivos agentes patogênicos. Na prática, os macrófagos são as células mais estudadas nesse tipo de modelo experimental. Considerando a grande heterogeneidade entre diferentes populações de macrófagos, é essencial investigar macrófagos específicos de acordo com o sítio de inflamação. O isolamento de macrófagos peritoneais em animais de laboratório é um procedimento relativamente

simples, onde quase 100% de células isoladas são macrófagos que podem então ser colocados em placas para permitir sua aderência antes do processamento adicional, este procedimento é conhecido como cultura primária. Sua principal desvantagem é o baixo rendimento, que quase invariavelmente requer um grande número de animais para obter um número suficiente de células. Uma alternativa notável para este procedimento são linhagens celulares disponíveis comercialmente, cujas características se assemelham com as encontradas nas células primárias. Muitos grupos fazem uso de linhagens de macrófagos, incluindo as de origem murina, tais como células RAW 264.7 e J774, ou de origem humana como U937 ou Mono-Mac1 (KNAPP, 2009).

A linhagem J774 é uma linhagem celular de macrófagos murino estabelecida a partir de um tumor que surgiu numa fêmea de rato BALB/c. O seu crescimento é inibido por sulfato de dextrano, derivados de proteínas, e lipopolissacarídeos bacterianos purificados. As células J774 têm sido usadas para numerosos estudos bioquímicos voltados para a compreensão da fisiologia de monócitos-macrófagos. Esta linhagem sintetiza grandes quantidades de lisozima e exibe menor citólise, mas predominantemente fagocitose dependente de anticorpos. As células têm mostrado expressar o receptor de células ligadas para imunoglobulina e complemento. Quando estimuladas por $\text{INF-}\gamma$ ou com baixas concentrações de lipopolissacarídeos bacterianos, estas células expressam níveis elevados da enzima óxido nítrico sintetase, produzindo grandes quantidades de óxido nítrico (LAM *et al*, 2009).

Como já mencionado anteriormente, o ensaio de ativação de macrófagos é baseado pela exposição da célula a um determinado agente patogêncio, geralmente utilizado o lipopolissacarídeo (LPS). Nesse processo o macrófago modifica para seu estado ativado, o qual é caracterizado por sofrer mudanças bioquímicas e alterações na expressão de genes, por estímulos inflamatórios sucessivos à membrana macrofágica; alterando suas propriedades de locomoção, aderência, fagocitose e de síntese de

enzimas e substâncias antimicrobianas, citotóxicas, pró-inflamatórias, vasodilatadoras e imunomoduladoras (SELIGMANN, 2003).

Em resposta à ativação por mediadores inflamatórios, os macrófagos aumentam o seu conteúdo enzimático e a secreção de produtos biologicamente ativos no meio extracelular, liberando mais de 100 compostos; entre os numerosos produtos secretados, além de várias citocinas, estão também compostos inorgânicos com alto grau de reatividade química como os intermediários reativos do oxigênio (ROS), incluindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do nitrogênio (RNS), incluindo o óxido nítrico (NO) (FRIEDL *et al.*, 2004). Desta forma extratos ou compostos isolados de plantas podem ser testados quanto a sua capacidade em inibir a ativação de macrófagos e conseqüentemente inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, sendo as mais estudadas TNF- α , IL-1 β e IL-6.

Além disso, os macrófagos ativados sintetizam nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), formas estáveis oxidadas do NO, cuja produção reflete o grau de inflamação, e conseqüentemente indica uma medida dos efeitos de drogas na terapia antiinflamatória (MARQUES, 2006).

Vários pesquisadores têm utilizado esse modelo para avaliação de extratos ou compostos isolados de plantas, como por exemplo podemos citar o trabalho realizado por Abdelwahab e seus colaboradores (2012) no qual avaliaram a atividade antiinflamatória da columbina, uma furanolactona diterpenóide, isolada pela primeira vez a partir de planta da espécie *Tinspora bakis*, observaram que este composto foi capaz de inibir a produção de NO na linhagem RAW 264.7 estimulada com LPS-interferon- γ , sem afetar a viabilidade celular.

Modelos *in vivo* de inflamação são definitivamente as melhores ferramentas para estudar o papel biológico, porque nenhuma outra abordagem permitirá a

investigação simultânea de células e mediadores que interagem durante o processo inflamatório. Além disso, a disponibilidade de números crescentes de estirpes de ratos transgênicos permite a determinação da contribuição *in vivo* de moléculas selecionadas para defesa do hospedeiro. A geração de ratos quiméricos usando transplante de medula óssea permite aos investigadores delinear o papel distinto de células derivadas da medula óssea. Além disso, camundongos knock-out podem ser utilizados para compreender a função específica de receptores dentro de populações celulares selecionadas (KNAPP, 2009).

Uma das técnicas mais comumente utilizadas para avaliar a atividade de fármacos antiinflamatórios estão baseada na habilidade de inibir o edema produzido na pata traseira de rato por injeção de um agente flogístico. Os materiais flogísticos mais frequentemente utilizados são carragenina, formalina, dextrano, albumina de ovo e lêvedo de cerveja (LE BARS *et al.*, 2001).

O uso da carragenina como agente flogístico apresenta inúmeras vantagens, como eficácia em níveis não tóxicos, baixa variabilidade e produção de uma curva dose-resposta com fármacos de conhecida eficácia terapêutica, sendo o modelo de edema de pata considerado um modelo padrão para ensaios de determinação da atividade de fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (VAJJA *et al.*, 2004).

Por fim, modelos de estudos baseados na modelagem matemática de sistemas complexos estão emergindo como uma abordagem pela qual se domina o aparentemente imprevisível comportamento dos fenômenos biológicos buscando o entendimento das interações conhecidas e desconhecidas entre as diferentes vias biológicas. Um modelo matemático que capta as interações dinâmicas entre os vários componentes-chave da resposta inflamatória aguda pode fornecer novas percepções com conseqüências globais envolvendo (1) resultados sobre diferentes condições iniciais, (2) manipular os

componentes individuais de inflamação, e de (3) modulação de vários componentes da inflamação simultaneamente ou em sequência (VODOVOTZ *et al.*, 2006).

Os modelos denominados *in silico* de simulação estão cada vez mais reconhecidos como instrumentos valiosos, que são principalmente utilizados para o desenvolvimento de drogas. Mais recentemente, essa abordagem foi progressivamente adotada para estudar processos imunológicos, incluindo a resposta inflamatória ao patógeno associado a moléculas (KNAPP, 2009).

A seguir a tabela 1, mostra uma comparação entre diferentes aspectos dos modelos experimentais utilizados para o estudo da inflamação.

Tabela 1: Comparação entre modelos experimentais de inflamação

Modelos <i>in vitro</i>	Modelos <i>in vivo</i>	Modelos <i>in silico</i>
Vantagens		
<ul style="list-style-type: none"> - Fornece informações sobre o papel das células selecionadas - Resultados reprodutíveis - Independente de instalações para animais - Custo efetivo baixo 	<ul style="list-style-type: none"> - Método muito reprodutível - Confiável (imita a doença clínica) - Disponibilidade de animais transgênicos 	<ul style="list-style-type: none"> - Efeitos de drogas em modelagem de vias de resposta inflamatória.
Desvantagens		
<ul style="list-style-type: none"> - Não reflete a complexa situação <i>in vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Necessário instalação para animais - Custos mais elevados - Requer perícia pelos investigadores 	<ul style="list-style-type: none"> - Validade do modelo depende de mecanismos já conhecidos
Melhor uso		
<ul style="list-style-type: none"> - Delinear achados de células específicas -High-throughput screening 	<ul style="list-style-type: none"> - Entender o significado biológico - Testar drogas <i>in vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Previsão de efeitos de drogas e efeitos adversos

Fonte: KNAPP, 2009.

2.4 O uso de plantas com propriedades antiinflamatórias

Com base nos acontecimentos moleculares que levam à inflamação, alguns trabalhos sugerem que o processo inflamatório que acompanha doenças crônicas pode ser melhorado e possivelmente até mesmo impedido pelo uso de fitoterápicos. A origem das propriedades anti-inflamatórias dos vários fitomedicamentos, pode ser explicada pela presença de substâncias como fitoestrogênios, flavonóides, fitoesterol, ácido ascórbico, tocoferol, cumarina, genisteína, que agem como inibidores dos alvos moleculares e de mediadores pró-inflamatórios em respostas inflamatórias (IWALEWA *et al.*, 2007).

Triterpenóides de diferentes grupos estruturais foram estudados e descritos como agentes antiinflamatórios e imunomoduladores através da sua capacidade de inibir tanto os fatores de transcrição implicados nestes processos, como os mediadores produzidos pela sua ativação. Um exemplo é o triterpenóide celastrol extraído da espécie *Celastrus orbiculatus*, e a pristimerina seu derivado análogo, têm sido estudados como inibidores do fator de transcrição NF- κ B. Celastrol impede não só a expressão do iNOS e TNF- α , mas também a produção de NO e TNF- α em linhagem de macrófagos RAW 264.7 estimulada com LPS (RIOS, 2010).

Da mesma forma, vários relatos da literatura têm mostrado a eficácia de α,β -amirina, principal componente da resina de plantas do gênero *Protium* em estudos com modelos de inflamação (MEDEIROS *et al.*, 2007).

2.5 Estudo de plantas pertencentes ao gênero *Protium*

A família Burseraceae é composta por 21 gêneros distribuídos em três tribos: Bowellieae (8 gêneros), Canarieae (9 gêneros) e Protieae (4 gêneros) (KHALID, 1983)

e possui aproximadamente 800 espécies espalhadas por regiões tropicais e subtropicais do planeta (BANDEIRA *et al.*, 2002).

A tribo Protieae está distribuída em três gêneros: *Garuga*, *Tetragastris* e *Protium* (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Este último, que possui aproximadamente 135 espécies, é o principal e mais importante gênero da família. O gênero *Protium* está amplamente distribuído na América do Sul e estima-se que mais de 80% das espécies da família Burseraceae encontradas na região Amazônica pertencem a este gênero (SIANI *et al.*, 1999; SIANI *et al.*, 2004; KHALID, 1983).

Todas as espécies de *Protium* exsudam por incisão do tronco um óleo-resina de tom branco-esverdeado e de aroma agradável, que endurece quando em contato com o ar, denominado de almécega, resina de almécega, breu-branco e breu burceráceas. É um tipo de incenso usado na indústria de perfumaria, farmacêutica e de defumadores místicos. Seu sabor é distintamente pungente, mesmo quando velha e seca, é de odor característico e bem mais forte quando queimado. Suas propriedades são similares aos seus análogos “frankincenso” ou “olibanum” da Índia e África, obtidos de árvores da mesma família (PARNET, 1972).

Quimicamente, a resina é formada por uma mistura natural de 30% de protamirina, 25% de protelemicica e 37,5% de proteleresina (SCHULTES; RAFFAUF, 1990), constituídas de triterpenos, principalmente das séries oleano, ursano e eufano, com óleo essencial rico em compostos mono e sesquiterpênicos, semelhante ao encontrado em suas folhas (CRAVEIRO *et al.*, 1981).

A resina coletada do seu tronco é um agente curativo eficaz, dotado de propriedades analgésicas e antiinflamatórias (SIANI *et al.*, 1999). O principal componente desta resina é um triterpeno pentacíclico, denominado α e β -amirina (uma mistura isomérica), os quais juntos correspondem a 45,3% da constituição química da resina, seguido pela mistura de breína e maniladiol, que respondem por 9,5% (VIEIRA

et al., 2005), conforme mostra a figura 3. Os compostos $\alpha\beta$ -amirona foram obtidos pela oxidação da $\alpha\beta$ -amirina por meio de síntese química.

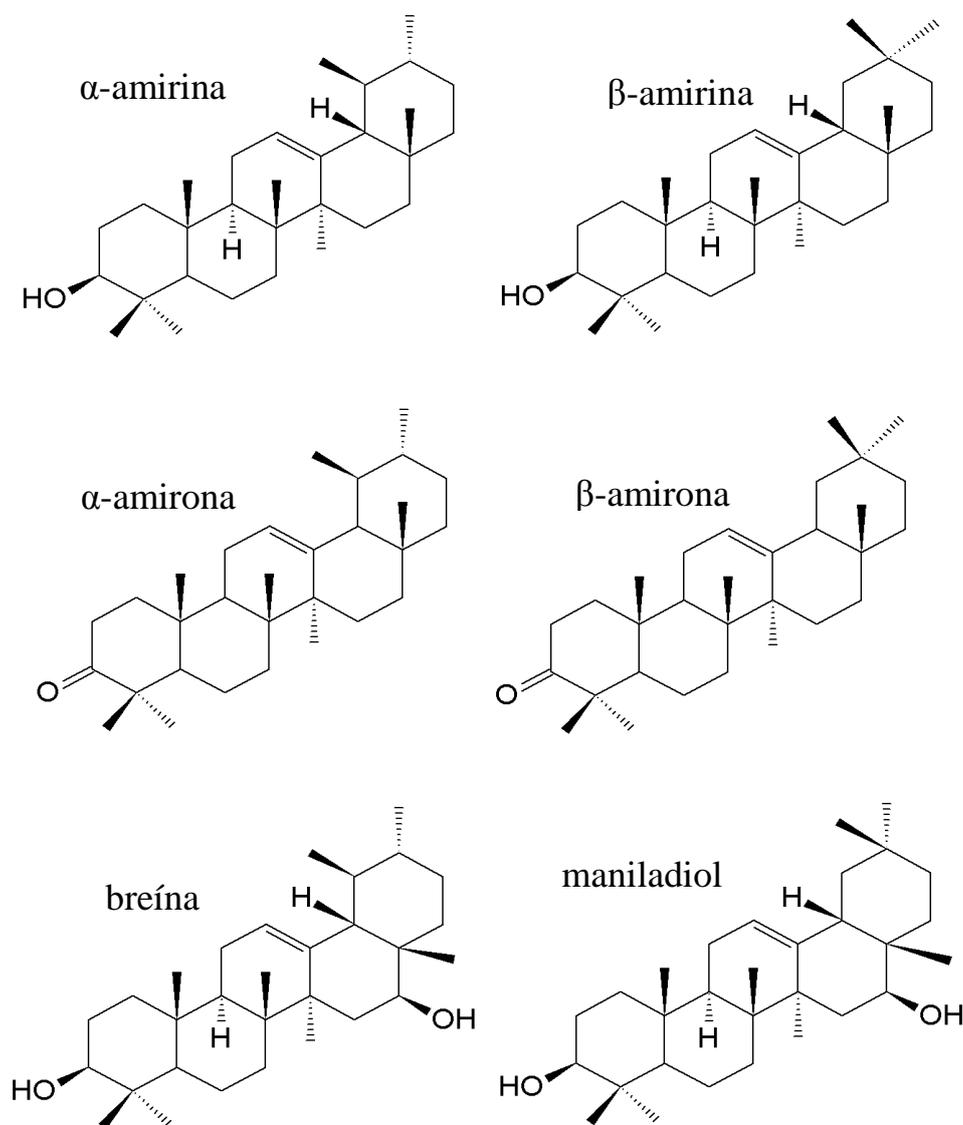


Figura 3: Estrutura dos principais constituintes da resina de *Protium* spp.

