

**LEILA SERVAT**

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTICÂNCER *IN VITRO* DE  
MICROENCAPSULADOS PRODUZIDOS COM EXTRATO BRUTO E  
VOUACAPANOS OBTIDOS DAS SEMENTES DE *Pterodon*  
*pubescens* Benth.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Orientador: Prof.(a) Dr.(a) Mary Ann Foglio

Co-Orientador: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho e Prof. Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues.

Piracicaba  
2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª / 6159

Se69a Servat, Leila.  
Atividade antinociceptiva e anticâncer *in vitro* de microencapsulados produzidos com extrato bruto e vouacapanos obtidos das sementes de *Pterodon pubescens* Benth. / Leila Servat. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.

Orientadores: Mary Ann Foglio, João Ernesto de Carvalho, Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. *Spray dryer*. 2. Estabilidade. I. Foglio, Mary Ann. II. Carvalho, João Ernesto de. III. Rodrigues, Rodney Alexandre Ferreira. IV. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. V. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Antinociceptive and *in vitro* anticancer activity of microencapsulated extracts and vouacapanos isolated from *Pterodon pubescens* Benth. seeds

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. *Spray dryer*. 2. Stability

Área de Concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca Examinadora: Mary Ann Foglio, Patrícia Corrêa Dias, Priscila Gava Mazzola

Data da Defesa: 25-02-2010

Programa de Pós-Graduação em Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 25 de Fevereiro de 2010, considerou a candidata LEILA SERVAT aprovada.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. MARY ANN FOGLIO

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. PATRÍCIA CORRÊA DIAS

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. PRISCILA GAVA MAZZOLA

**Dedico este trabalho aos meus pais,  
Ivani e Marino, e ao meu irmão Evandro.**

## **AGRADECIMENTOS**

À querida Mary Ann, exemplo de orientadora, chefe, amiga...exemplo de vida... agradeço pela paciência e dedicação, que superaram as minhas expectativas, e aos ensinamentos prestados, que foram muito além da química...

Ao amigo Rodney, pela co-orientação e por sempre estar disposto a ajudar, além de tornar nossos dias na fitoquímica mais alegres...

Ao amigo João Ernesto, pela co-orientação, apoio concedido e conhecimentos prestados...

À UNICAMP (FOP e CPQBA), pela estrutura e oportunidades oferecidas...

À FAPESP pela bolsa de mestrado e auxílio à pesquisa...

A CAPES e CNPq pelos financiamentos e bolsas concedidas...

A todos os professores, funcionários e colegas da FOP, em especial às funcionárias Elisa e Eliane, sempre dispostas a ajudar...

A todos os alunos, funcionários, técnicos e estagiários do CPQBA, em especial Carmem, Amanda, Johnny, Day, Leilane, Willian, Márcio, Naty, Millery, Jeh, Carol da divisão de fitoquímica e Gabi, Michele, Van, Gio, Deb, Lari e Yvonne da divisão de farmacologia, pela paciência, amizade e companherismo...

Aos amigos Núbia, Karina, Caio e Diego, que participaram diretamente desse trabalho com colaboração ímpar e fundamental, obrigada por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar...

À querida Ilza, sinônimo de eficiência e comprometimento, sua ajuda foi indispensável para realização desse trabalho...

Às amigas Ana Lúcia, Ana P., Karin e Sirlene, pela amizade e apoio no desenvolvimento das atividades na divisão de farmacologia-CPQBA...

Ao amigo Humberto, pela colaboração imprescindível e conhecimentos prestados, além do incentivo para o ingresso na área acadêmica...

À Deus, por iluminar meus caminhos, decisões e por sempre colocar pessoas especiais em minha vida...

Aos meus pais e ídolos Ivani e Marino, por acreditarem e apostarem em mim, pelo amor incondicional e pelos ensinamentos de vida e à querida vó Carmelina, pelo carinho e orações...

Ao meu irmão Evandro, pelo apoio e por sonhar comigo os meus sonhos e a minha cunhada, que amo como irmã, Céres, sempre atenciosa e receptiva...

Aos meus sobrinhos amados Frankleen, Evandro e Gabriel, por tornarem os meus dias mais leves...

Ao meu anjo Giulio, meu alicerce, meu porto seguro... agradeço a paciência, o companheirismo, a maneira doce com que me ensina a ver a vida e por estar me fazendo uma pessoa melhor...amo você...

Aos amigos de Pira, pela amizade e acolhida, em especial a querida Iza, que esteve presente quando eu mais precisei...

Às gurias da rep., queridas Amanda, Cami, Tan e em especial Rafa e Ro, pelo apoio total e por acompanharem de perto o andamento desse trabalho...

Às famílias Wiziack, Zago e Medina, por me receberem de braços abertos, pelos encontros, festas, jogatinas... Pat, obrigada por me proporcionar esse vínculo e pela força nesses dois anos...

Aos tios Ana, Maria Ester, Zé e Hélio, pelos deliciosos bolos, cookies, sucos, chocolates belgas, além dos tradicionais "potinhos", sempre recheados de sabores e carinho...

Aos amigos e professores da UEPG... Vivi, obrigada pelo apoio e sincera amizade...

A todos os amigos da saudosa Drogamed, em especial ao querido Vitinho, pela confiança em mim depositada e o incentivo para que eu chegasse até aqui...

A todos meus amigos e familiares, de longe ou de perto, que acreditam e torcem por mim...

Muito Obrigada!

*“De tudo ficam três coisas: a certeza que estamos sempre começando... a certeza de que precisamos continuar... a certeza que seremos interrompidos antes de terminar... portanto devemos fazer da interrupção, um caminho novo...da queda, um passo de dança...do medo, uma escada...do sonho, uma ponte...da procura, um encontro.”*

Fernando Sabino

## RESUMO

As plantas medicinais têm sido fonte de agentes medicinais há milhares de anos para o tratamento de um amplo espectro de doenças. Entre as alternativas que podem ser utilizadas para preservar as características do material vegetal, destaca-se a encapsulação em micropartículas. Estudos prévios com espécie *Pterodon pubescens* Benth. (sucupira) avaliaram a eficácia (ação antiinflamatória e antinociceptiva) e a segurança (eventuais efeitos toxicológicos) dos extratos, frações ativas e compostos isolados de *P. pubescens*. No presente trabalho, avaliou-se o benefício do processo de microencapsulação por *spray drying* para preservação das características químicas, aliado a ações biológicas *in vitro* e *in vivo* dos extratos e compostos isolados. Extratos brutos produzidos com sementes provenientes de Minas Gerais (EBMG), Bahia (EBBA), Mato Grosso (EBMT) ou São Paulo (EBSP) apresentaram perfil químico distinto, demonstrando a variabilidade química da espécie de diferentes procedências. A partir dos extratos EBMG e EBSP foram isolados os vouacapanos C1 e C2, ambos com atividade antinociceptiva, sendo que a atividade de C1 esteve mais relacionada a componentes de dor neurogênica. C1 e os extratos EBBA, EBSP e EBMT foram microencapsulados por *spray drying* e, juntamente com as amostras livres, armazenados em câmara climática com umidade e temperatura controladas para o estudo de estabilidade. Os resultados dos ensaios de atividade anticâncer *in vitro* em células tumorais humanas e atividade antinociceptiva em modelos com camundongos, demonstraram que a técnica de microencapsulação por *spray drying* preservou a ação, tanto do composto isolado quanto dos extratos demonstrando ser uma alternativa útil para prolongar o tempo de estocagem, principalmente do extrato bruto. As vantagens apresentadas pelo processo de microencapsulação dos produtos obtidos a partir de *P. pubescens*, motivam a continuidade dos estudos de padronização com esta espécie, para viabilizar um produto que atenda a parâmetros de reprodutibilidade, eficácia e segurança.

## ABSTRACT

Over the years natural products, especially plants, have demonstrated to play a dominant role for drug discovery to treat human diseases. Micro encapsulation is an important approach to preserve natural products characteristics. Previous studies with *Pterodon pubescens* Benth., (sucupira) evaluated the efficacy (anti-inflammatory and antinociceptive) and safety (possible toxicological effects) of the extracts, active fractions and compounds isolated from *P. pubescens*. In the present study we evaluated the benefit of the microencapsulation process by *spray drying* to preserve the chemical characteristic monitored by *in vitro* and *in vivo* biological activities. Crude extracts obtained from Minas Gerais (EBMG), Bahia (EBBA), Mato Grosso (EBMT) or São Paulo (EBSP) seeds showed different quimical profiles. Vouacapans C1 and C2, isolated to EBMG and EBSP crude extracts, demonstrated antinociceptive activity, C1 activity related to neurogenic pain. The crude extracts EBBA, EBSP, EBMT and compound C1 were microencapsulated by *spray drying* and, along with control samples, stored in a climatic chamber with controlled humidity and temperature for the accelerated stability studies. The test results of *in vitro* anticancer activity in human tumor cells and antinociceptive activity in mice models, showed that the microencapsulation technique by *spray drying* preserve both the isolated compound and extracts. This technique is a useful alternative to extend storage time, especially of the crude extract. The advantages presented by *P. pubescens* microencapsulated products prompt to continue studies with this species, for the production of a product that meets reproductively, efficacy and safety parameters.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	3
2.1 <i>Pterodon pubescens</i> Benth. (sucupira) .....	3
2.2 Microencapsulação .....	8
2.2.1 Atomização ( <i>spray drying</i> ).....	10
2.1.2 Material formador de parede.....	11
2.3 Dor e Nocicepção.....	12
2.4 Câncer.....	17
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	19
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
4.1 Material .....	21
4.1.1 Drogas e Reagentes.....	21
4.1.2 Material Vegetal .....	21
4.1.3 Animais .....	22
4.2 Métodos .....	22
4.2.1 Estudos Fitoquímicos .....	22
4.2.1.1 Extração .....	23
4.2.1.2 Métodos Cromatográficos .....	23
4.2.1.2.1 Cromatografia em Camada Delgada .....	24
4.2.1.2.2 Cromatografia em Coluna Filtrante .....	24
4.2.1.2.3 Cromatografia em Coluna Clássica .....	25
4.2.1.2.4 Análise dos constituintes químicos por CG-EM (HP5975/HP6890) .....	25
4.2.2 Microencapsulação.....	26
4.2.2.1 Extração do recheio das microcápsulas .....	26
4.2.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura .....	27
4.2.2.3 Estudo de estabilidade .....	27
4.2.3 Avaliação Farmacológica.....	28
4.2.3.1 Atividade Anticâncer <i>in vitro</i> .....	28
4.2.3.2 Atividade Antinociceptiva .....	31
4.2.3.2.1 Avaliação da Atividade Locomotora ( <i>Open-field</i> ).....	31
4.2.3.2.2 Contorções abdominais induzidas por ácido acético .....	31
4.2.3.2.3 Algesia induzida por Formalina.....	32
4.2.3.2.4 Hiperalgesia (Randal Sellito).....	32
4.2.3.2.5 Alodínia induzida por CFA-Adjuvante de Freund.....	33
4.3 Análise Estatística.....	34
<b>5 RESULTADOS</b> .....	35
5.1 Estudos Fitoquímicos .....	35
5.1.1 Obtenção do Extrato Bruto.....	35
5.1.2 Fracionamento I .....	36

5.1.3 Fracionamento II .....	39
5.2 Ensaios Farmacológicos com os Compostos Isolados.....	42
5.2.1 Avaliação da Atividade Locomotora ( <i>Open-field</i> ) .....	42
5.2.2 Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético .....	42
5.2.3 Algesia induzida por Formalina .....	44
5.2.4 Hiperalgisia (Randal Sellito).....	46
5.2.5 Alodínia induzida por CFA.....	47
5.3 Estudos de Estabilidade.....	48
5.3.1 Microencapsulação da amostras.....	48
5.3.2 Estabilidade dos Extratos Brutos .....	50
5.3.2.1 Avaliação do Aspecto Físico.....	50
5.3.2.2 Monitoramento Químico .....	51
5.3.2.2 Atividade Antinociceptiva .....	57
5.3.3 Estabilidade da mistura dos isômeros (C1).....	60
5.3.3.1 Atividade anticâncer <i>in vitro</i> .....	60
5.3.3.2 Atividade Antinociceptiva .....	66
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	69
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	87
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	89
<b>ANEXO</b> .....	103

# 1 INTRODUÇÃO

A natureza, em especial as plantas, tem sido fonte de agentes medicinais para o tratamento de um amplo espectro de doenças há milhares de anos (Cragg *et al.*, 2009). O interesse na pesquisa de novas substâncias ativas de origem vegetal tem aumentado significativamente. Várias empresas privadas e organizações governamentais têm instituído projetos de pesquisa nesta área. Na década de 70, nenhuma das 250 maiores companhias do ramo farmacêutico do mundo mantinha qualquer programa de pesquisa na área de produtos naturais e atualmente, pelo menos metade delas introduziram este tipo de pesquisa como uma de suas prioridades. Na última década, este aumento expressivo no interesse em drogas derivadas de vegetais foi evidenciado pelo crescimento de publicações dessa linha de pesquisa, nas principais revistas científicas das áreas relacionadas (Newman & Cragg, 2007; Newman, 2008). As informações da natureza e de compostos que, embora formalmente sintéticos são derivados de produtos naturais, ou imitam estruturas de produtos naturais, podem ser usadas em uma variedade de maneiras para levar a novos compostos com possível potencial terapêutico (Newman, 2008).

Um exemplo relevante da importância de produtos naturais para inspiração de novos medicamentos foi o trabalho desenvolvido por Felix Hoffmann, na empresa Bayer, com a síntese do ácido acetilsalicílico. Há aproximadamente 3500 anos, os extratos da casca de salgueiro (uma das espécies que contém salicilina) eram indicados por médicos do antigo Egito, como remédio para reumatismo e dores nas costas. No século 19, a salicilina foi isolada desse extrato e posteriormente convertida em ácido salicílico (Nicolau & Montagnon, 2008). Hoffmann observou que muitos pacientes, que faziam uso de ácido salicílico isolado, apresentavam náuseas e sangramentos como efeitos colaterais, levando-o a suspeitar que fossem decorrentes da função ácida da molécula. Uma reação

de acetilação levou ao ácido acetilsalicílico que provou produzir efeitos colaterais menos agressivos (Rishton, 2008). A substância foi lançada no ano de 1899 e ganhou rapidamente o mercado (Nicolau & Montagnon, 2008).

Segundo Kinghorn *et al.* (2009), desde 1960 pequenas moléculas derivadas de produtos naturais (plantas e micro-organismos) têm fornecido um número significativo de quimioterápicos importantes. A pesquisa de produtos naturais, seja como extratos padronizados ou como compostos puros, tem como um de seus objetivos, a investigação científica para a obtenção de produtos mais eficazes e com menos toxicidade.

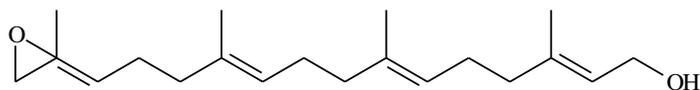
A garantia do uso seguro e eficaz de fitoterápicos e outros produtos oriundos de produtos naturais envolvem análises físico-químicas e microbiológicas de matérias-primas e do produto acabado, como etapa preliminar para alcançar um padrão de qualidade necessário a um medicamento (Corrêa *et al.*, 2006). Uma alternativa útil no prolongamento do tempo de estocagem de produtos alimentícios e farmacêuticos, sem perdas de suas características, é a microencapsulação por atomização que, apesar do aquecimento, não destrói seus componentes em razão do curto tempo de exposição ao calor (Rodrigues, 2005).

O presente trabalho deu continuidade aos estudos com a espécie *Pterodon pubescens* Benth., avaliando a influência da técnica de microencapsulação na estabilidade do extrato bruto e compostos isolados, por meio de estudos que englobaram monitoramento químico, ensaios de atividade anticâncer *in vitro* e atividade antinociceptiva em modelos animais.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Pterodon pubescens* Benth. (sucupira)

O gênero *Pterodon* compreende quatro espécies nativas do Brasil: *P. abruptus* Benth., *P. apparucuri* Pedersoli, *P. pubescens* Benth., (*P. emarginatus* Vogel) e *P. polygalaeflorus* Benth. O estudo dessas espécies foi motivado pela comprovação da atividade anti-cercariana do óleo do fruto de *P. pubescens* (Mors *et al.*, 1967), estando o composto 14,15-epoxigeranilgeraniol (Figura 1) e alguns derivados, associados com atividade protetora contra a penetração de cercárias de *S. mansoni*, quando aplicados topicamente na cauda de ratos (Dos Santos Filho *et al.*, 1972).