Com base em pesquisa bibliográfica a amirina foi descrita contendo várias atividades farmacológicas, conforme mostra a tabela 2, o qual resume as principais publicações envolvendo plantas desse gênero.

Tabela 2 - Atividades farmacológicas de plantas do gênero *Protium*

Espécie	Tipo de estudo	Resultados	Referências
Espécies do gênero <i>Protium</i> .	- Seleção de espécies vegetais para atividades antiparasitárias	- Participação de metabólitos secundários da classe dos diterpenos como os possíveis responsáveis por essas atividades.	FOURNET <i>et al.</i> , 1992 DEHARO <i>et al.</i> , 2001 WENIGER <i>et al.</i> , 2001 SANCHEZ <i>et al.</i> , 2006
<i>Protium kleinii</i>	- Avaliação da atividade antinociceptiva.	- Isolamento do triterpeno breína. - Atividade antinociceptiva considerável e dose-dependente nos métodos de contorções abdominais, de dor induzida e em ambas as fases do método de irritação induzida por formalina.	OTUKI <i>et al.</i> , 2001
<i>Protium heptaphyllum</i>	- Isolamento e caracterização de misturas binárias de triterpenos na resina.	- Constituinte majoritário a mistura α e β -amirinas.	MAIA <i>et al.</i> , 2000 SUSUNAGA <i>et al.</i> , 2001
<i>Protium heptaphyllum</i>	- Relato pela primeira vez de metabólitos secundários diferentes de terpenos na espécie.	- Isolamento de um monoterpene triidroxilado, e os triterpenos α e β -amirinas, e breína. - A resina e a catequina apresentaram atividade de inibição da acetilcolinesterase <i>in vitro</i> .	BANDEIRA <i>et al.</i> , 2002
<i>Protium heptaphyllum</i>	- Modelos utilizando etanol/HCl como indutores de úlceras gástricas em ratos.	- Presença de triterpenos pentacíclicos responsáveis pelas atividades antiinflamatória e de gastroproteção.	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2004a
<i>Protium heptaphyllum</i>	- Avaliação do efeito hepatoprotetor contra lesão induzida por acetaminofeno	- Diminuição do estresse oxidativo e da formação de metabólitos tóxicos como provável mecanismo de hepatoproteção.	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2005

Espécie	Tipo de estudo	Resultados	Referências
<i>Protium kleinii</i>	- Avaliação da atividade antiinflamatória tópica, utilizando o modelo de edema de orelha.	- Nos estudos farmacológicos, o extrato e a α -amirina apresentaram considerável atividade antiinflamatória dose-dependente.	OTUKI <i>et al.</i> , 2005
<i>Protium heptaphyllum</i>	- Avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva.	- Efeitos sedativo e ansiolítico podem estar relacionados a ação em receptores do tipo benzodiazepínicos e efeito antidepressivo onde mecanismos noradrenérgicos provavelmente estão envolvidos.	ARAGÃO <i>et al.</i> , 2006
<i>Protium kleinii</i>	- Avaliação da atividade antiinflamatória tópica da α -amirina	- Pode estar associada a supressão na pele dos níveis de PGE-2 provavelmente por mecanismos envolvendo a supressão da COX-2.	MEDEIROS <i>et al.</i> , 2007
<i>Protium bahianum</i>	- Avaliação da atividade antiacaricida	- Apenas a resina envelhecida induziu repelência a <i>Tetranychus urticae</i>	PONTES <i>et al.</i> , 2007
<i>Protium heptaphyllum</i>	- Síntese e identificação de 5 derivados dos triterpenos $\alpha\beta$ -amirina. - Avaliação da atividade antinociceptiva pelo modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético	- Três desses derivados foram mais potentes que a mistura de $\alpha\beta$ -amirinas. - Um desses compostos também teve significativa atividade analgésica na fase II do teste de formalina.	SOLDI <i>et al.</i> , 2008
Triterpeno α,β -amirina	Modelo de colite em rato	- α,β -amirina é capaz de inibir a translocação de p65, sugerindo fortemente que a inibição da ativação de NF-kB é um mecanismo-chave através do qual estes triterpenos pentacíclicos naturais modulam a inflamação intestinal.	VITOR <i>et al.</i> , 2009
Triterpeno α,β -amirina	Modelo de pancreatite aguda em ratos	- $\alpha\beta$ -amirina atenua o desenvolvimento da pancreatite aguda pela redução da infiltração de neutrófilos, diminui a geração de respostas inflamatórias inibindo a produção de citocinas e a expressão de iNOS.	MELO <i>et al.</i> , 2010
Triterpeno α,β -amirina	Modelo de dor neuropática persistentes em camundongos	- $\alpha\beta$ -amirina exhibe duradouras propriedades antinociceptiva e antiinflamatória em modelos de nocicepção persistente através da ativação dos receptores de canabinóides.	SIMÃO DA SILVA <i>et al.</i> , 2011

Como vimos, vários relatos da literatura têm mostrado a eficácia de α,β -amirina em estudos com modelos de inflamação (MEDEIROS *et al.*, 2007). Diferentemente destes últimos, são escassos os trabalhos abrangendo as atividades relacionadas a outros triterpenos também isolados a partir da resina de *Protium sp.* Com base nesses dados, foi decidido investigar os efeitos farmacológicos dos triterpenos breína/maniladiol e de compostos sintetizados a partir da α,β -amirina, como é o caso da α,β -amirina acetilada e a α,β -amirona.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a atividade antiinflamatória dos compostos triterpênicos isolados de óleo-resina de *Protium paniculatum* Engler (Burseraceae).

Objetivos Específicos

- Verificar o efeito dos compostos triterpênicos sobre viabilidade celular;
- Estudar a influência de triterpenos sobre a produção de mediadores inflamatórios;
- Verificar o efeito dos compostos triterpênicos sobre a expressão de proteínas envolvidas no processo inflamatório.
- Avaliar a atividade antiinflamatória de compostos triterpenóides *in vivo* utilizando o modelo de edema de pata.

4. Materiais e Métodos

4.1 Matéria-prima vegetal

A amostra constituída pelo óleo-resina foi coletada na Reserva Florestal Adolfo Ducke (INPA) localizada na Rodovia AM 010 (Manaus – Itacoatiara), Km 26, Manaus, Amazonas. Foi extraída da espécie *Protium paniculatum* var. “NOVA”, a qual faz parte do Projeto Flora da Reserva Ducke, onde se encontra identificada e catalogada sob o registro de exsicata INPA – 191303. Após o processo de extração e isolamento os compostos triterpenóides α,β -amirina, α,β -amirina acetilada, breína/maniladiol, α,β -amirona foram cedidos gentilmente pelo prof. Dr. Florencio Valdir da Veiga Junior.

4.2 Procedimentos de cultivo e manutenção de células

Neste estudo foi utilizado macrófagos murinos da linhagem J774 que foi gentilmente cedido pela Dra. Leda Quercia Vieira (Laboratório de Nutrição e Gnotobiologia, UFMG, MG, Brasil). Essa linhagem teve as condições de cultivo adaptadas para o Laboratório de Atividade Biológica II (BIOPHAR II) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), 50 U/mL de penicilina e 50 μ g/mL de estreptomicina (Invitrogen) a 37°C em estufa a 5% de CO₂. O LPS foi preparado como uma solução-estoque de 1 mg/mL em água esterilizada e armazenado a -20°C. Os compostos triterpenóides foram adicionados juntamente com o LPS.

4.3 Ensaios em cultura de células

4.3.1 Ensaio de viabilidade celular

Antes de realizar os ensaios em cultura de célula foi verificado a citotoxicidade dos compostos, e determinada as concentrações não tóxicas que foram testadas nos ensaios subsequentes. A citotoxicidade foi avaliada pelo método de alamar blue segundo NAKAYAMA *et al.* (1997). Neste ensaio foram utilizados macrófagos da linhagem J774. Os macrófagos foram cultivados na concentração de 5×10^3 células/poço em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação e aderência das células, as mesmas foram tratadas com os compostos triterpenóides nas concentrações de 20, 10, 5 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$. As células foram tratadas em triplicata para cada período de tratamento (24, 48 e 72 h). Como controle positivo de morte, foi avaliada a citotoxicidade da Doxorrubicina (5 $\mu\text{g/mL}$) e controle negativo somente meio de cultura. Para avaliar a influência do diluente DMSO, foi realizado um controle contendo somente DMSO. Após o período de tratamento (24, 48 e 72 horas) foi adicionado 10 μL de resazurina 0,4% (diluída 1:20). Após o tempo de metabolização da resazurina padronizado, que compreendeu de 2 horas, foi realizada a leitura da fluorescência. A viabilidade foi calculada conforme a fórmula abaixo, onde Ft= (fluorescência da célula + meio + substância + resazurina) e ΔFb = (fluorescência da célula + meio + resazurina).

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{Ft} \times 100}{\text{Fb}}$$

4.3.2 Inibição da ativação de macrófagos por LPS

Macrófagos da linhagem J774 foram plaqueados na densidade 1×10^6 células/mL em placas de 96 poços seguindo-se adesão por 24 h a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂. Após aderência, o meio foi retirado e adicionado meio de cultivo RPMI suplementado com 1% de SFB com volume de 100 µL/poço. As células foram estimuladas pela adição de lipopolissacarídeo - LPS (concentração final 1 µg/mL) e tratadas juntamente com compostos triterpenóides nas concentrações de 2,5; 5 e 10 µg/mL. Para o experimento controle as células foram cultivadas apenas com meio de cultivo. Em seguida, as células foram incubadas por mais 24 horas a 37°C, 5% de CO₂, e o sobrenadante celular foi coletado para a análise de NO e alíquotas foram congeladas (-20°C) para posterior análise das citocinas.

4.3.3 Quantificação de nitrito

A produção de óxido nítrico foi medida pela dosagem de seus produtos de degradação, nitrito, mais estáveis, utilizando o reagente de Griess. Neste método, o nitrito primeiramente reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina (NED) formando um composto azo estável de coloração púrpura, podendo assim ser quantificado espectrofotometricamente a 550 nm (GREEN *et al.*, 1982). Para a determinação da produção de NO[•], 100 µL do sobrenadante celular foi submetido a reação com igual volume do reagente de Griess. Para o preparo deste reagente, foram utilizadas soluções estoques de cloreto de naftiletlenodiamina (0,1%) dissolvido em H₃PO₄ (5%) e de sulfanilamida a 1% dissolvida em H₃PO₄ (5%). Pouco

antes do uso, as soluções foram adicionados na proporção 1:1, formando o reagente de Griess propriamente dito. Após o período de incubação de 10 minutos as amostras foram lidas em leitor de microplacas (DTX 800, Beckman) a 560 nm. O cálculo das concentrações de nitrito foi realizado com base em curvas padrões utilizando diferentes concentrações de NaNO_3 (15 μM até 1000 μM).

4.3.4 Quantificação de TNF- α , IL-6, IL-10 e IFN- γ em sobrenadantes de cultura de células J774

Macrófagos da linhagem J774 foram cultivados, estimulados e tratados com compostos triterpenóides conforme descrito no item 4.3.2. No final do período de cultivo. Alíquotas do meio de cultura foram coletadas para avaliação das concentrações de TNF- α , IL-6, IL-10 e IFN- γ utilizando o kit BD Cytometric Bead Array - CBA - Mouse Inflammation. A metodologia empregada foi por citometria de fluxo e o procedimento realizado de acordo com as recomendações do fabricante. Os resultados obtidos para essas citocinas foram representados como média de pelo menos três experimentos e expresso em ng/mL, com exceção da IL-10 que foi expressa em pg/mL.

4.3.5 Ensaio de avaliação da expressão de proteínas

Este ensaio foi empregado para visualizar a expressão da proteínas COX-2. Macrófagos da linhagem J774 na concentração de 1×10^6 células/mL foram tratados com compostos triterpênicos nas concentrações de 10; 5 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ durante 24 horas. Após o período de tratamento as células foram lisadas em 50 μL de tampão de lise [Tris-HCl 50 mM, pH 7,4), acrescido de 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM MgCl_2 , 0,5% (v/v)

nonidet NP-40, 10% glicerol e inibidores de proteinases (coquetel de inibidores de proteases EDTA-free, da Roche; 1mM PMSF), por 30 minutos sob agitação a 4°C. Após centrifugação por 10 minutos a 10 000g o sobrenadante foi separado e a proteína foi dosada utilizando o método de BRADFORD (1976). A curva de calibração foi feita com albumina na concentração de 0 a 5 µg/mL de proteína e a leitura foi realizada em espectrofotômetro após 10 minutos de incubação com o bradford a 595 nm.

O ensaio de SDS-PAGE foi realizado conforme (LAEMMLI, 1970) com modificações. 10 µg de proteína celular foi solubilizada em tampão de amostra (62 mM Tris-HCl pH 6,8; 10% glicerol; 2% SDS; 5% β-mercaptoetanol; 0,01% azul de bromofenol). A solução de proteína foi fervida por 5 minutos e submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (12% gel de resolução) a 120 mA até que as bandas do marcador molecular estivessem bem resolvidas.

Para o western blotting, os géis tiveram as suas proteínas transferidas para uma membrana de nitrocelulose. O tampão de transferência utilizado foi Tris base (48 mM), pH 8,3; Glicina (39 mM); SDS (0,037% p/v) e metanol (20% v/v); a transferência foi realizada no aparelho *semi-dry* (Bio Rad), a 10 V durante 50 min. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau para visualização das bandas de proteínas e certificação de sua transferência. Em seguida, foi realizado o procedimento para revelação por *Western Blot*. Brevemente, a membrana passou por 3 lavagens, de 10 minutos cada, com tampão TBS (*Tris Buffered Saline* – Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5), em seguida foi bloqueada, durante duas horas, com 5% de leite desnatado em tampão TBST (TBS acrescido de Tween[®] 20 0,05% p/v). Logo após, a membrana foi lavada 3 vezes com TBST e incubada, *overnight*, com o anticorpo primário (COX-2 - ABCAM 1/2000 em TBST e 0,1% de leite desnatado p/v). A membrana foi novamente lavada com TBST e incubada, durante 1 hora, com o anticorpo secundário

(anticorpo secundário policlonal anti-IgG de coelho, 1/2500 em TBST e 0,1% de leite desnatado p/v). Por fim, a membrana foi lavada 3 vezes com TBST e foi revelada utilizando o kit Pierce para reação de quimioluminescência. Em seguida, para detecção do padrão interno, a membrana foi submetida a *stripping* em tampão Tris 50 mM contendo 2% SDS, 100 mM beta-mercaptoetanol, 50°C, durante 30 minutos. Após abundante lavagem em TBST, a membrana foi rebloqueada e foram realizadas as mesmas etapas já descritas. Entretanto, o anticorpo primário foi anti- β -actina (diluição 1:1000 em TBST e 0,1% de leite desnatado p/v).

4.4 Avaliação da atividade antiinflamatória de compostos triterpenóides *in vivo*

4.4.1 Animais

Foram utilizados para realização deste estudo, ratos Wistar fêmeas, pesando entre 180-200 g, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Os animais foram mantidos em gaiolas, à temperatura ambiente ($25 \pm 3^\circ\text{C}$) com ciclo claro/escuro de 12 horas, mantidos na Sala de Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, tratados com alimentação e água “*ad libitum*”. Oito horas antes do início dos experimentos, os animais foram mantidos somente com água “*ad libitum*”. Os animais permaneceram na sala de experimentação por um período de adaptação de pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos. O manuseio e uso de animais foram de acordo com as normas institucionais, aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentos com Animais, protocolo n.º.116/2012, em anexo.

4.4.2 Administração das drogas

Os triterpenos $\alpha\beta$ -amirona (10 mg/mL) foram dissolvidos em salina e Tween-80 3%. Os grupos controles negativos receberam o mesmo veículo utilizado para solubilizar as substâncias. As drogas utilizadas ao longo dos experimentos tais como, carragenina 1% e indometacina (10 mg/kg) foram dissolvidas e diluídas diretamente em solução fisiológica a 0,9%. O volume total de solução administrada, por via oral, foi de no máximo 400 μ L, e quando administrada por via intraplantar, o volume total de solução foi de 100 μ L/pata.

4.4.3 Edema de pata induzido por carragenina

O modelo de edema de pata em ratos foi realizado de acordo com WINTER *et al.* (1962), com algumas modificações. O edema foi induzido pela injeção intraplantar de 100 μ L de carragenina à 1% na pata direita de ratos da linhagem Wistar. Grupos de animais foram tratados com α - β amirona (10 e 5 mg/kg, v.o.), indometacina (10 mg/kg, v.o) e o grupo controle foi tratado somente com veículo, após 60 minutos receberam injeção intraplantar de carragenina na pata posterior direita. Depois das injeções o desenvolvimento do edema da pata direita foi avaliado com auxílio de pletismômetro, e foram medidos nos tempos de 1, 2, 3, 4 e 5 horas após a injeção intraplantar de carragenina.

4.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm D.P.M. (Desvio Padrão da Média). Os ensaios foram analisados pelo teste de comparações múltiplas (Tukey – $p < 0,05$ = nível de significância) e a análise de variância (ANOVA) para comparação de mais de duas médias.

5. Resultados e Discussão

A inflamação é um dos processos mais importantes envolvido na defesa de um organismo, porém muitas vezes progride para doenças crônicas que necessitam de tratamento farmacológico. Produtos naturais, incluindo os derivados de plantas têm ao longo dos anos contribuído para o desenvolvimento de drogas terapêuticas modernas (CALIXTO *et al.*, 2003).

Estudos anteriores realizados com exsudatos resinosos (resina) coletado de *Protium heptaphyllum*, um remédio popular usado no Brasil para tratar condições inflamatórias e para acelerar a cicatrização de feridas, demonstraram que esta resina possui propriedades antiinflamatórias, gastroprotetores, anti-alérgicas e antinociceptivas. Estes efeitos têm sido atribuídos especificamente pela presença dos triterpenóides pentacíclicos $\alpha\beta$ -amirina, maniladiol e breína (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

O triterpeno α -amirina possui um esqueleto de base do tipo ursano e o triterpeno β -amirina possui um esqueleto de base do tipo oleanano, a única diferença entre eles é a posição de um metil no anel E. Ao examinar a estrutura triterpenóide pentacíclica da amirina, uma explicação possível para a sua atividade farmacológica valiosa é a presença dos sistemas de anéis perihidro-aromáticos, os quais tornam a molécula muito semelhante a esteróides. Figura 3: Estrutura dos principais constituintes da resina de *Protium* spp.

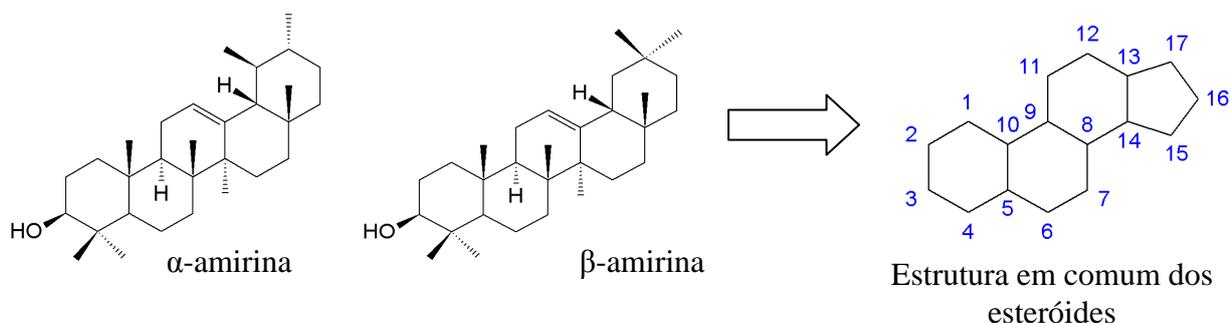


Figura 4: Semelhança estrutural entre compostos triterpênicos pentacíclicos e os esteróides

Com base na evidência de que espécies de *Protium sp.* acumulam compostos triterpenóides principalmente tetracíclicos/pentacíclicos (SIANI *et al.*, 2012) foram isolados de óleo resinas extraídos de *Protium paniculatum* misturas dos triterpenos breína/maniladiol e $\alpha\beta$ -amirina. A partir dos triterpenos $\alpha\beta$ -amirina foram obtidos os derivados sintéticos $\alpha\beta$ -amirina-acetilada e $\alpha\beta$ -amirona. Neste estudo, foi avaliada a atividade antiinflamatória dos triterpenóides naturais (breína/maniladiol) e dos triterpenóides obtidos de forma sintética ($\alpha\beta$ -amirina-acetilada e $\alpha\beta$ -amirona).

Os triterpenos $\alpha\beta$ -amirona já foram identificados em várias espécies de plantas: *Beilschmiedia sp.*, *Anacolosa pervilleana*, *Ficus microcarpa*, *Ficus pandurata*, *Cyclocarya paliurus* (BOURJOT *et al.*, 2012), porém na espécie *Protium paniculatum* apresentou baixo rendimento e por esse motivo foi obtida a partir de uma reação de oxidação da $\alpha\beta$ -amirina. Considerando que de acordo com a literatura pequenas modificações na estrutura de uma molécula poderia inibir a sua eficácia, uma vez que alterações estruturais podem alterar a absorção, distribuição e excreção do composto (farmacocinética), bem como a especificidade da molécula para alguns alvos (farmacodinâmica), neste último caso, pode-se encontrar uma substância mais eficaz com menos efeitos colaterais (SOLDI *et al.*, 2008).

5.1 Efeito dos compostos triterpênicos sobre a viabilidade celular de macrófagos

J774

Muitos compostos derivados de plantas tem a capacidade de modular a proliferação celular, atuando como agentes citotóxicos, como é o caso de drogas com potencial antineoplásico. Por outro lado podem atuar por estimulação do crescimento celular, isto é, drogas com potencial para aplicação na cicatrização de feridas (BISKUP, 2012).

Primeiramente foi avaliada a capacidade dos compostos triterpênicos em interferir na viabilidade de macrófagos murino J774, ou seja, se estes apresentavam potencial citotóxico. Foi observado que todos os compostos triterpênicos testados não apresentaram redução significativa na viabilidade de macrófagos em comparação com o grupo contendo células não tratadas, apresentando $CI_{50} > 20 \mu\text{g/mL}$, com exceção do triterpeno breína/maniladiol que apresentou $CI_{50} = 16,02 \mu\text{g/mL}$ (14,23-18,03) em 24 horas de tratamento, conforme mostra a figura 5 (A).

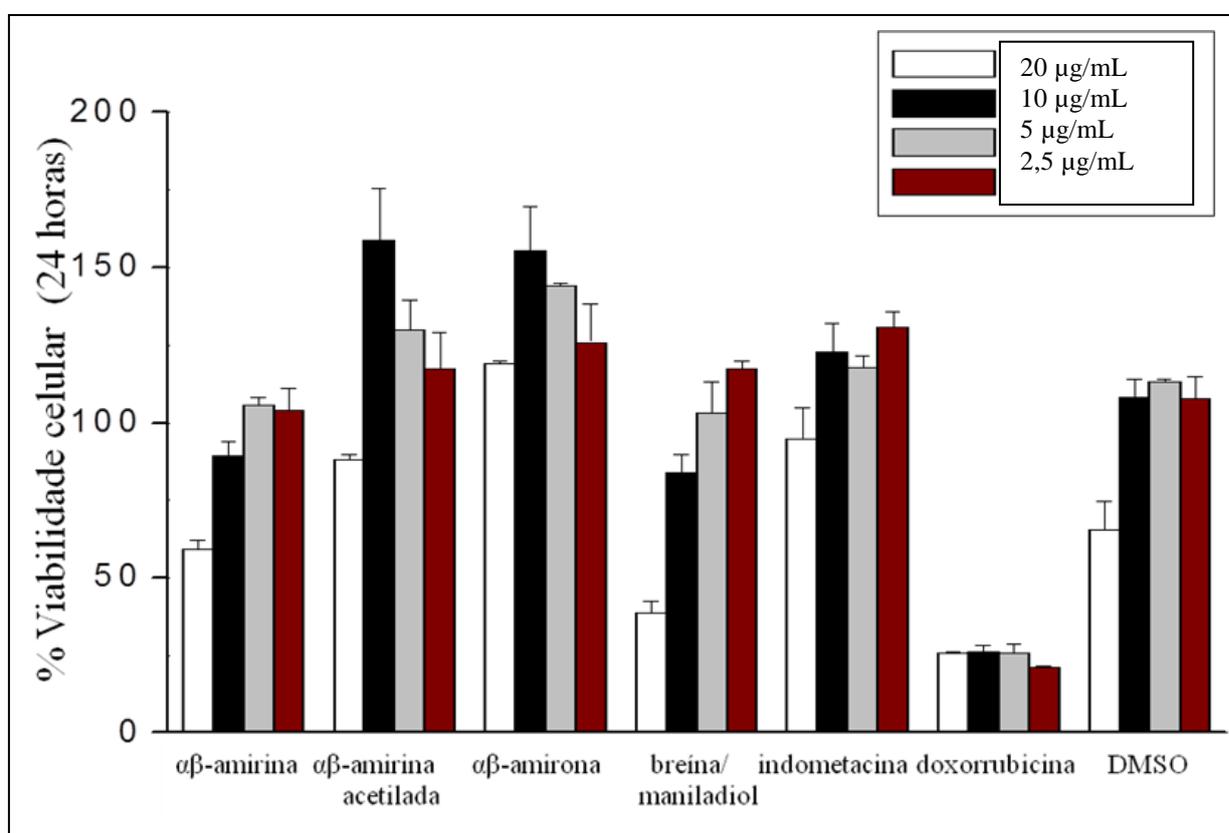


Figura 4: Efeito de compostos triterpênicos sobre a viabilidade de macrófagos murino J774 após 24 horas de tratamento. A CI_{50} foi calculada por regressão não-linear utilizando o programa GRAPhpAd Prism 5.0

No trabalho realizado por Siani e seus colaboradores (1999) verificou-se que o óleo essencial bruto de várias espécies de *Protium sp.* na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ foi capazes de inibir a proliferação em diferentes linhagens celulares, inclusive

apresentando capacidade de inibir de 76 a 89% a proliferação de células da linhagem J774 após um período de 72 horas de exposição. Nota-se que de fato apesar de ter sido um estudo no qual estavam avaliando a atividade do óleo essencial bruto, a concentração utilizada de 100 $\mu\text{g/mL}$ é considerada uma concentração muito alta, e provavelmente causaria morte celular.