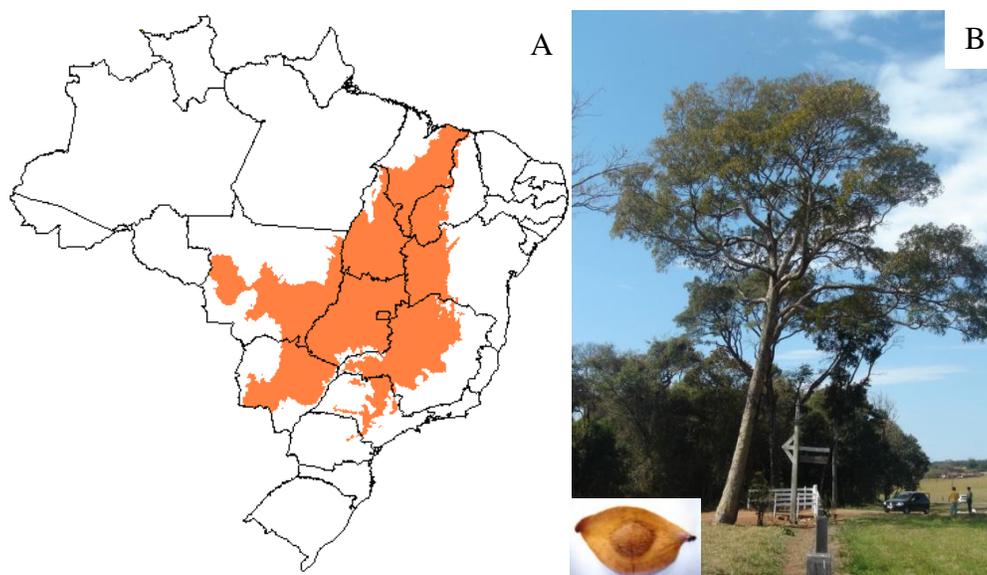


**Figura 1-** Estrutura molecular do composto 14,15-epoxigeranilgeraniol.

A espécie vegetal *Pterodon pubescens* Benth. (sinonímia botânica: *Pterodon emarginatus* Vog.) é uma árvore da família das *Leguminosae-Papillonoideae*, encontrada no cerrado brasileiro, principalmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Mato Grosso do Sul e conhecida popularmente como faveiro, sucupira-branca, fava-de-sucupira, sucupira ou sucupira-lisa. Esta espécie atinge de 8-16 metros, com tronco de 30-40 centímetros de diâmetro; possui folhas pinadas, com 20-36 folíolos de 3-4 centímetros de diâmetro (Lorenzi, 1998). A morfologia da semente é eurispérmica, variando entre ovóide, oblonga, elíptica e oblongo-elíptica; a coloração da testa varia de marrom-claro a marrom-escuro, quase negro (Figura 2) (Ferreira, 2001).

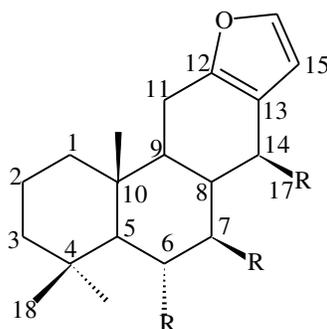
Um estudo etnobotânico realizado em 30 cidades do interior de Minas Gerais relatou o uso popular da espécie vegetal *P. pubescens* no tratamento de

reumatismo, dores de garganta, problemas da coluna, como tônico e depurativo (Carvalho, 2004).



**Figura 2-** A) Ilustração do território brasileiro com destaque para o cerrado (adaptado de IBGE, 2007); B) Foto da árvore e semente de *Pterodon pubescens* Benth. (sucupira).

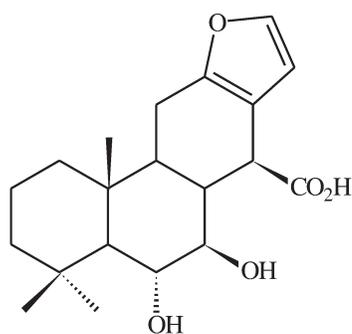
Estudos fitoquímicos com o gênero *Pterodon* revelaram a presença de alcalóides, isoflavonas e diterpenos. Diterpenos furânicos foram isolados e identificados dos frutos de *Pterodon* (Mahajan & Monterio, 1973; Fascio *et al.*, 1975; Campos *et al.*, 1994). Alguns autores têm sugerido que o esqueleto vouacapânico (Figura 3) de diterpenos furânicos esteja envolvido com as propriedades antiinflamatórias do óleo das sementes de *P. pubescens* (Nunan *et al.*, 1982; Carvalho *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2004).



**Figura 3-** Estrutura molecular do esqueleto vouacapânico e seus radicais (R).

Coelho *et al.* (2001) descreveram os efeitos do extrato hidroalcoólico das sementes de *P. pubescens* em modelo de artrite experimental e a ausência de toxicidade subaguda.

Silva *et al.* (2004) identificaram o composto ácido 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxivouacapano-17 $\beta$ -óico (Figura 4), na fração que exibiu atividade anti edematogênica nos ensaios de edema de pata induzido por carragenina ou edema de orelha induzido por óleo de cróton, sugerindo o envolvimento desse composto na atividade antiinflamatória das frações obtidas do óleo das sementes de *P. pubescens*.



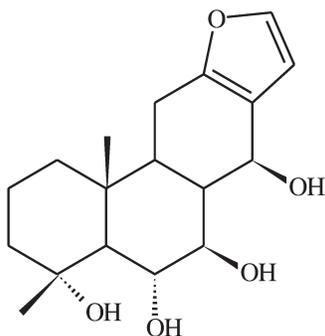
**Figura 4-** Estrutura molecular do composto ácido 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxivouacapano-17 $\beta$ -óico.

Duarte *et al.* (1996) demonstraram o efeito antinociceptivo de vouacapanos extraídos de *P. polygalaeflorus*, sugerindo que a atividade farmacológica é desencadeada pelo sistema catecolaminérgico. O envolvimento de mecanismos inibitórios tanto centrais como periféricos na atividade antinociceptiva de extratos das sementes de *P. pubescens* foi sugerida por Coelho *et al.* (2005).

Ainda no estudo da atividade antinociceptiva, Dutra *et al.* (2008) relataram a ação do óleo essencial e frações obtidas das sementes de *P. emarginatus*. O óleo essencial, frações hexânicas e butanólicas foram ativas no ensaio das contorções abdominais induzidas por ácido acético. Óleo essencial e fração metanólica mostraram-se efetivos em ambas as fases do ensaio da formalina, enquanto a

fração hexânica apresentou efeito no teste da placa quente (Dutra *et al.*, 2008).

A atividade antiproliferativa do extrato bruto etanólico das sementes de *P. pubescens* contra uma linhagem de melanoma humano, foi demonstrada por Vieira *et al.* (2008). O diterpeno vouacapano-6 $\alpha$ , 7 $\beta$ , 14 $\beta$ , 19-tetraol (Figura 5), isolado do extrato, demonstrou acentuada atividade citotóxica, sugerindo ser um promissor agente antiproliferativo por induzir apoptose.

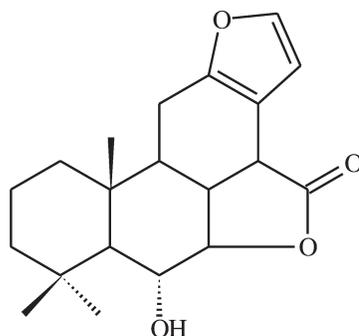


**Figura 5-** Estrutura molecular do composto vouacapano-6 $\alpha$ , 7 $\beta$ , 14 $\beta$ , 19-tetraol.

Spindola *et al.* (2009) relataram a atividade antiproliferativa de vouacapanos isolados do extrato diclorometânico das sementes de *P. pubescens*, indicando a seletividade desses compostos para linhagem de próstata testada. Paralelamente, Euzébio *et al.* (2009) demonstraram a atividade antiproliferativa do diterpeno furânico ácido 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxivouacapano-17 $\beta$ -óico (Figura 4), isolado do extrato hexânico dos frutos de *P. polygalaeiflorus*, e de seus derivados lactônicos obtidos por semisíntese, com destaque para o composto 6 $\alpha$ -hidroxivouacapano-7 $\beta$ ,17 $\beta$ -lactona (Figura 6) que apresentou alta seletividade para linhagens de ovário testadas. Constatou-se que a presença de hidroxila livre no carbono 6 e do anel lactônico 7 $\beta$ ,17 $\beta$  são importantes para atividade antiproliferativa desses compostos.

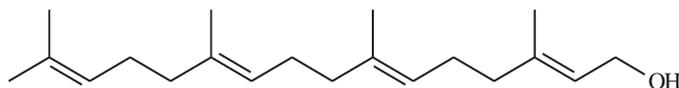
Outras ações foram identificadas nas espécies do gênero *Pterodon*, além das atividades antiproliferativas, antiinflamatórias e antinociceptivas descritas.

O extrato hexânico dos frutos de *P. polygalaeflorus* demonstrou atividade frente às larvas de *Aedes aegypti* podendo ser considerado um potencial agente larvicida (Pimenta *et al.*, 2006).



**Figura 6-** Estrutura molecular do composto 6 $\alpha$ -hidroxivouacapano-7 $\beta$ ,17 $\beta$ -lactona.

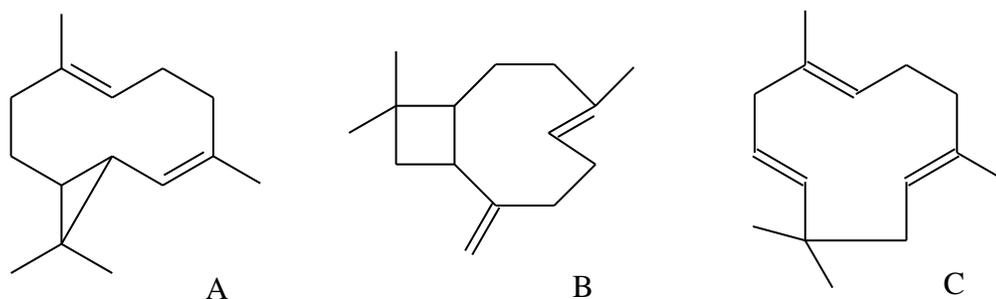
Calixto *et al.* (2007) demonstraram a atividade antiplaquetária do composto geranilgeraniol (Figura 7) isolado do óleo das frutas de *P. pubescens*, ação essa atribuída a inibição da enzima ciclooxigenase.