Foi observado o efeito citotóxico dos triterpenos breína/maniladiol na linhagem de macrófagos J774. Da mesma forma, no trabalho realizado por Ukiya e seus colaboradores (2002) o triterpeno maniladiol mostrou atividade citotóxica moderada para o câncer renal e atividade acentuada para o câncer de mama.

Não foi observado efeito citotóxico do triterpeno $\alpha\beta$ -amirona, o qual apresentou $\text{CI}_{50} > 20 \mu\text{g/mL}$. Esse resultado corrobora com o trabalho realizado por Cota e seus colaboradores (2011) no qual β -amirona demonstraram ausência de toxicidade contra leucócitos humanos após 48 horas de incubação na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$.

Neste estudo, utilizamos a linhagem J774 e o tempo previsto para o tratamento com os compostos triterpênicos era de no máximo 24 horas. Levando-se em conta que todos os compostos testados apresentaram $\text{CI}_{50} > 15 \mu\text{g/mL}$, considerou-se que 10 $\mu\text{g/mL}$ seria uma concentração segura para ser utilizada nos ensaios subsequentes.

Embora alguns estudos mostrem que a amirina pode apresentar potencial citotóxico, como foi o caso do trabalho realizado por LIN e seus colaboradores (2011) no qual relata uma fraca atividade citotóxica de $\alpha\beta$ -amirina quando utilizada em conjunto com cisplatina em linhagem tumoral. Por outro lado, há estudos que mostram que a α -amirina aumenta a taxa de proliferação celular, como foi o caso de induzir em até 18% a proliferação de queratinócitos humanos (linhagem HaCat) e portanto, representando um interessante candidato para a utilização na indústria cosmética como agente que promove a cicatrização de feridas e regeneração da pele (BISKUP, 2012).

O isolamento dos constituintes ativos de plantas e a administração dos compostos puros é um modo pelo qual constituintes muito potentes podem ser transformados em produtos medicinais seguros de composição uniforme e consistente. Em outros casos, o objetivo pode ser melhorar a substância natural, aumentando suas propriedades desejáveis e minimizando os efeitos colaterais (PERTINO *et al.*, 2007). Neste estudo, os compostos triterpênicos foram testados nas concentrações que variaram entre 2,5 µg/mL a 10 µg/mL. Estas concentrações estavam abaixo das concentrações consideradas tóxicas ($CI_{50} > 20$ µg/mL), mesmo assim os compostos triterpênicos foram capazes de mostrar atividade, o que pode representar uma vantagem em relação dose-efeito e segurança quanto ao uso dessas substâncias.

5.2 Efeito dos compostos triterpênicos sobre a produção de NO[•]

O óxido nítrico (NO[•]), produzido pela NO sintase induzida (iNOS), é um dos mediadores importantes da inflamação e a produção excessiva de NO[•] está associada consideravelmente a doenças graves, tais como choque séptico, artrite, derrames, doenças inflamatórias crônicas e doenças autoimunes. A determinação da taxa de produção de NO[•] e a expressão da proteína iNOS em modelos celulares estimulados por LPS tem sido uma ferramenta muito utilizada na procura de fármacos anti-inflamatórios (SHIH *et al.*, 2010).

Neste estudo foi observado o efeito de compostos triterpênicos isolados da espécie *Protium paniculatum* sobre a produção de NO[•] em macrófagos da linhagem J774 estimulados por LPS. Verificou-se que os triterpenos α,β -amirina, α,β -amirina-acetilada, α,β -amirona e breína/maniladiol na concentração de 10 µg/mL inibiram a produção de NO[•] em 98,34±0,9%; 96,05±0,8%; 99,86±1,1% e 75,43±2,8%, respectivamente e apresentaram CI_{50} de 4,96±0,2; 5,04±0,12; 4,61±0,08; 6,49±0,02

$\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A porcentagem de inibição apresentada pelos compostos triterpênicos mostram-se melhores se comparadas com o padrão indometacina, o qual em $10 \mu\text{g/mL}$ apresentou inibição de $(86,31 \pm 1,2\%)$ sobre a produção de NO^\bullet , conforme mostra a figura 5.

Os resultados obtidos mostram-se melhores do que o observado no estudo realizado por SIANI e seus colaboradores (1999) o qual testou a atividade do óleo essencial bruto ($100 \mu\text{g/mL}$) obtido a partir de folhas e resinas de diferentes espécies de *Protium* sp, sendo que a espécie *Protium heptaphyllum* inibiu em 74%; *P. strumosum* 46%; *P. grandifolium* 26%; *P. hebetatum* 1,65% enquanto que a espécie *P. lewellyni* foi capaz de aumentar em 49% a produção de NO em macrófagos peritoneais de ratos estimulados por LPS e coletados após 24 horas de indução de pleuresia.

As médias de CI_{50} dos compostos triterpênicos neste estudo, encontra-se compatíveis com as CI_{50} observadas no trabalho realizado por NIU e seus colaboradores (2011) no qual foram avaliados os triterpenóides olean-13(18)-ene-3,12,19-trione, δ -amirona e acetato δ -amirina, quanto ao seu potencial para inibir a produção de NO induzido por LPS em linhagem de macrófagos RAW 264.7, os quais apresentaram valores de CI_{50} de $9,91 \mu\text{M}$, $12,24 \mu\text{M}$ e $43,34 \mu\text{M}$, respectivamente.

Vários são os mecanismos que podem explicar o efeito inibitório de um determinado composto sobre a produção de NO^\bullet . Dentre esses mecanismos podemos enumerar (1) a capacidade do composto em inibir diretamente a atividade da enzima iNOS (2) inibir a expressão de iNOS (3) e por sequestro do radical NO^\bullet .

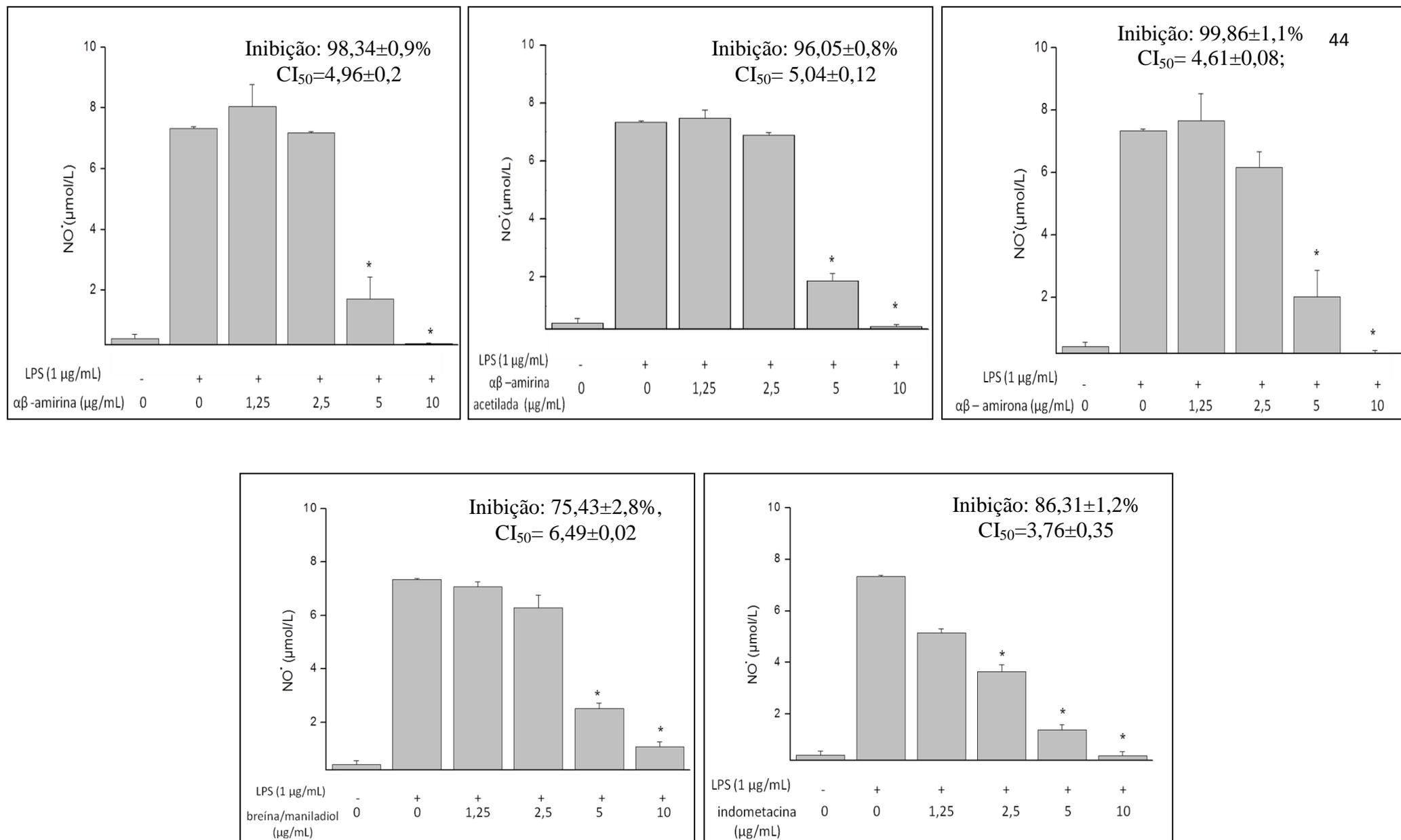


Figura 5: Efeito de compostos triterpênicos na produção de NO em macrófagos murino J774 estimulados com LPS. Cada valor é a média ± D.P.M. de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada usando o teste de comparações múltiplas Tukey – $p < 0,05$, quando comparadas com o grupo não tratado.

As atividades antiinflamatórias do ácido ursólico, um triterpeno pentacíclico natural, tem sido atribuída dentre outros fatores, a sua capacidade de inibir fortemente a produção de NO[•]. Da mesma forma em que o ácido ursólico já demonstrou atenuar a expressão de óxido nítrico sintase induzida pela via NF-κB em macrófagos murino RAW 264.7 (IKEDA *et al.*, 2008).

No trabalho realizado por SHIH e seus colaboradores (2010) foi demonstrado que o extrato de *Euphorbia hirta* L. e seu componente β-amirina foram capazes de inibir a expressão da proteína iNOS pela técnica Western blotting, porém não foram capazes de inibir a expressão de mRNA iNOS, avaliados pela técnica reação da polimerase em cadeia por transcrição reversa (RT-PCR).

Neste estudo, foi possível verificar que os compostos triterpênicos testados inibem a produção de NO, embora não se tenha subsídios suficientes para afirmar pelos quais mecanismos atuam. Em particular, foram avaliados a influência dos triterpenos αβ-amirina sobre a expressão de mRNA iNOS pela técnica PCR em tempo real. Verificou-se que após 24 horas de tratamento com αβ-amirina não foi demonstrado diferença na expressão gênica de iNOS. Este estudo continuará pesquisando e avaliando a expressão gênica em tempos pré-determinados de 4 e 8 horas de tratamento, visto que trabalhos sugerem que a expressão de mRNA ocorre durante as primeiras horas após a ativação celular (DEFORGE; REMICK, 1991).

5.3 Efeito dos compostos triterpênicos sobre a produção de citocinas

As citocinas são proteínas formadas no interior das células e, quando liberadas, interagem com receptores celulares (transmembrânicos) produzindo seu efeito biológico. Dependendo do local onde agem, podem exercer uma ação autócrina (quando

agem na própria célula que a produziu), parácrina (agem em células vizinhas) ou endócrina (agem à distância). Cada citocina possui múltiplas ações (efeito pleiotrópico) podendo agir em sinergismo ou antagonismo, como ocorre no sinergismo entre TNF- α e a interleucina 1 (IL-1), que são as principais citocinas liberadas no processo inflamatório (VITALE; RIBEIRO, 2007).

O TNF- α pode ser produzido por macrófagos ativados, linfócitos ou monócitos. O principal estímulo para a sua produção é a presença de lipopolissacarídeos que compõem a membrana das bactérias gram negativas. Após ser produzido e liberado, o TNF- α irá ligar-se a receptores específicos denominados de receptores de TNF (TNF-R) I e II, para que possa produzir o seu efeito biológico. Os receptores de TNF (principalmente o TNF-RII) podem, ainda, desencadear o gatilho para a apoptose. Entretanto, o mecanismo que determinará qual efeito será dominante ainda não está totalmente esclarecido. Após ligar-se a seus receptores o TNF- α vai estimular a transcrição e a produção da enzima I κ B quinase, a qual irá produzir o fator nuclear κ B (NF- κ B). O NF- κ B, quando ativado, irá agir no núcleo da célula, induzindo a produção de diversas proteínas envolvidas nas respostas inflamatória e imunológica responsáveis pelas principais ações biológicas do TNF- α . Desta forma, o principal efeito fisiológico do TNF- α é promover a resposta imune e a inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de ativá-los. O TNF- α , quando liberado em baixas concentrações, age nas células endoteliais promovendo vasodilatação e estimulando-as a secretarem um grupo de citocinas (denominadas quimioquinas) que tem ação quimiotática em relação aos leucócitos, promovendo, desta forma, um processo inflamatório local que possibilita o combate a quadros infecciosos. No hipotálamo ele age como pirógeno endógeno induzindo febre, enquanto que no

fígado vai estimular a produção das proteínas da fase aguda do processo inflamatório e de fibrinogênio (VITALE; RIBEIRO, 2007).