**Figura 7-** Estrutura molecular do composto geranilgeraniol.

Menna-Barreto *et al.* (2008) relataram a atividade contra *T. cruzi* de frações e do composto geranilgeraniol (Figura 7) obtidos do extrato etanólico de *P. pubescens*. No mesmo ano, Cardoso *et al.* demonstraram a atividade supressora de linfócitos T e B, relacionada à atividade antiinflamatória do extrato etanólico.

Dutra *et al.* (2009a) demonstraram a atividade cicatrizante da fração hexânica, obtida das sementes de *P. emarginatus*, no tratamento de queimaduras cutâneas em coelhos. Além da fração hexânica, rica no composto ácido 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxivouacapano-17 $\beta$ -óico (Figura 4), foi demonstrada a ação cicatrizante do óleo essencial, possivelmente atribuída aos compostos biciclogermacreno, *trans*-cariofileno e  $\alpha$ -humuleno (Figura 8) (Dutra *et al.*, 2009a).



**Figura 8-** Estrutura molecular dos compostos A) bicylogermacreno, B) *trans*-cariofileno e C)  $\alpha$ -humuleno.

O efeito antimicrobiano do óleo essencial obtido das sementes de *P. emarginatus* frente a *Staphylococcus aureus* e a atividade das frações hexânica e butanólica contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foi relatada por Dutra e colaboradores (2009b).

## 2.2 Microencapsulação

A microencapsulação é um processo onde um material formador de parede é utilizado para recobrir um recheio (pequenas partículas de sólidos, gotículas de líquido ou materiais gasosos), com o objetivo de isolar a substância de interesse, protegendo-a das condições adversas do meio como oxigênio, luz e umidade, aumentando assim, a vida útil do produto (Sparks, 1981; Shahidi & Han 1993).

O conceito de microcápsula surgiu da idealização do modelo de uma célula, onde a membrana controla as trocas com o meio externo (Ré, 2000). Nas microcápsulas, o material de parede atua como um filme protetor, podendo formar membranas contínuas ou porosas de diferentes tamanhos e formatos, dependendo do processo e do encapsulante utilizado (Salib, 1997; Ré, 2000).

O primeiro produto contendo material microencapsulado surgiu em 1954, com a produção de um papel de cópia sem carbono. Esse papel recebia uma fina camada de microcápsulas de uma tinta sem cor, que era recoberta por um reagente, também incolor. A pressão da ponta do lápis na superfície do papel rompia as microcápsulas liberando a tinta, que, ao entrar em contato com o reagente, tornava-se colorida. Na década de 50 também ocorreram as primeiras pesquisas na área farmacêutica, com a utilização das microcápsulas para aumentar a estabilidade física e química de uma droga ou para modificar sua liberação em locais específicos de ação (Ré, 2000; Wendel & Çelik, 1998).

As cápsulas podem ser classificadas de acordo com o tamanho em nanocápsulas (partículas menores que  $0,2 \mu\text{m}$ ), microcápsulas (partículas entre  $0,2$  e  $500 \mu\text{m}$ ) ou macrocápsulas (partículas maiores que  $500 \mu\text{m}$ ). De acordo com a arquitetura, podem ser do tipo reservatório, onde o núcleo fica concentrado próximo ao centro, rodeado por um filme contínuo, ou do tipo matriz, onde o núcleo é disperso uniformemente pela matriz (Ré, 1998).

Inúmeras técnicas permitem microencapsular um material ativo, podendo ser divididas em *métodos físicos*: atomização (*spray drying*), pulverização em banho térmico, leiteo fluidizado, extrusão centrífuga com múltiplos orifícios, co-cristalização e liofilização (*freeze drying*); *métodos químicos*: inclusão molecular e polimerização interfacial; *métodos físico-químicos*: coacervação, separação por fase orgânica, pulverização em agente formador de reticulação e envolvimento lipossômico (Jackson & Lee, 1991; Risch & Reineccius, 1988; Shahidi & Han, 1993).

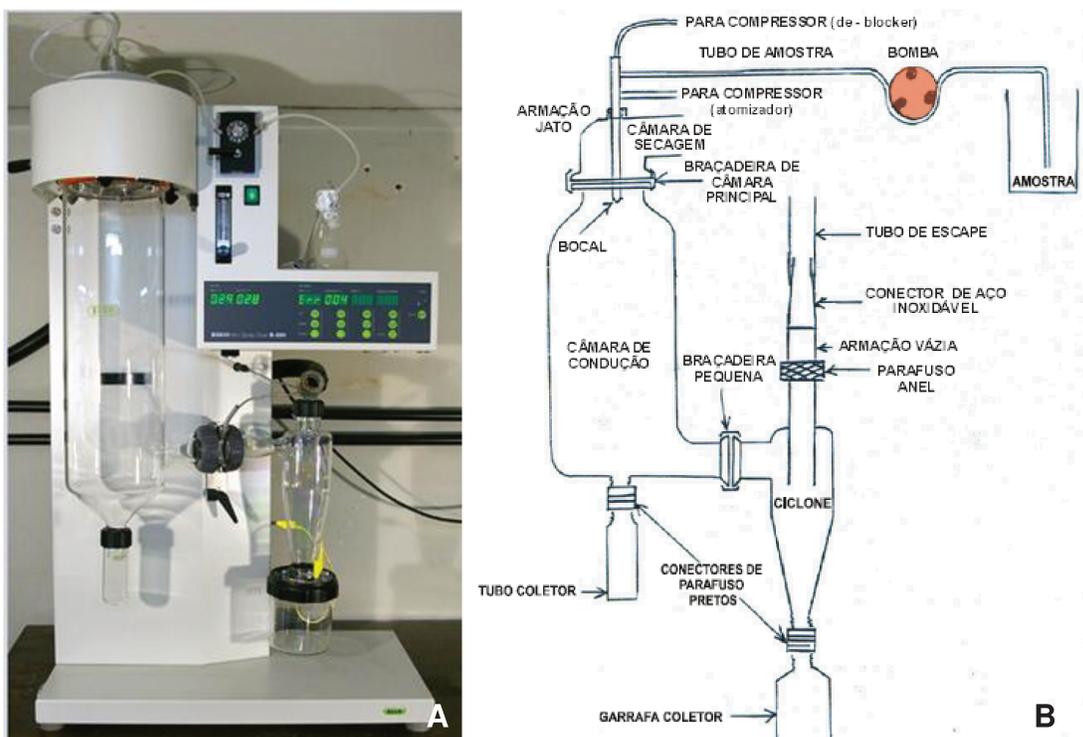
Segundo Wendel & Çelik (1998), Filková & Mujumdar (1995), embora o *spray drying* seja uma tecnologia inicialmente cara, em razão do alto custo do equipamento, muitas são as razões pelas quais ela é muito utilizada. As vantagens dessa tecnologia incluem: a obtenção de partículas de alta qualidade (uniformes e esféricas), a possibilidade de secar produtos à pressão atmosférica,

a facilidade em relação à produção de grandes volumes em operação contínua utilizando-se equipamentos de fácil operação, com boa eficiência, a ampla aplicabilidade e flexibilidade da técnica por permitir o processamento de várias matérias primas e a rapidez. Esses fatores somados possibilitam a comercialização de um produto de excelente qualidade a um custo relativamente baixo.

### **2.2.1 Atomização (*spray drying*)**

A secagem por atomização ou *spray drying*, pode ser definida como a transformação de um material fluido (solução, dispersão ou pasta) em partículas secas, na forma de pó (Ré, 1998). O processo é contínuo e envolve basicamente as seguintes etapas: formação de uma emulsão ou suspensão do agente encapsulante e do material ativo, atomização em uma câmara de secagem contendo ar quente circulando e evaporação do solvente, com consequente secagem das gotículas atomizadas (Jackson & Lee 1991; Shahidi & Han, 1993). Ao contrário do que se imagina a respeito de uma técnica que utiliza altas temperaturas, sua rápida evaporação mantém a temperatura das gotículas relativamente baixa, sem afetar o produto final (Filková & Mujumdar, 1995; Ré, 2000).

O *spray dryer* é um equipamento de simples utilização, amplamente empregado para a obtenção de microcápsulas. Uma maior produtividade pode ser obtida ajustando as variáveis do processo, entre elas: temperatura do ar de entrada e saída, fluxo de ar ou fluido de arraste, distribuição de temperatura e umidade (Filková & Mujumdar, 1995). O equipamento e o modelo esquemático de um *spray dryer* de bancada estão ilustrados na Figura 9.



**Figura 9-** Foto ilustrativa do equipamento (A) e do modelo esquemático de *spray dryer* de bancada (B- adaptado de Valduga *et al.*, 2003), utilizado na produção das microcápsulas.

### 2.1.2 Material formador de parede

A seleção do material formador de parede depende de uma série de fatores, entre eles a não reatividade com o material a ser encapsulado, as propriedades físico-químicas do material (como massa molar, solubilidade e difusibilidade), o processo utilizado para fabricação das microcápsulas e a aplicação final destas (Jackson & Lee, 1991).

Segundo Shahidi & Han (1993) e Ré (1998), um bom material formador de parede deve apresentar boa propriedade emulsificante e formadora de filmes, baixa viscosidade (mesmo em soluções com altas concentrações de sólidos), baixa higroscopicidade, boas propriedades de secagem, estabilidade, ausência de sabores desagradáveis e boa proteção do recheio.

Muitos materiais podem ser utilizados como encapsulantes, como: *carboidratos* (amidos, dextrinas e sacarose); *celuloses* (carboximetilcelulose, acetilcelulose, metilcelulose, etilcelulose e nitrocelulose); *lipídios* (parafina, cera, ácido esteárico, triesterina, monoglicerídeo, óleos, gordura hidrogenada e diglicerídeos); *proteínas* (glúten, caseína, isolado protéico de soro de leite, gelatina e albumina); *gomas* (alginato de sódio, carragena e goma arábica (Shahidi & Han, 1993), além da quitosana, extraída da casca de crustáceos (Suave, 2006).

A goma arábica, também conhecida como goma acácia, é um exsudato formado em resposta a algum dano na planta, extraído do tronco e ramos de espécies de *Acacia*, em especial *Acacia senegal* L. É vastamente utilizada como material encapsulante devido a sua excelente propriedade emulsificante, estabilizante e sua ação protetora contra oxidação (Buffo *et al.*, 2001).

A maltodextrina é, por definição, um amido modificado, obtido a partir da conversão do amido (BeMiller & Whisteler, 1996). Suas principais características são excelente proteção contra oxidação de voláteis encapsulados, ausência de capacidade emulsificante e baixa retenção de voláteis (Inglett *et al.*, 1988).

Para aumentar a efetividade da microencapsulação, misturas entre diferentes agentes encapsulantes são sugeridas (Ré 1998; Fernandes *et al.*, 2008; Bae & Lee, 2008). Os resultados obtidos por Thevenet (1995) indicaram que uma mistura 1:1 de goma arábica e maltodextrina foi quase tão eficiente quanto goma arábica pura para estabilização oxidativa de óleo essencial de laranja (Azeredo, 2005).

## **2.3 Dor e Nocicepção**

A dor é uma experiência subjetiva de difícil definição. Tipicamente é dita como uma resposta direta a um evento desfavorável, associado a um dano tecidual como lesão, inflamação ou câncer (Rang *et al.*, 2004). Ela normalmente

serve como um artifício de aviso, ou seja, um sistema de alarme responsável pela manutenção da integridade do organismo. A resposta nociceptiva é ativada somente por estímulos nocivos, atuando em um aparato sensorial especializado de alto limiar. Sendo assim, a nocicepção é essencial para a sobrevivência de organismos em ambientes potencialmente hostis (Scholtz & Woolf, 2002).

A percepção a estímulos nócicos (nocicepção) não é a mesma coisa que dor, que é uma experiência subjetiva e inclui um forte componente emocional (afetivo). Testes em animais com fármacos analgésicos geralmente determinam a nocicepção e envolvem a avaliação da reação de um animal a um estímulo medianamente doloroso, com frequência mecânico ou térmico (Rang *et al.*, 2004).

Uma maneira mais fácil de entender os vários componentes da dor é a identificação destes em quatro amplas categorias: a nocicepção, a percepção da dor, o sofrimento e o comportamento da dor, que podem existir independentemente da existência de um dano tecidual.

A *nocicepção* é a detecção do dano tecidual pelas fibras A $\delta$  e C. A *percepção* da dor é frequentemente disparada por um estímulo nocivo, como um ferimento ou doença. O *sofrimento* é a resposta negativa induzida pela dor, mas também pode ser desencadeado por outros fatores como medo, ansiedade e estresse. O *comportamento da dor* é um resultado da dor e do sofrimento; são as atitudes que as pessoas têm ou deixam de ter e que podem ser atribuídas à presença do tecido danificado (Loeser & Melzack, 1999).

A transmissão do sinal nociceptivo está sujeita a uma variedade de moduladores que podem atuar de forma facilitatória ou inibitória, desde os nociceptores até as estruturas cerebrais responsáveis pela percepção da dor (Fürst, 1999; Gebhart, 2004).

Em condições fisiológicas normais, os sinais nociceptivos são gerados apenas por estímulos intensos, sejam eles químicos, mecânicos ou térmicos, que

consequentemente causam o aumento nas descargas das fibras aferentes primárias (FAPs), componentes importantes para o início da transmissão do impulso nociceptivo. O estímulo natural de alguns nociceptores é bastante difícil de identificar, assim, eles são chamados de nociceptores “silenciosos” ou “adormecidos” e são responsivos apenas quando são sensibilizados por um processo inflamatório, resultado de um dano tecidual (Julius & Basbaum, 2001; Millan, 2002).

A destruição do tecido por si só pode ativar os nociceptores, após uma lesão, e diversos mediadores poderão ser liberados no tecido danificado. Neste contexto, podemos citar o glutamato e outros aminoácidos excitatórios (AAEs), neuropeptídeos, como a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), o trifosfato de adenosina (ATP), o óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGs) e neutrofinas (fatores de crescimento). Estes transmissores e uma diversidade de outros neuropeptídeos, enzimas e uma mistura de muitas outras moléculas exibem um complexo exemplo de co-localização, co-modulação e co-liberação dos mediadores nas FAPs (Millan, 2002).

Quando ocorre um dano significativo nos tecidos, a dor é frequentemente mais persistente e é associada a um processo inflamatório e, nestas circunstâncias, geralmente ocorrem a hiperalgesia (definida como uma diminuição do limiar para provocar respostas indicativas de nocicepção por uma alteração na transmissão da dor) e alodínia (dor em resposta a um estímulo não nocivo) nos tecidos adjacentes (Dray, 1997).

O desencadeamento de uma resposta inflamatória local será sustentado por múltiplos mediadores que sensibilizam os nociceptores funcionais ou ativam aqueles que estão latentes (“nociceptores silenciosos”). Os nociceptores sensibilizados provocam um aumento no padrão basal das descargas, uma redução dos limiares de estímulos sobre o qual a descarga basal aumenta, um aumento supranormal no padrão das descargas, o que aumenta o poder do

estímulo, ou uma combinação destas mudanças. No sítio da lesão, os mediadores inflamatórios (monoaminas, citocinas, prostanóides, peptídeos), neurotransmissores e fatores de crescimento banham os nociceptores sensibilizados. Este conjunto de fatores resulta em mudanças nos limiares de ativação dos nociceptores e mecanoceptores, facilitando então, o desencadeamento de uma resposta nociceptiva (Appleton, 1997; Carr & Goudas, 1999).

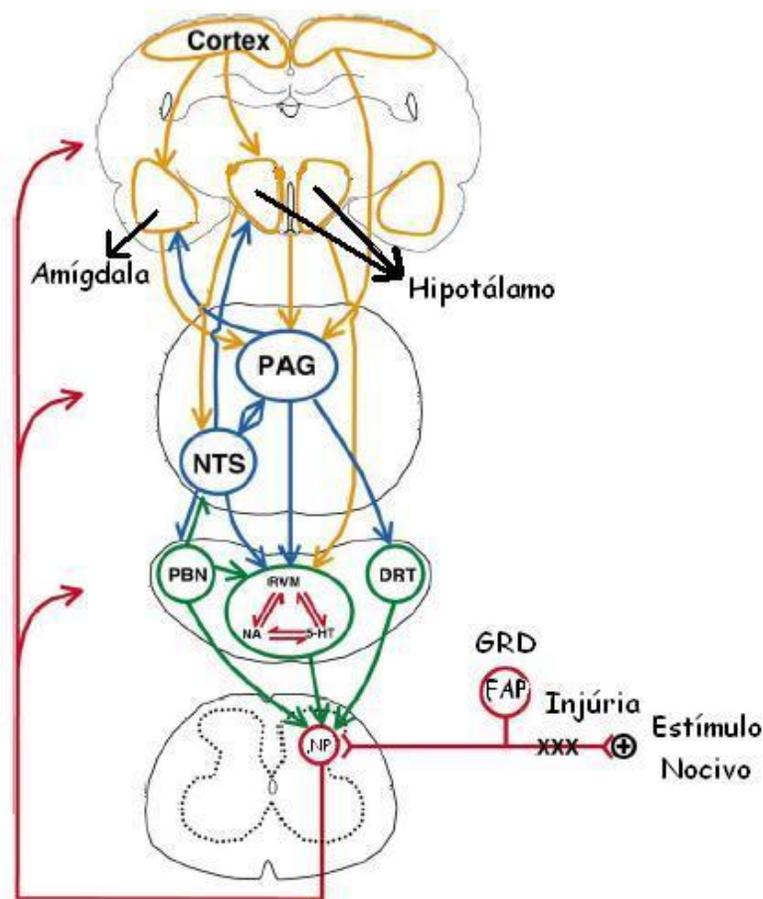
Seguindo a transmissão do impulso da pele até o sistema nervoso central através das FAPs, observa-se a importante participação da medula espinhal. No corno dorsal, o estímulo nociceptivo estimula diretamente os neurônios de projeção (NPs), ou indiretamente via interneurônios excitatórios (INEs). Além disso, as FAPs também podem ser moduladas por interneurônios inibitórios (INIs), que irão interagir com os NPs, INEs ou nos próprios terminais das FAPs, desempenhando um papel muito importante no controle da transmissão nociceptiva (Castro, 2000; Millan, 2002).