Substâncias com propriedades antiinflamatórias bem conhecidas, tais como glicocorticóides ou antiinflamatórios não esteróides (AINEs) exercem, pelo menos uma parte dos seus efeitos, pela inibição da atividade de NF- κ B. Várias plantas medicinais com propriedades antiinflamatórias contêm também compostos estruturalmente diversos, que inibem a ativação do NF- κ B. Exemplo disso, é o triterpenóide celastrol, principal componente isolado de *Celastrus orbiculatus*, e a pristimerina seu derivado análogo, têm sido estudados como inibidores do fator de transcrição NF- κ B, sendo demonstrado que celastrol inibe não só a produção de NO^{*} e TNF- α , mas também a expressão de iNOS e TNF- α em linhagem de macrófagos RAW 264.7 estimulada com LPS (RIOS, 2010).

Neste estudo, de acordo com a figura 6, foi verificado que dentre os compostos triterpênicos avaliados, apenas os triterpenos α , β -amirina inibiram a produção de TNF- α ($52,03 \pm 2,4\%$) na concentração de 10 μ g/mL.

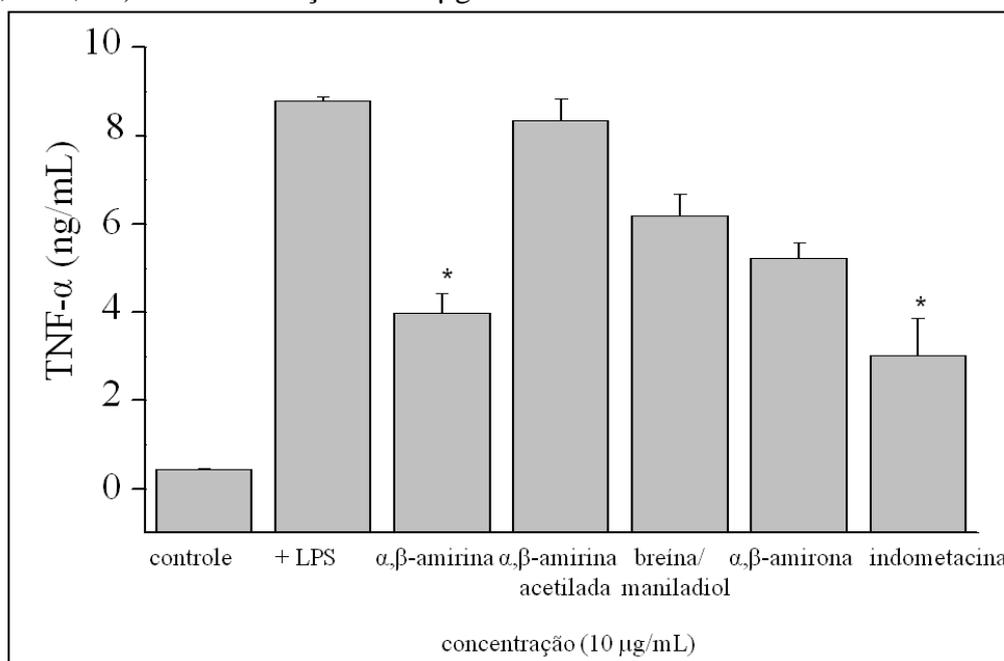


Figura 6: Efeito de compostos triterpênicos sobre produção de TNF- α em macrófagos murino J774 estimulados com LPS, foi utilizado indometacina como padrão. Cada valor é a média \pm D.P.M. de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada usando o teste de comparações múltiplas Tukey – $p < 0,05$, quando comparadas com o grupo não tratado.

O resultado do presente estudo corrobora com vários trabalhos que demonstram os efeitos inibitórios de α,β -amirina sobre a produção de TNF- α em diferentes modelos de inflamação, foi o caso do modelo da pancreatite aguda em ratos (MELO *et al.*, 2010); dor neuropática persistente em camundongos (SIMÃO DA SILVA *et al.*, 2011); periodontite aguda em ratos (PINTO *et al.*, 2008); inflamação tópica em ratos (MEDEIROS *et al.*, 2007).

Apesar dos outros compostos triterpênicos não terem a capacidade de intervir sobre a produção de TNF- α , foram analisadas os efeitos desses compostos sobre a produção de outras citocinas envolvidas no processo inflamatório, como foi o caso da IL-6, IL-10 e IFN- γ .

A interleucina-6 (IL-6) é produzida no local da inflamação e desempenha um papel chave na resposta de fase aguda, sendo responsável pela produção de proteínas de fase aguda. As citocinas que são produzidas e que participam durante o processo inflamatório, são agentes estimulantes da produção de proteínas de fase aguda, entre estas citocinas estão a IL-6, IL-1 β , TNF- α , interferon- γ , e possivelmente, IL-8, estes são produzidos por uma variedade de tipos de células, mas as fontes mais importantes são os macrófagos e monócitos nos locais de inflamação (GABAY, 2006).

A IL-6 em combinação com o seu receptor solúvel sIL-6R α , liga-se a gp130 nas membranas de células do estroma, e ativa estas células em mecanismo denominado trans-sinalização. Da mesma forma, o complexo IL-6/sIL-6R α pode ativar células endoteliais a segregar IL-8 e proteína quimioatrativa de monócitos (MCP -1), além de induzir a expressão de moléculas de adesão. Diante do exposto, a IL-6 tem um papel fundamental na transição entre a inflamação aguda e a inflamação crônica alterando a natureza da infiltração leucocitária (de neutrófilos polimorfonucleares para monócitos/macrófagos). Adicionalmente, a IL-6 estimula a produção de IL-1, que é um antagonista

do receptor sIL-6R α , sendo portanto um mediador anti-inflamatório. IL-6 induz não só as reações de fase aguda, mas também o desenvolvimento da resposta imunidade celular e humoral específica, incluindo a fase final da diferenciação das células B, a secreção de imunoglobulina e a ativação das células T. Níveis de IL-6 tem se se mostrado um elemento chave na inflamação crônica. A expressão de IL-6 é realçada no local da inflamação, e o bloqueia na sinalização de IL-6 tem se mostrado eficaz na prevenção e tratamento em modelos de doenças inflamatórias (incluindo a artrite e colite) (GABAY, 2006).

Neste estudo, os compostos triterpênicos foram avaliados quanto sua capacidade de inibir a produção de IL-6. Como apresentado na figura 6, todos os compostos triterpênicos testados, com exceção da α,β -amirina acetilada foram capazes de inibir a produção de IL-6. Verificou-se que α,β -amirina, α,β -amirona, breína/maniladiol e indometacina na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ inibiram a produção de IL-6 em $67,81\pm 2,8\%$; $61,43\pm 3,2\%$; $61,27\pm 5,1\%$, $64,24\pm 2,8\%$, respectivamente.

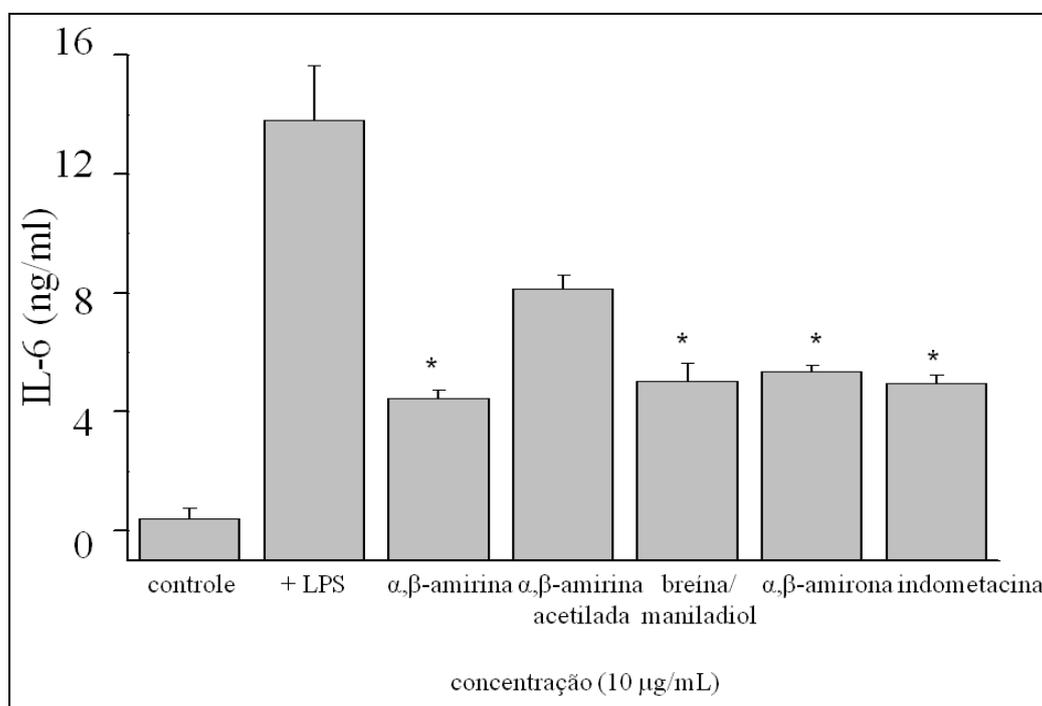


Figura 7: Efeito de compostos triterpênicos sobre produção de IL-6 em macrófagos murino J774 estimulados com LPS, foi utilizado indometacina como padrão. Cada valor é a média \pm D.P.M. de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada usando o teste de comparações múltiplas Tukey – $p < 0,05$, quando comparadas com o grupo não tratado.

A presença de IL-6 nos tecidos não é uma ocorrência anormal, mas sua produção sem controle pode levar a exposições subsequentes a inflamação crônica e há uma forte associação com muitos tipos de câncer (HODGE *et al.*, 2005).

No trabalho realizado por PATHAK e seus colaboradores (2007) foi demonstrado que o triterpeno pentacíclico ácido ursólico inibiu tanto a forma de IL-6 constitutiva, quanto a forma IL-6 induzida e a ativação de STAT3 numa forma dose dependente do tempo em células de mieloma múltiplo.

No trabalho realizado por LEE e seus colaboradores (2012) foi demonstrado que sete flavonoides (bakuchiol; bavachinina; neobavaisoflavona; corilifol A; corilina; isobavachalcona; bavachina) isolados de sementes de *P. corylifolia* foram capazes de inibir IL-6 induzida pela atividade do promotor STAT3 e pela fosforilação de STAT3 em células Hep3B.

Neste estudo, com baseados nos resultados obtidos, os triterpêncios pentacíclicos poderiam ser usado como pistas para o desenho de inibidores de STAT3, que também podem ser úteis para o tratamento de doenças inflamatórias.

A interleucina-10 (IL-10) é produzido por macrófagos ativados e linfócitos T, desempenha um papel importante na resposta antiinflamatória, inibindo a produção de citocinas induzida por lipopolissacarídeo em macrófagos, incluindo o fator de necrose tumoral α , IL-6 e IL-12. Muitas tentativas têm sido feitas para elucidar o mecanismo pelo qual IL-10 inibe a produção de citocinas em macrófagos e vários modelos têm sido propostos. Estes incluem a inibição do fator nuclear κ B (NF- κ B); proteínas ativadas por mitógenos (MAP), e redução da transcrição e a estabilidade do mRNA de genes de citocinas. No entanto, o mecanismo exato pelo qual a IL-10 suprime a atividade de macrófagos ainda não está claro (KUWATA *et al.*, 2003).

IL-10 também é capaz de inibir citocinas produzidas por linfócitos em particular interferon gama (IFN- γ), produzido por linfócitos T e células natural Killer (NK). Como citado anteriormente, IL-10 também é capaz de inibir a produção de IL-12. IL-12 medeia a atividade biológica em células T e células NK isoladamente ou em sinergia com outros indutores, sendo um estimulador potente na produção de interferon gama (IFN- γ). Embora a IL-10 seja capaz de bloquear a produção de IL-12 tanto in vitro como in vivo, o mecanismo de inibição do IFN- γ pela IL-10 não pode ser explicada baseado apenas na inibição de IL-12 porque a IL-10 pode inibir parcialmente a produção de IFN- γ induzido por IL-12, como também a produção de IFN- γ em resposta a vários estímulos (D'ANDREA *et al.*, 1993).

No presente trabalho verificou-se que os compostos triterpênicos, com exceção de breína/maniladiol apresentaram atividade indutora sobre a produção de IL-10, conforme mostra a figura 8.

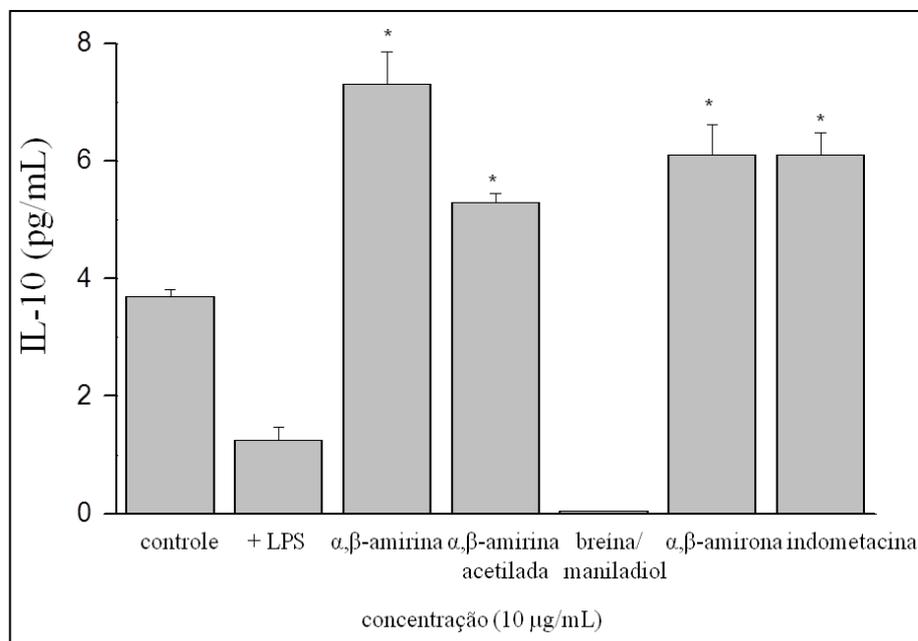


Figura 8: Efeito de compostos triterpênicos sobre produção de IL-10 em macrófagos murino J774 estimulados com LPS, foi utilizado indometacina como padrão. Cada valor é a média \pm D.P.M. de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada usando o teste de comparações múltiplas Tukey – $p < 0,05$, quando comparadas com o grupo não tratado.

Neste estudo, foi verificado também a influência dos compostos triterpênicos sobre a produção de IFN- γ em macrófagos murinos J774 ativados por LPS. Após 24 horas de tratamento não foi identificada a presença de IFN- γ nas amostras. A ausência de IFN- γ pode ser explicada pela alta produção de IL-10. Como visto, IL-10 pode inibir a produção de IFN- γ em resposta a vários estímulos. Da mesma forma, a produção de IL-10 pode estar influenciando diretamente sobre a inibição de IL-6.

Os resultados neste estudo foram parecidos com os resultados observados no trabalho realizado por SDZISINSKA e seus colaboradores (2003) no qual avaliaram as propriedades imunomoduladoras dos triterpenóides betulina e sua forma oxidada ácido betulínico como agentes indutores de citocinas examinando sangue total humano estimulado por mitógenos (PHA). Foi observado que o triterpenóide betulina induziu a produção de TNF- α de uma forma dose-dependente, mas não induziu a produção de IL-10 e IFN- γ , estes resultados sugerem que a secreção de IFN- γ , IL-10 e TNF- α pode ser regulada por diferentes mecanismos ou que vários tipos de leucócitos presentes no sangue total diferem na sua sensibilidade à betulina. Ao contrário, o ácido betulínico não influenciou a produção de TNF- α , mas inibiu ligeiramente a produção de IFN- γ e aumentou a produção de IL-10.

5.4 Efeito de α,β -amirina sobre a expressão de COX-2

Nos ensaios anteriores observamos que a acetilação de α,β -amirina não aumentou seu efeito sobre a inibição de NO * e TNF- α . Apesar dos triterpenos breína/maniladiol apresentarem resultados que podem representar uma possível atividade antiinflamatória, estes apresentaram atividade citotóxica moderada na linhagem de macrófagos murinos J774. Além disso, trata-se de uma mistura que precisa

ser isolada para melhor ser caracterizada. Por esses motivos, esse estudo continuou avaliando a atividade apenas do triterpeno α,β -amirona sobre a expressão de COX-2, pela técnica de Western blotting. Conforme mostra a figura 9, o triterpeno α,β -amirona foi capaz de inibir a expressão de COX-2 de forma dose dependente, onde na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ houve inibição quase que total da expressão de COX-2.

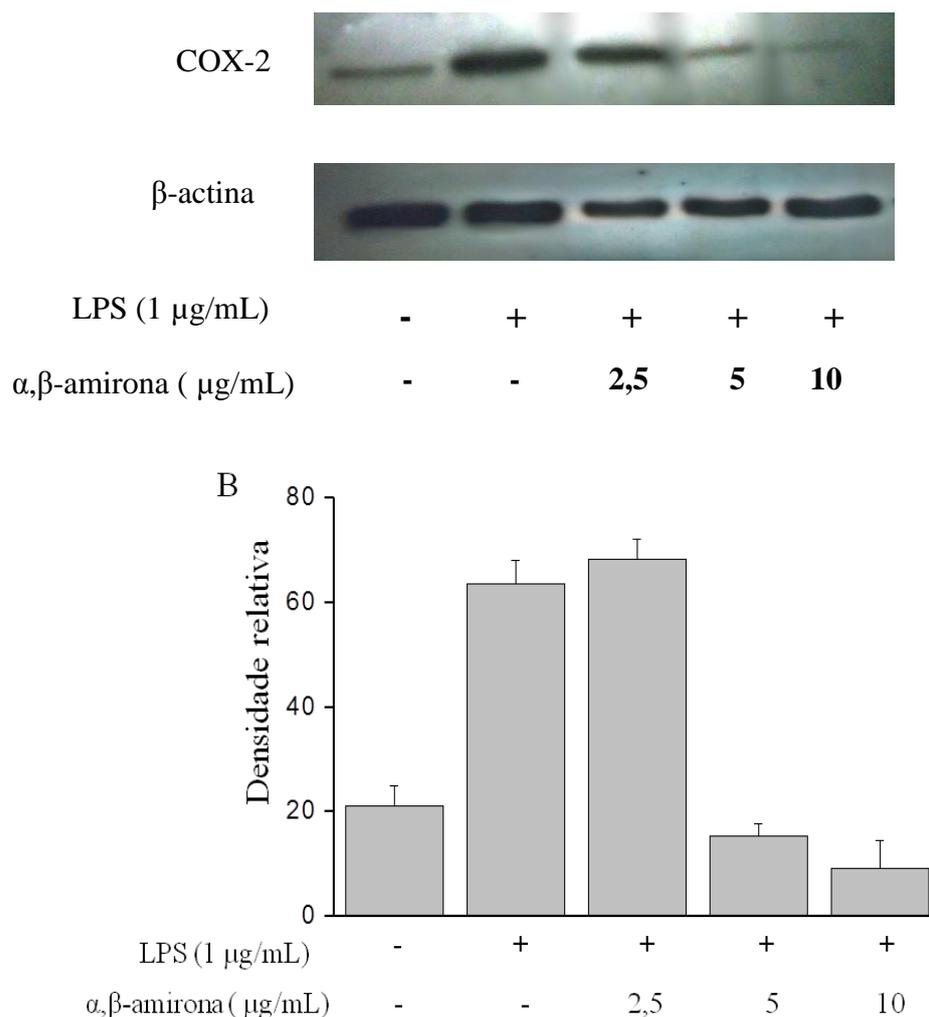


Figura 9: Efeito dos triterpenos α,β -amirona sobre a expressão de COX-2 em macrófagos murinos J774 estimulados por LPS. (A) Análise das bandas de western blotting referente a expressão de proteína COX-2 e β -actina. (B) Densidade relativa da proteína COX-2.

Com base nas evidências de estudos anteriores no qual mostraram a capacidade do triterpeno $\alpha\beta$ -amirina em inibir a expressão de COX-2 utilizando diferentes modelos de inflamação, como foi o caso da inflamação tópica em ratos (MEDEIROS *et al.*, 2007) e no modelo de colite (VITOR *et al.*, 2009), neste trabalho mostramos que $\alpha\beta$ -amirina também foi capaz de inibir a expressão de COX-2 nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ utilizando o modelo em cultura de células, mas especificamente a linhagem de macrófagos murinos J774 estimulados por LPS.

As concentrações utilizadas de $\alpha\beta$ -amirina neste estudo são bem inferiores se comparamos com o trabalho realizado por DUDHGAONKAR e seus colaboradores (2009) no qual avaliaram em modelos celulares, linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados por LPS, o extrato triterpênico GLT composto pelos triterpenos: ácido ganodérico A, F, H, Mh, S1, ácido ganosporerico e ácido lucidenico B, D, D1, E1, L e G extraído de *G. lucidum*. Esse extrato demonstrou ser capaz de inibir a expressão de COX-2 nas concentrações de 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$.

Estudos revelam que os mecanismos através dos quais $\alpha\beta$ -amirina exerce a sua ação antiinflamatória parece estar relacionado com a modulação de citocinas locais e redução na expressão de COX-2, possivelmente através da inibição de NF- κ B (VITOR *et al.*, 2009).

Trabalhos mostram os efeitos de triterpenos pentacíclicos na supressão da resposta inflamatória em modelos de macrófagos ativados por meio da inibição da via NF- κ B. Por exemplo, a ginsenoside Rh1, triterpeno isolado de *Panax ginseng*, inibiu a expressão de iNOS, COX-2 e a ativação do NF- κ B em células RAW264.7. Extrato de *Glossogyne tenuifolia*, contendo ácido oleanólico, regulada negativamente a expressão de iNOS, COX-2, suprimido o liberação de TNF- α e IL-6 e ativação de NF- κ B em células RAW264.7 após estímulo por LPS. Laxifolone A, triterpeno isolado a partir de

Euonymus laxiflorus, suprimiu a expressão de iNOS através da inibição de NF-kB, que foi mediada pela inibição de translocação nuclear de p65 em macrófagos estimulados. Momordina I, glicosídeo do ácido oleanólico isolados de *Ampelopsis radix*, marcadamente suprimiu a atividade de NF-kB e AP-1 em macrófagos ativados. Celastrol, isolada a partir de *Celastrus orbiculus* inibiu a expressão do mRNA de iNOS e TNF- α , a produção de NO e de TNF- α em células RAW 264.7 estimulados por LPS (DUDHGAONKAR *et al.*, 2009).

De acordo com os resultados pré-liminares mostrados na figura 10, o triterpeno α,β -amirona foi capaz de inibir a produção de NO, IL-6 e expressão de COX-2, pode-se sugerir que o mecanismo pelo qual α,β -amirona exerce sua atividade antiinflamatória, seja o mesmo mecanismo pelo qual a $\alpha\beta$ -amirina atua, ou seja, por inibição do fator de transcrição NF-kappa beta.

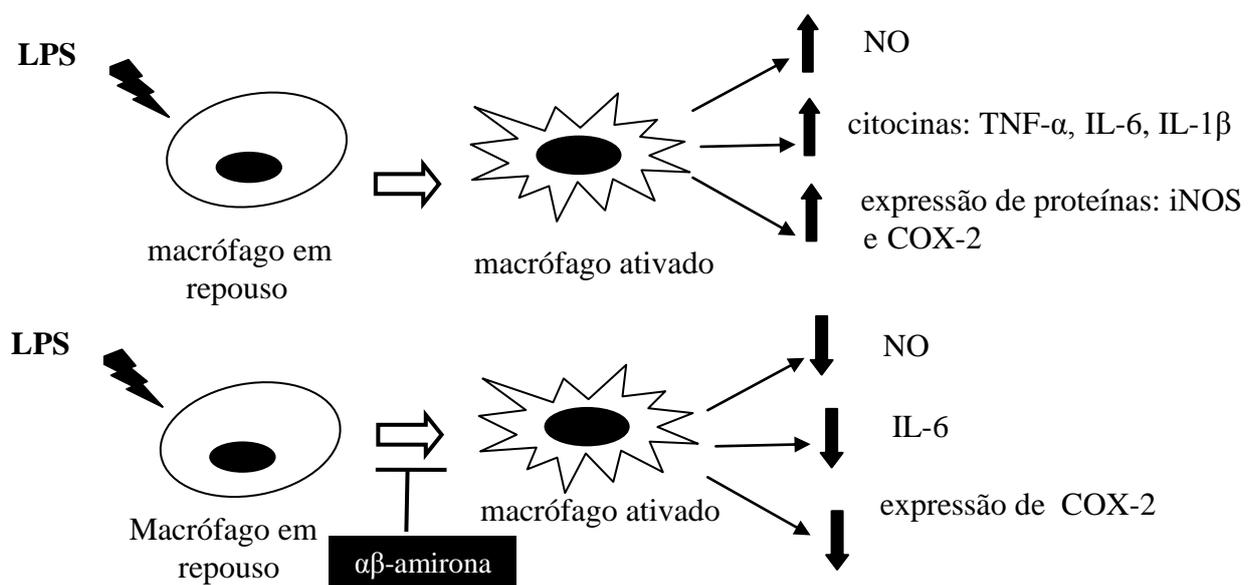


Figura 10: Esquema representando os efeitos de $\alpha\beta$ -amirona sobre macrófagos murino J774 estimulados por LPS. Observou-se redução na produção de NO; IL-6 e inibição da expressão de COX-2.

3.2 Efeito do triterpeno α,β -amirona no edema de pata induzido por carragenina

O modelo de edema de pata induzido por carragenina é um teste adequado e amplamente utilizado para a avaliação da atividade antiinflamatória de diferentes compostos (AMDEKAR *et al.*, 2012).

A carragenina é um agente flogístico que causa uma reação antiinflamatória reproduzível e facilmente mensurável, fatos que tem contribuído para mantê-la como principal ferramenta farmacológica para experimentos que envolvem a análise do processos inflamatórios (LAZZARINI, 2003).

O edema induzido por carragenina é um modelo bifásico com vários mediadores atuando em sequência para produzir a resposta inflamatória. Na fase inicial (0-1h) é caracterizada pela liberação de histamina, serotonina e bradicinina. A fase tardia (depois de 1 h), é sustentada principalmente por uma infiltração de células polimorfonucleares no local da inflamação, que induz a secreção de vários mediadores pró-inflamatórios tais como óxido nítrico, prostaglandinas e citocinas como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β) (AMDEKAR *et al.*, 2012).

Neste estudo, foi avaliada a atividade antiinflamatória do triterpeno α,β -amirona no modelo edema de pata induzido por carragenina utilizando as concentrações de 10 e 5 mg/Kg. Observou-se um efeito rápido de inibição da inflamação na primeira hora (63,6 \pm 1,1%; 45,4 \pm 1,6%, respectivamente) se comparadas com as medidas de inibição da inflamação na terceira hora (27,7 \pm 0,4%; 0,5 \pm 1,3%). Conforme mostra a figura 10, houve uma diminuição do efeito à medida que passa o tempo, o que indica que a α,β -amirona pode produzir um efeito rápido e instantâneo, podendo ser utilizada para o tratamento de inflamação aguda.