O trajeto ascendente, em seguida, retransmite a informação nociceptiva para estruturas talâmicas, límbicas e corticais, responsáveis pelas respostas afetivas e sensorial-discriminativa da dor (Carr & Goudas, 1999).

Estas substâncias moduladoras da resposta nociceptiva poderão, por vezes, atuar como pronociceptivas (controle descendente facilitatório) ou antinociceptivas (controle descendente inibitório), dependendo de diversos fatores, tais como o tipo e intensidade do estímulo, região central ativada pelo estímulo, tipo de receptor ativado, entre outros (Millan, 2002).

Entre as áreas centrais já estudadas e bem caracterizadas encontra-se o hipotálamo, o núcleo parabraquial, o núcleo do trato solitário, a medula rostroventromedial, o núcleo dorso reticular da medula, substância cinzenta periaquedutal (PAG) e o córtex cerebral (Millan, 2002). Os neurônios projetados destas áreas (Via Descendente Inibitória – VDI ou Via Descendente Facilitatória –

VDF) contêm os transmissores responsáveis pelo controle descendente da dor e entre eles estão a noradrenalina (NOR), serotonina (5-HT), acetilcolina (Ach), ácido gama amino butírico (GABA), dopamina (DA), encefalina (ENC), dinorfina (DIN), endomorfina (EM), adenosina. Neste contexto, é importante salientar que a NOR e a 5-HT são os transmissores das VDI's mais amplamente estudados, e são considerados os seus principais neurotransmissores inibitórios (Fürst, 1999; Millan, 2002). As estruturas cerebrais envolvidas na iniciação e modulação do controle descendente da informação nociceptiva estão ilustradas na Figura 10.



**Figura 10-** Esquema ilustrativo da inter-relação entre estruturas cerebrais envolvidas na iniciação e modulação do controle descendente da informação nociceptiva. Abreviaturas: PAG, substância cinzenta periaquedual; NTS, núcleo do trato solitário; PBN, núcleo parabraquial; DRT, núcleo dorso reticular; RVM, medula rostroventricular; NA, noradrenalina; 5HT, serotonina; FAP, fibra aferente primária; NP, neurônio de projeção; GRD, gânglio da raiz de projeção (adaptado de Millan, 2002).

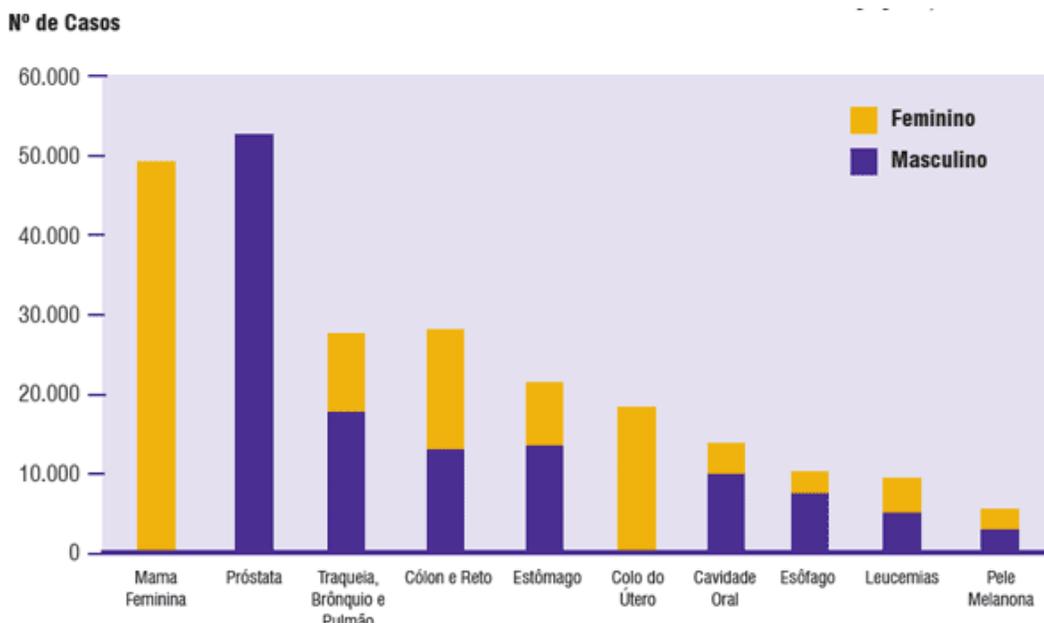
A dor é um efeito incapacitante de muitas condições médicas e seu controle é uma das prioridades terapêuticas mais importantes (Rang *et al.*, 2004).

## **2.4 Câncer**

O câncer é uma doença caracterizada pela disseminação e propagação descontroladas no corpo, de formas anormais das próprias células corporais. Uma célula normal transforma-se em célula cancerosa em decorrência de uma ou mais mutações no seu DNA, que podem ser herdadas ou adquiridas (Rang, 2004). A conversão de uma célula normal em tumoral, bem como sua disseminação, é acompanhada também pela remodelagem do estroma, onde células como macrófagos e fibroblastos liberam fatores solúveis (citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas) que influenciam o desenvolvimento da angiogênese tumoral (formação de novos vasos). A angiogênese é um processo complexo que representa uma etapa crítica na progressão tumoral, uma vez que promove o suprimento sanguíneo (oxigenação e nutrição) para o local, contribuindo assim para o crescimento do tumor, bem como para sua disseminação (Folkman, 2003; Bianco *et al.*, 2006).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2010, válidas também para 2011, apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os de mama e do colo do útero no sexo feminino (Figura 11), acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina. De todos os casos, 80% a 90% estão associados a fatores ambientais. Alguns deles são bem conhecidos, como o cigarro que pode causar câncer de pulmão e a exposição excessiva ao sol que pode causar câncer de pele. Outros fatores estão em estudo, como alguns componentes dos alimentos que ingerimos, além de muitos que ainda são completamente desconhecidos (INCA, 2010).

O aumento da incidência de câncer está relacionado também ao aumento da expectativa de vida da população, pois o aparecimento dessa patologia é favorecido com o envelhecimento do organismo. Além disso, uma maior longevidade resulta em um período maior de exposição a agentes carcinogênicos, como poluição e radiação UV (Balducci & Ershler, 2005).



**Figura 11-** Gráfico demonstrativo dos tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010, exceto pele não melanoma, na população brasileira. Fonte: Instituto Nacional de Câncer- INCA/MS.

Na busca de novos fármacos com ação antiproliferativa, o *National Cancer Institute* (NCI-EUA), um dos mais importantes centros de estudos sobre o câncer, preconiza a utilização de um painel de células tumorais humanas a fim de verificar a atividade antiproliferativa *in vitro* (Shoemaker, 2006; Chabner & Roberts, 2005). Harvey (2008) demonstrou que os produtos naturais representaram uma parcela significativa na pesquisa em fase clínica de novos fármacos, especialmente para área de oncologia.

### 3 PROPOSIÇÃO

- ❑ Avaliar o efeito de proteção do processo de microencapsulação do extrato e dos vouacapanos isolados de *P. pubescens*.
- ❑ Avaliar a estabilidade dos extratos e vouacapanos isolados logo após sua obtenção e após exposição à umidade e temperatura controladas.
- ❑ Avaliar a eficácia das microcápsulas produzidas com o extrato e vouacapanos isolados de *P. pubescens*, monitoradas em ensaios para avaliação das atividades anticâncer *in vitro* e antinociceptiva.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Drogas e Reagentes

Indometacina (Cristália), morfina (Cristália-Brasil), pentobarbital (Cristália), gentamicina (Schering Plus<sup>®</sup>), doxorubicina (Eurofarma), sulforrodamina B (SBR), meio RPMI 1640 (Gibco<sup>®</sup>) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco<sup>®</sup>), dimetilsulfóxido- DMSO (Merk), ácido tricloroacético (TCA), trizma Base (Sigma<sup>®</sup>), formaldeído (Chemco-Brasil), adjuvante de freund-*complete freund adjuvant* (CFA), Tween 80R (Labsynth-Brasil), carragenina, cloreto de sódio (Labsynth-Brasil), ácido acético glacial (Chemco-Brasil), diclorometano, acetato de etila (Chemco), anidrido acético (Merck, Alemanha), solução de anisaldeído (ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído [50:1:0,5]) e n-hexano (Chemco). Todos os reagentes utilizados foram grau P.A.

#### 4.1.2 Material Vegetal

As sementes de *P. pubescens* foram coletadas na cidade de São Carlos (SP), sob a supervisão do Prof. Dr. Jorge Yoshio Tamashiro do departamento de Botânica do Instituto de Biologia (IB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A exsicata (UEC 1402) foi depositada no *Herbarium* do IB-UNICAMP. As sementes das demais localidades foram coletadas em Ponto Chique (MG), Sorriso (MT) e Bom Jesus da Lapa (BA).



**Figura 12-** Foto das sementes brutas (esquerda) e limpas (direita) de *P. pubescens*.

### **4.1.3 Animais**

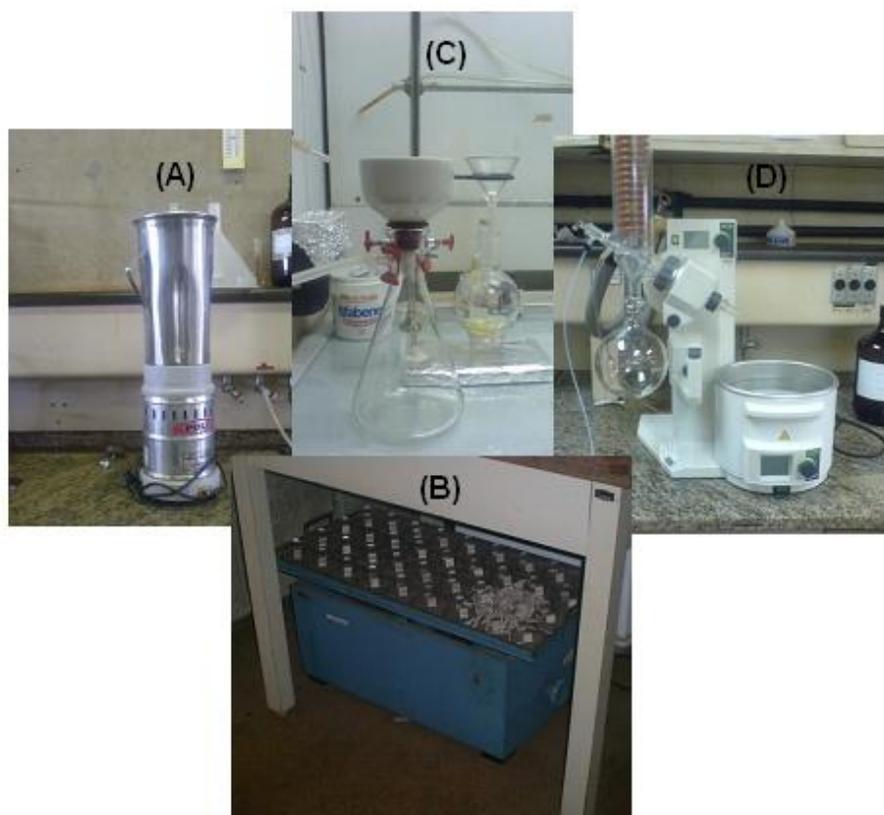
Os animais foram provenientes do Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB) e mantidos em câmaras com temperatura controlada ( $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) em ciclos claro-escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. Foram utilizados camundongos albinos *Mus musculus Swiss* machos, adultos (25-35 g) e ratos *Wistar* machos, adultos (150-250 g), aclimatados às condições do laboratório por sete dias, sendo agrupados ao acaso, em grupos de até oito animais. Os ensaios experimentais foram desenvolvidos segundo o Manual sobre Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, *National Research Council*, que atende às recomendações nacionais e internacionais, bem como normas éticas para o seu uso em experimentos com dor (CCAC, 1998). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Unicamp, sob protocolo nº 1951-1 (anexo).

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Estudos Fitoquímicos**

#### 4.2.1.1 Extração

As sementes limpas de *P. pubescens* foram moídas com gelo seco em liquidificador industrial Poli LS-06 e extraídas, utilizando-se diclorometano como solvente extrator, três vezes, em períodos de uma hora e meia cada, na proporção de 5:1 (solvente: material vegetal) em agitador oscilatório a temperatura ambiente. O extrato foi filtrado em funil de Büchner e depois em funil analítico, contendo algodão e sulfato de sódio anidro. Em seguida foi concentrado sob vácuo em rotaevaporador Buchi RE 215.



**Figura 13-** Foto ilustrativa dos equipamentos e vidrarias utilizados durante o processo extrativo; (A) Liquidificador industrial Poli LS-06; (B) Agitador oscilatório; (C) Sistema de filtração e (D) Rotaevaporador Buchi RE 215.

#### 4.2.1.2 Métodos Cromatográficos

#### 4.2.1.2.1 Cromatografia em Camada Delgada

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram efetuadas em cromatofolhas de alumínio com silicagel (Merck® artigo 5554). Como eluentes, foram utilizadas misturas de acetato de etila/ n-hexano na proporção 60:40. A detecção visual dos compostos foi obtida após pulverização das placas com uma solução contendo a mistura de ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído (50:1:0,5), seguida de aquecimento em estufa a 100°C durante 1 minuto.

#### 4.2.1.2.2 Cromatografia em Coluna Filtrante

As cromatografias do tipo coluna filtrante foram realizadas em funil de placa porosa (escala laboratorial) ou coluna em aço inox (escala piloto). Como fase estacionária, empregou-se Silicagel 60® (Merck, 0,063-0,200 mm) e como fase móvel, gradientes de n-hexano e acetato de etila. Zeozil® (Bióxido de silício) foi utilizado como fase estacionária nas pré-purificações em escala piloto.



**Figura 14-** Foto ilustrativa de coluna cromatográfica filtrante em escala laboratorial (A) e piloto (B).

#### 4.2.1.2.3 Cromatografia em Coluna Clássica

As cromatografias em coluna clássica foram efetuadas em suporte de vidro recheado com Silicagel 60<sup>®</sup> (Merck, 0,063-0,200 mm) numa proporção de 1:30 (amostra: silicagel) para a montagem da coluna. Utilizaram-se gradientes de n-hexano e acetato de etila para as fases móveis.



**Figura 15-** Foto ilustrativa de montagem de coluna cromatográfica clássica.

#### 4.2.1.2.4 Análise dos constituintes químicos por CG-EM (HP5975/HP6890)

As amostras foram diluídas em 1 mL de acetato de etila e analisadas por cromatografia a gás capilar acoplada a um detector de massas (GC Hewlett Packard 5975, série II, diretamente acoplado a um detector seletivo de massas Hewlett Packard 6890, equipado com uma coluna de sílica fundida WCOT, 30 m x 0.25 mm, DB-1 ou DB-5, ou similares). As condições de análise foram: temperatura de injeção: 250°C, temperatura do detector: 300°C, programa de temperatura: 40°C (2min)-240°C, 5°C/min, 240-300°C, 10°C/min, com ou sem razão de split 1:100, gás de arraste He 0,7 bar, 1mL/min.



**Figura 16-** Foto ilustrativa do equipamento utilizado na análise qualitativa CG/EM (HP6890/HP5975).

#### **4.2.2 Microencapsulação**

A homogeneização das amostras com os agentes encapsulantes foi favorecida pelo uso do emulsificante Tween 80 e do dispersor IKA®T10Basic-Ultra Turrax®. O processo de atomização foi utilizado para a microencapsulação, empregando o aparelho *spray dryer* Buchi B-290, nas condições operacionais baseadas em Rodrigues (2004), ou seja, 180 °C ± 5 °C de ar de entrada, 90-110 °C , 5 °C de ar de saída, 30 % de sólidos totais, pressão de ar de 1 bar, fluxo de ar 10 L/min, vazão da bomba 10 mL/min, 20% de recheio (extratos e composto isolado) em relação aos sólidos totais. Como material formador de parede utilizou-se uma mistura de goma arábica e maltodextrina na proporção de 1:1 (m/m).

##### **4.2.2.1 Extração do recheio das microcápsulas**

Para as análises por CG-EM e ensaios anticâncer *in vitro*, extraiu-se da microcápsula o material encapsulado. O processo de extração foi realizado em um tubo tipo Falcon, com 1 g de microcápsulas e 4 mL de água e agitação em vórtex durante 3 minutos, seguida de nova agitação após acréscimo de 30 mL de n-

hexano. Essa mistura foi centrifugada por 2 minutos a 3000 rpm e a fase n-hexânica, contendo o ativo, foi evaporada em rotaevaporador Buchi até *secura*.

#### **4.2.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura**

As amostras processadas em *spray dryer* foram fixadas a uma fita adesiva dupla face em suportes cilíndricos de alumínio de 1 cm de altura por 1 cm de diâmetro (*stubs*), de acordo com procedimento descrito por Rosenberg e Young (1993). Os cilindros foram submetidos à metalização pelo seu recobrimento com uma fina camada de ouro, através de uma corrente de 40 mA durante 180 s, sob vácuo. Esta técnica, conhecida por *sputtering*, foi realizada em um evaporador (Balzer).