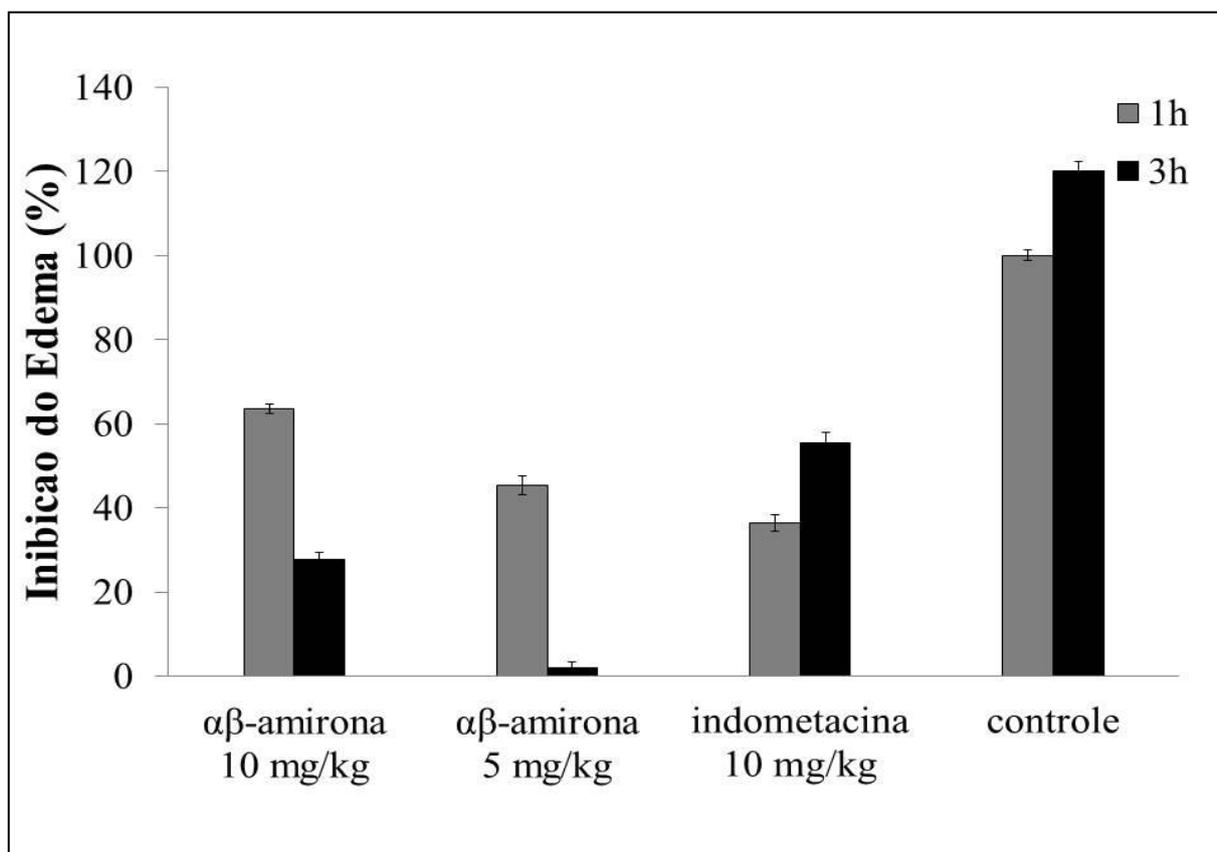


Figura 11: Efeito do tratamento com o triterpeno α,β -amirona nas doses de 5 e 10 mg/kg sobre o edema de pata induzido por carragenina até 5 horas. Cada barra equivale à média \pm D.P.M da diferença entre pata esquerda e direita de 5 animais. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo ANOVA complementadas com o teste de Dunnett, sendo que as diferenças significantes indicam por $p < 0,05$ quando comparadas com o grupo não tratado.

Os resultados obtidos neste estudo são compatíveis com o trabalho realizado por SALAMA E AVENDAÑO (2005) no qual avaliaram a δ -amirona utilizando as concentrações de 30, 60 e 100 mg/Kg. O triterpeno α,β -amirona mostrou a mesma atividade nas concentrações de 10 e 5 mg/Kg exercendo atividade diferente da indometacina, já que α,β -amirona mostrou um efeito máximo na primeira hora após a administração da carragenina com um decréscimo em relação ao tempo, enquanto que a indometacina em doses de 10 mg/Kg mostrou uma atividade maior na terceira hora de indução da inflamação, tempo em que a carragenina começa a mostrar seu maior efeito inflamatório, diminuindo na quinta hora, o que indica um efeito mais rápido de α,β -

amirona, devido talvez uma maior e mais rápida absorção do organismo, sendo isto uma consequência das características apolares típicas de compostos com natureza química triterpênica.

Neste trabalho foi possível verificar que os compostos triterpênicos α,β -amirina, α,β -amirina-acetilada, α,β -amirona e breína/maniladiol são capazes de induzir uma resposta imune. Em especial, o triterpeno α,β -amirona não apresentou potencial citotóxico sobre a linhagem de macrófagos murino J774 e exerce atividade imunomoduladora em baixas concentrações, caracterizada por efeitos inibitórios sobre a produção de mediadores pró-inflamatórios como NO^{*}, IL-6, expressão de COX-2, indução da produção da citocina anti-inflamatória IL-10 e reduziu o edema de pata induzido por carragenina em ratos nas primeiras 2 horas. De acordo com a literatura, poucos são os estudos que relatam a atividade antiinflamatória do triterpeno α,β -amirona. Este estudo pode fornecer uma base para investigações futuras sobre o papel terapêutico da α,β -amirona no tratamento da inflamação.

6. Conclusões

Os compostos triterpênicos isolados de óleo resina de *Protium paniculatum* não apresentaram redução significativa na viabilidade de macrófagos murinos da linhagem J774 após 24 horas de tratamento, com exceção do triterpeno breína/maniladiol que apresentou potencial citotóxico moderado.

Os triterpenos α,β -amirina, α,β -amirina-acetilada, α,β -amirona e breína/maniladiol são capazes de induzir uma resposta imune. Embora apenas o triterpeno α,β -amirina tenha sido capaz de inibir a produção de TNF- α , todos os outros compostos triterpênicos apresentaram efeitos inibitórios sobre a produção de mediadores pró-inflamatórios como NO \cdot , IL-6, IFN- γ e induziram a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 em macrófagos murinos da linhagem J774 estimulados por LPS.

O triterpeno α,β -amirona foi capaz de inibir a expressão de COX-2 de forma dose dependente. Da mesma forma, reduziu o edema de pata induzido por carragenina em ratos.

Este estudo trouxe informações sobre os efeitos antiinflamatórios dos triterpenos isolados de óleo resina de *Protium paniculatum*, em especial o triterpeno α,β -amirona que por induzir uma resposta imunomoduladora pode representar um futuro protótipo para o tratamento da inflamação.

7. Referências Bibliográficas

ABDELWAHAB, S. I.; KOKO, W. S.; TAHA, M. M. E.; MOHAN, S.; ACHOUI, M.; ABDULLA, M. A.; MUSTAFA, M. R.; AHMAD, S.; NOORDIN, M. I.; YONG, C. L.; SULAIMAN, M. R.; OTHMAN, R.; HASSAN, A. A. In vitro and in vivo anti-inflammatory activities of columbin through the inhibition of cyclooxygenase-2 and nitric oxide but not the suppression of NF- κ B translocation. *European Journal of Pharmacology*, v. 678, p. 61–70, 2012.

ADER, J. L.; CARRÉ, F.; DINH-XUAN, A. T.; DUCLOS, M.; KUBIS, N.; MERCIER, J.; MION, F.; PRÉFAUT, C.; ROMAN, S. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

ALENCAR, M. M. A.; ROCHA, M. F. G.; PINHEIRO, D. C. S. N. Inflamação e sua modulação por antiinflamatórios não esteróides: riscos e benefícios. *Ciência Animal*, v. 15, n. 1, p. 33-41, 2005.

AMDEKAR, S.; ROY, P.; SINGH, V.; KUMAR, A.; SINGH, R.; SHARMA, P. Anti-inflammatory activity of lactobacillus on carrageenan-induced paw edema in male wistar rats. *International Journal of Inflammation*, article id 752015, 2012.

ARAGAO, G. F.; CARNEIRO, L. M.; JUNIOR, A. P.; VIEIRA, L. C.; BANDEIRA, P. N.; LEMOS, T. L.; VIANA, G. S. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of α - and β -amyrin from *Prothium hepataphyllum* (Aubl.) March. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, v. 85, n. 4, p. 827-834, 2006.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.

BANDEIRA, P. N.; PESSOA, O. D. L.; TREVISAN, M. T. S.; LEMOS, T. L. G. Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* March. *Química Nova*, v. 25, n. 6, p. 1078-1080, 2002.

BISKUP, E.; GOŁĘBIEWSKI, M.; GNIADOCKI, M.; STEPNOWSKI, P.; LOJKOWSKA, E. Triterpenoid α -amyrin stimulates proliferation of human keratinocytes but does not protect them against UVB damage. *Biochimica Polonica*. v. 59, n. 2, p. 255-260, 2012.

BOURJOT, M.; LEYSSEN, P.; EYDOUX, C.; GUILLEMOT, J.C.; CANARD, B.; RASOANAIVO, P.; GUÉRITTE, F.; LITAUDON, M. Chemical constituents of *Anacolosa pervilleana* and their antiviral activities. *Fitoterapia*. v.83, n.6, p. 1076-1080, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976..

BRUNETTI, M. C.; FERNANDES, M. I.; MORAES, R. G. Fundamentos da Periodontia: teoria e prática. 1. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2007.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal and Biological Research*, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Parte I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor κ B (NF- κ B). *Plant Med.* v. 69, p. 973-983, 2003.

CARVALHO, J. C. T. Constituintes de plantas com atividade anti-inflamatória. CARVALHO, J.C.T. In: Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. São Paulo: Tecmedd, 2004.

CLARKSON, M. R.; MCGINTY, A.; GODSON, C.; BRADY, H. R. Leukotrienes and lipoxins: lipoxygenase-derived modulators of leukocyte recruitment and vascular tone in glomerulo nephritis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 13, p. 3043-3051, 1998.

COTA, B. B.; JOHANN, S.; OLIVEIRA, D. M.; SIQUEIRA, E. P.; SOUZA FAGUNDES, E. M.; CISALPINO, P. S.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L. Biological potential of *Stillingia oppositifolia*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. v. 21, n. 1, p. 70-77, 2011.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonóides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual de Química*, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

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

D'ANDREA, B. A.; AMEZAGA, M. A.; N. M. VALIANTE, MA, X.; KUBIN, M.; TRINCHIERI, G. Interleukin 10 (il-10) inhibits human lymphocyte interferon 3,- production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *Journal Exp. Med.* v. 178, p. 1041-1048, 1993.

DEFORGE, L.E.; REMICK, D.G. Kinetics of TNF, IL-6, and IL-8 gene expression in LPS-stimulated human whole blood. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 174, n. 1, p. 18-24, 1991

DEHARO, E.; BOURDY, G.; QUENEVO, C.; MUÑOZ, V.; RUIZ, G.; SAUVAIN, M. A. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary

approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 77, n. 1, p. 91- 98, 2001.

DUDHGAONKAR, S.; THYAGARAJAN, A.; SLIVA, D. Suppression of the inflammatory response by triterpenes isolated from the mushroom *Ganoderma lucidum*. *International Immunopharmacology*. v. 9,p. 1272–1280, 2009.

DUNDER, Ricardo José. Avaliação das atividades analgésica e antiinflamatória da fração hexânica *Agave sisalana*. 2009. 89f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Campinas, Campinas.

EIVAZI-ZIAEI, J.; DASTGARI, S. Role of myeloperoxidase index in differentiation of megaloblastic and aplastic anaemia. *Indian Journal of Medical Sciences*, v. 58, p. 345–348, 2004.

FAN, S. Y.; ZENGA, H. W.; PEIB, Y. H.; LI, L.; YEA, J.; PANA, Y. X.; ZHANGA, J. G.; YUANA, X.; ZHANGA, W. D. The anti-inflammatory activities of an extract and compounds isolated from *Platycladus orientalis* (Linnaeus) Franco in vitro and ex vivo. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 141, p. 647–652, 2012.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Mediciniais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. *Multiciência*, outubro/2006.

FOURNET, A.; ANGELO, A.; MUÑOZ, V.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVEA. Biological and chemical studies of *Pera benesis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 37, n. 2, p. 159-164, 1992.

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

GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research Therapy*. v. 8, n. 2, 2006.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N nitrates] in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v. 26, p. 131-138, 1982.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Shared Principles in NF-κB Signaling. *Cell*, v. 132, p. 344-363, 2008.

HODGE, D. R.; HURT, E. M.; FARRAR, W. L. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *European Journal of Cancer*. v.41, p. 2502–2512, 2005.

- IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. Ursolic acid: an anti- and pro-inflammatory triterpenoid. *Mol Nutr Food Res.* v. 52, n. 1, p. 26-42, 2008.
- IWALEWA, E. O.; MCGAW, L. J.; NAIDOO, V.; ELOFF, J. N. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology*, v. 6, n. 25, p. 2868-2885, 2007.
- KATERERE, D. R.; GRAY, A. I.; NASH, R. J.; WAIGH, R. D. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. *Phytochemistry*, v. 63, n.1, p.81-88, 2003.
- KHALID, S. A. Chemistry of the Burseraceae. In: WATERMAN, P.G.; GRUNDUM, M. F. Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales. *Academic Press*, p. 281-299, 1983.
- KNAPP, S. LPS and bacterial lung inflammation models. *Drug Discovery Today: Disease Models*, vol. 6, n. 4, 2009.
- KUWATA, H.; WATANABE, Y.; MIYOSHI, H.; YAMAMOTO, M.; KAISHO, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. IL-10-inducible Bcl-3 negatively regulates LPS-induced TNF- α production in macrophages. *Blood*. v.102, p. 4123-4129, 2003.
- LAM, J.; HERANT, M.; DEMBO, M.; HEINRICH, V. Baseline mechanical characterization of J774 macrophages. *Biophys J.*, v. 96, n. 1, p. 248-54, 2009.
- LAZZARINI, R.; MALUCELLI, B. E.; MUSCARA, M. N.; DE NUCCI, G.; PALERMO-NETO, J. Reduction of inflammation in rats by diazepam: tolerance development. *Life Science*, v. 71, p. 2361-2368, 2003.
- LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. *Pharmacology*, v. 53, p. 597-652, 2001.
- LEE, E. J.; KIM, J. S.; KIM, H. P.; LEE, J. H.; KANG, S. S. Phenolic constituents from the flower buds of *Lonicera japonica* and their 5-lipoxygenase inhibitory activities. *Food Chemistry*, v. 120, p. 134-139, 2010.
- LEE, S.W.; YUN, B. R. KIM, M. H.; PARK, C. S.; LEE, W. S.; OH, H. M.; RHO, M. C. Phenolic compounds isolated from *Psoralea corylifolia* inhibit IL-6-induced STAT3 activation. *Planta Med*, v. 78, p. 903-906, 2012.
- LEVY, B. D.; CLISH, C. B.; SCHMIDT, B.; GRONERT, K.; SERHAN, C. N. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nature Immunology*, v. 2, p. 612-619, 2001.

LI, R. W.; LIN, G. D.; LEACH, D. N.; WATERMAN, P. G.; MYERS, S. P. Inhibition of COXs and 5-LOX and activation of PPARs by Australian *Clematis* species (Ranunculaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 104, p. 138–143, 2006.

LIMA-JUNIOR, R. C. P.; OLIVEIRA, F. A.; GURGEL, L. A.; CAVALCANTE, I. J. M.; SANTOS, K. A.; CAMPOS, D. E. Attenuation of visceral nociception by alpha- and beta-amyrin, a triterpenoid mixture isolated from the resin of *Protium heptaphyllum*, in mice. *Planta Medica*, v. 72, p. 34-39, 2006.

LIN, K., HUANG, A., TU, H., LEE, L., WU, C., HOUR, T., YANG., S., PU., Y.; LIN, C. Xanthine oxidase inhibitory triterpenoid and phloroglucinol from guttiferaceous plants inhibit growth and induced apoptosis in human NTB1 cells through a ROS dependent mechanism, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 407-414, 2011.

MAIA, R. M.; BARBOSA, P. R.; CRUZ, F. G.; ROQUE, N. F.; FASCIO, M. Triterpenos da resina de *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae): caracterização em misturas binárias. *Química Nova*, v. 23, n. 5, p. 623-626, 2000.

MARQUES, Márcia Farias. Estudo da resposta imunológica induzida por *Arnica montana* L. 2006. 112f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

MEDEIROS, R.; OTUKI, M. F.; AVELLAR, M. C. W.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene α -amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *European Journal of Pharmacology*, v. 559, n. 3, p. 227-235, 2007.

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response, *Nature*, v. 449, p. 819-826, 2007.

MELO, C. M.; CARVALHO, K. M. M. B.; NEVES, J. C. S.; MORAIS, T. C. X, RAO, V. S.; SANTOS, F. A.; BRITO, G. A. C.; CHAVES, M. H. α,β -amyrin, a natural triterpenoid ameliorates L-arginine induced acute pancreatitis in rats. *World Journal Gastroenterology*. v.16, n. 34, p. 4272-4280, 2010.

NAKAYAMA, G. R.; CATON, M. C.; NOVA, M. P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar blue assay for cellular growth and viability in vitro. *Journal of Immunological Methods*, n. 204, p. 205–208, 1997.

NAUSEEF, W. M. How human neutrophils kill and degrade microbes: anintegrated view. *Immunological Reviews*, v. 219, p. 88–102, 2007.

NIU, X. F.; LIU,X.; PAN, L.; QI, L. Oleanene triterpenes from *Sedum lineare* Thunb. *Fitoterapia*. v.82, p. 960–963, 2011.

OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA JUNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; FLORENCIO, M. G.; LIMA JUNIOR; R. C. P.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Gastroprotective effect of the mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum*: role of capsaicin sensitive primary afferent neurons. *Planta Medica*, v. 70, n. 8, p. 780-782, 2004a.

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

OTTO, A.; SIMONEIT, B. R.T.; REMBER, W. C. Conifer and angiosperm biomarkers in clay sediments and fossil plants from the Miocene Clarkia Formation, Idaho, USA. *Organic Geochemistry*. v. 36, p. 907–922, 2005.

OTUKI, M. F.; FERREIRA, J.; LIMA, F. V.; MEYRE-SILVA, C.; MALHEIROS, A.; MULLER, L. A. et al. Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 313, n. 1, p. 310-318, 2005.

OTUKI, M. F.; LIMA, F. V.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Evaluation of the antinociceptive action caused by ether fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium kleinii*. *Life Sciences*, v. 69, n. 19, p. 2225-2236, 2001.

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

PATHAK, A.K.; BHUTANI, M.; NAIR, A. S. Ursolic Acid inhibits STAT3 activation pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human multiple myeloma cells. *Molecular Cancer Research*. v.5, p. 943-955, 2007.

PAVLOV V. A.; TRACEY, K. J. Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Biochemical Society Transactions*, v. 34, p. 1037-1040, 2006.

PERTINO, M.; SCHMEDAHIRSCHMANN, G.; RODRIGUEZ, J.A.; THEODULOZ, C. Gastroprotective effect and cytotoxicity of semisynthetic Jatrophaolone derivatives. *Planta Med.* v. 73, p. 1095-1100, 2007.

PINTO, S. A. H.; PINTO, L. M. S.; CUNHA, G. M. A.; CHAVES, M. H.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Anti-inflammatory effect of α , β -Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. *Inflammopharmacology*. v. 16, p. 48–52, 2006.

POKHAREL, Y. R.; YANG, J. W.; KIM, J. Y.; OH, H. W. H. G.; JEONG, E. R.; WOO, E. R.; KANG, K. W. Potent inhibition of the inductions of inducible nitric oxide

synthase and cyclooxygenase-2 by taiwaniaflavone. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, v. 15, p. 217-225, 2006.

PONTES, W. J. T.; DE OLIVEIRA, J. C. S.; DA CÂMARA, C. A. G.; LOPES, A. C. H. R.; GONDIM JÚNIOR, M. G. C.; DE OLIVEIRA, J. V.; SCHWARTZ, M. O. E. Composition and acaricidal activity of the resin's essential oil of *Protium bahianum* Daly against two spotted spider mite (*Tetranychus urticae*). *Journal of Essential Oil Research*, 19, 379-383, 2007

RANKIN, J. A. Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clinical Issues*, v. 15, p. 3-17, 2004.

REDDY, D. B.; REDDY, T. C. M.; SHARAN, G. J. S.; PRIYA, N.; LAKSHMIPATHI, V.; REDDANNA, P. Chebulagic acid, a COX–LOX dual inhibitor isolated from the fruits of *Terminalia chebula* Retz., induces apoptosis in COLO-205 cell line. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 124, p. 506–512, 2009.

RÍOS, J. L. Effects of triterpenes on the immune system. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 128, n. 1, p. 1-14, 2010.

SAGIN, F.G., SOZMEN, E.Y., ERSOZ, B., MENTES, G. Link Between Monoamine Oxidase and Nitric Oxide. *NeuroToxicology*. v. 25, n. 1-2, p. 91-99, 2004.

SALAMA, A. M.; AVENDAÑO, I. Y. Actividad antiinflamatoria de δ -amirona y 4', 7-dimetoxiapigenina aislados de *Alnus acuminata*. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.* v. 34, n. 2, p. 117-121.

SANCHEZ, A. M.; JIMENEZ ORTIZ, V.; SARTOR, T.; TONN, C. E.; GARCIA, E. E.; NIETO, M.; BURGOS, M. H.; SOSA, M. A. A novel icetexane diterpene, 5-epi-icetexone from *Salvia gilliessi* is active against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, v. 98, n. 2, p. 118-124, 2006.

SANTANGELO, C.; VARI, R.; SCAZZOCCHIO, B.; DI BENEDETTO, R.; FILESI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanità*, v. 43, n. 4, p. 394-405, 2007.

SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Analysis of Inflammation. *Annual Review of Biomedical Engineering*, v. 8, p. 93-151, 2006.

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

SCHWARZ, B. C.; HOVEN, R. V. D.; SCHWENDENWEIN, I. Diagnostic value of the neutrophil myeloperoxidase index in horses with systemic inflammation. *The Veterinary Journal*, v. 191, 72–78, 2012.

SELIGMANN, I. C. The Anticancer Homeopathic Composite Canova Method is not Genotoxic for Human Lymphocytes in vitro. *Genetics and Molecular Research*, v. 30, p. 36-42, 2003.

SHIH, M. F.; CHENG, Y. D.; SHEN, C. R.; CHERNG, J. Y. A molecular pharmacology study into the anti-inflammatory actions of *Euphorbia hirta* L. on the LPS-induced RAW 264.7 cells through selective iNOS protein inhibition. *Journal Nat Med*, v. 64, p. 330–335, 2010.

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

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

SIANI, A. C.; NAKAMURA, M. J.; TAPPIN, M. R. R.; MONTEIRO, S. S.; GUIMARÃES, A. C.; RAMOS, M. F. S. Chemical composition of south american burseraceae non-volatile oleoresins and preliminary solubility assessment of their commercial blend. *Phytochemical Analyses*.v. 23, p. 529–539, 2012.

SIMÃO DA SILVA, K. A. B.; PASZCUK, A. F.; PASSOS, G. F.; SILVA, E. S.; BENTO, A. F.; MEOTTI, F. C.; CALIXTO, J. B. Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene a,b-amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice. *Pain*. v.152, p. 1872–1887, 2011.

SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M. G.; LUIZ, A. P.; MARCON, R.; MEOTTI, F. C.; MIOTO, L. A.; SANTOS, A. R. S. Synthetic derivatives of the α - and β -amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 6, p. 3377-3386, 2008.

SOLEDADE, Cinira Santana. O efeito do DMA (composto quinazolínico) sobre o processo inflamatório. 2008. 96f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SÜLEYMAN, H.; DEMIRCAN, B.; KARAGÖZ, Y.; ÖSTASAN, N.; SÜLEYMAN, B. Anti-inflammatory effects of selective COX-2 inhibitors. *Polish Journal of Pharmacology*, v. 56, p. 775-780, 2004.

SUSUNAGA, G. S.; SIANI, A. C.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A.; DELLE MONACHE, F. Triterpenes from the resin of *Protium heptaphyllum*. *Fitoterapia*, v. 72, n. 6, p. 709-711, 2001.

UKIYA, M.; AKIHISAA, T.; TOKUDAB, H.; SUZUKIA, H.; MUKAINAKAB, T.; ICHIISHIB, E.; YASUKAWAC, K.; KASAHARA, Y.; NISHINO, H. Constituents of compositae plants III. Anti-tumor promoting effects and cytotoxic activity against human cancer cell lines of triterpene diols and triols from edible chrysanthemum flowers. *Cancer Letters*. v.177, p. 7–12, 2002.

VAJJA, B. N. L.; JULURI, S.; KUMARI, M.; KOLE, L.; CHAKRABARTI, R.; JOSHI, V., D. Lipopolysaccharide – induced paw edema model for detection of cytokine modulating anti-inflammatory agents. *Intern. Immunopharmacology*, v. 4, p.901-909, 2004.

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

VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; CARVALHO, A. A.; GONZAGA, W. A.; CHAVES, M. H. Cromatografando em coluna com resina de almécega: um projeto para química orgânica experimental. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 491-493, 2007.

VIJI, V.; HELEN, A. Inhibition of lipoxygenases and cyclooxygenase-2 enzymes by extracts isolated from *Bacopa monniera* (L.)Wettst. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 118, p. 305-311, 2008.

VITALE, R. F.; RIBEIRO, F. A. C. O papel do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. *Revista Brasileira Otorrinolaringologia*. v.73, n.1, p. 123-127, 2007.

VITOR, C. E.; FIGUEIREDO, C. P.; HARA, D. B.; BENTO, A. F.; MAZZUCO, T. L.; CALIXTO, J. B. Therapeutic action and underlying mechanisms of a combination of two pentacyclic triterpenes, α and β -amyrin, in a mouse model of colitis. *British Journal of Pharmacology*, v. 157, p. 1034–1044, 2009.

VODOVOTZ, Y.; CHOW, C. C.; BARTELS, J.; LAGOA, C.; PRINCE, J. M.; LEVY, R. M.; KUMAR, R.; DAY, J.; RUBIN, J.; CONSTANTINE, G.; BILLIAR, T. R.; FINK, M. P.; CLERMONT, G. In silico models of acute inflammation in animals. *Shock*, v. 26, n. 3, p. 235-244, 2006.

WENIGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G. J.; DEHARO, E.; ARAGÓN, R.; MUÑOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 78, n. 2/3, p. 193-200, 2001

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenan induced odema in hind paw of rats as an assay for anti-inflammatory drugs. *Biology and Medicine*, v. 111, p. 544-547, 1963.

YEDGAR, S.; COHEN, Y.; SHOSEYOV, D. Control of phospholipase A2 activities for the treatment of inflammatory conditions. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1761, p. 1373-1382, 2006.

YOON, J. H.; BAEK, S. J. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Medical Journal*, v. 46, n. 5, p. 585-596, 2005.

ZDZISIŃSKA, B.; RZESKI, W.; PADUCH, R.; CIESIELSKA, A. S.; KACZOR, J.; WEJKSZA, K.; SZERSZEŃ, M. K. Differential effect of betulin and betulinic acid on cytokine production in human whole blood cell cultures. *Polish Journal of Pharmacology*. v. 55, p. 235-238, 2003.

ANEXO



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



UFAM

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 116/2012- CEEA sobre o "Avaliação da atividade anti-inflamatória de triterpenos isolados de óleo-resinas de *Protium paniculatum*" sob a responsabilidade da pesquisador Prof. Dr. Emerson Silva Lima, está de acordo com Legislação Federal pertinente ao uso científico de animais e foi **APROVADO** pelo COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEAFAM) em reunião de 11/01/2013.

Manaus 15 de janeiro de 2013