As amostras foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), em microscópio eletrônico de varredura (JEOL), sob aceleração de 10 kV e suas imagens digitalizadas para observação detalhada das estruturas. Esta avaliação foi realizada no laboratório de microscopia do Instituto de Biologia-Unicamp.

#### **4.2.2.3 Estudo de estabilidade**

As microcápsulas produzidas foram colocadas em uma câmara climática, onde as condições de temperatura e umidade relativa de equilíbrio (URE) foram mantidas constantes em 40°C e 70%, respectivamente, conforme estabelecido pela Anvisa (RE nº1-2005) para o estudo de estabilidade acelerada (Anvisa, 2009). Coletas nos tempos 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias foram realizadas para os estudos de estabilidade.

## 4.2.3 Avaliação Farmacológica

### 4.2.3.1 Atividade Anticâncer *in vitro*

A atividade antiproliferativa foi avaliada utilizando-se o ensaio da sulforrodamina B (SBR) para avaliação do crescimento celular (Monks *et al.*, 1991). Foram empregadas nove linhagens de células tumorais humanas (Tabela 1). Estas linhagens foram cedidas pelo NCI e são mantidas no laboratório de cultura de células em frascos de 25 cm<sup>3</sup> (Nunc<sup>®</sup>), com 5mL de meio RPMI 1640 (Gibco<sup>®</sup>) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco<sup>®</sup>) e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

**Tabela 1-** Linhagens celulares empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa.

Linhagem	Órgão/Doença	Morfologia
UACC-62	Pele; melanoma	Fibroblástica
MCF-7	Mama; adecarcinoma	Epitelial
NCI-ADR/RES *	Ovário; adenocarcinoma	Epitelial
786-O	Rim; adenocarcinoma	Epitelial
NCI-H460	Pulmão; carcinoma tipo não pequenas células	Epitelial
PC-3	Próstata; adenocarcinoma	Epitelial
OVCAR-3	Ovário; adenocarcinoma	Epitelial
HT-29	Cólon; adenocarcinoma	Epitelial
K562	Medula óssea; Leucemia	Linfoblástica

\* esta linhagem apresenta resistência a múltiplos fármacos.

Foram inoculados 100µL/compartimento, em placas de 96 compartimentos (Nunc<sup>®</sup>), de uma suspensão com densidade de inoculação entre 3x10<sup>4</sup> e 6,5x10<sup>4</sup> cel/mL em meio RPMI/SFB acrescido de 50µg/mL de gentamicina (Schering Plus<sup>®</sup>). Após 24h de incubação a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, foram adicionados 100µL/compartimento da amostra a ser testada em quatro concentrações distintas (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) (Figura 17).

Para o preparo das amostras, uma alíquota de 10 mg de cada amostra foi dissolvida em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, 50 µL dessa solução-mãe foram dispersos em 950 µL de meio RPMI/5% SFB, para o preparo

da solução de trabalho. Esta foi então diluída sucessivamente, em meio de cultura, para o preparo das concentrações finais de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL. A concentração final de DMSO não interferiu no crescimento celular.

Como controle positivo, foi utilizado o quimioterápico doxorrubicina, nas mesmas concentrações das amostras em teste. Neste momento, procedeu-se a fixação com ácido tricloroacético (TCA) a 50% da placa controle chamada T0, que permitiu determinar qual a quantidade de células no momento da adição das amostras.

Ao final de 48h de incubação, as células foram fixadas com 50µL/compartimento de TCA a 50% e as placas foram incubadas por 1 h a 4°C; a seguir, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água destilada para remoção de resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Depois de secas completamente, à temperatura ambiente, as placas foram coradas com 50µL/compartimento de SRB 0,4% (p/v), dissolvido em ácido acético 1%, e mantidas por 60 min a 4°C; em seguida, foram lavadas, quatro vezes, com ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. Finalmente o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base (Sigma®), 10µM e pH 10,5. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540nm em leitor de microplacas.

Com os valores médios de absorbância para cada concentração de cada amostra, a porcentagem de crescimento (%C) foi calculada segundo as seguintes fórmulas:

Se  $T > T_1 \rightarrow$  estímulo de crescimento celular

Se  $T_1 > T \geq T_0 \rightarrow$  atividade citostática:  $\%C = 100 \times [(T-T_0)/(T_1-T_0)]$

Se  $T \leq T_0 \rightarrow$  atividade citocida:  $\%C = 100 \times [(T-T_0)/T_0]$

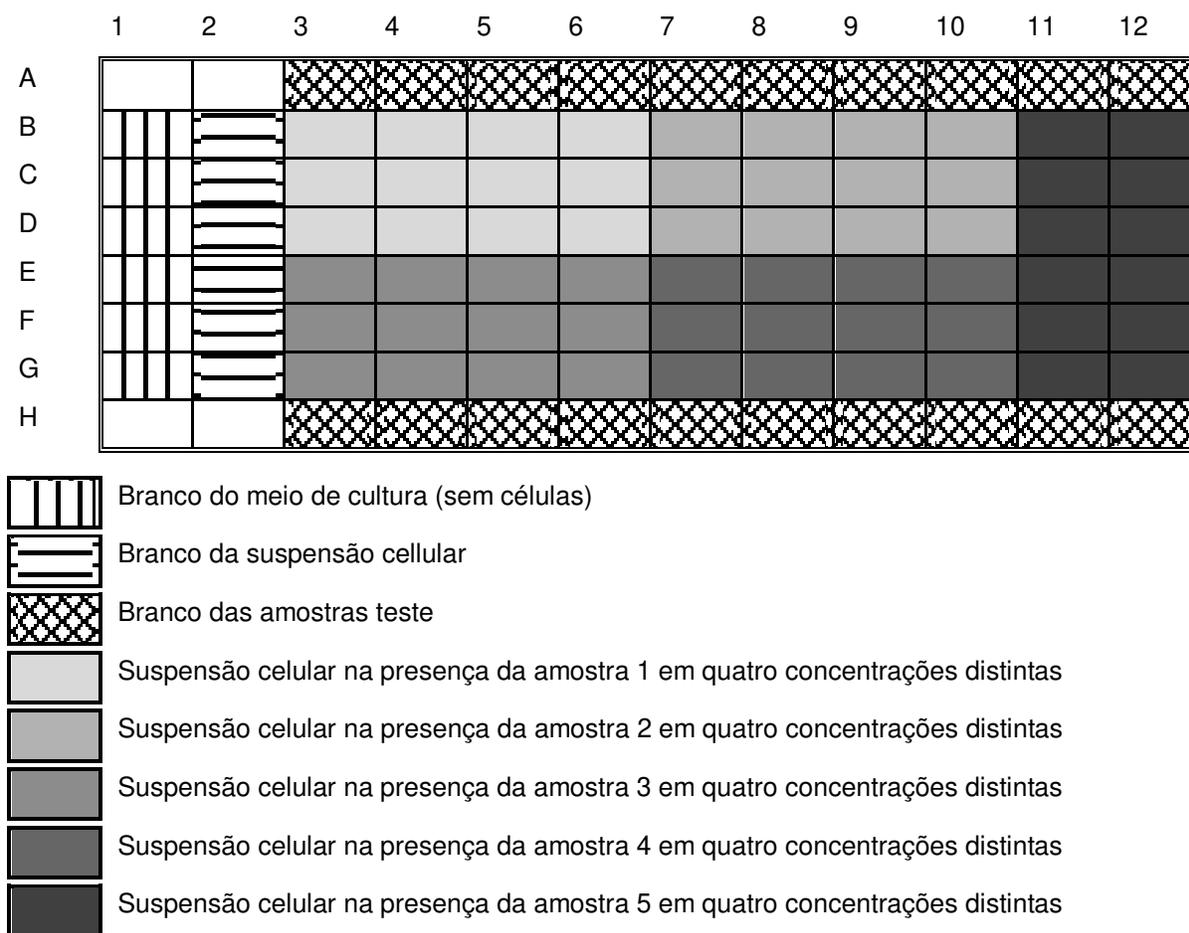
Onde:

T = média da absorbância da célula tratada - absorbância da amostra sem

célula

$T_1$  = absorvância do branco de células.

$T_0$  = absorvância do controle de células na placa  $T_0$ .



**Figura 17-** Esquema demonstrativo da aplicação das amostras, em quatro concentrações distintas, na placa teste.

Foram gerados gráficos de porcentagem de crescimento em função da concentração da amostra testada. A concentração efetiva denominada TGI (do inglês *total growth inhibition*) que representa a concentração necessária para que ocorra 0% de crescimento celular (Shoemaker, 2006), foi calculada por regressão não linear, tipo sigmoidal, utilizando-se software Origin, versão 7.5.

#### 4.2.3.2 Atividade Antinociceptiva

Todas as drogas e amostras foram solubilizadas em veículo composto de solução salina (NaCl 0,9%) e 0,5% de Tween 80R.

##### 4.2.3.2.1 Avaliação da Atividade Locomotora (*Open-field*)

Para o teste, empregou-se a metodologia de Santos *et al.* (2005), com adaptações. Uma caixa plástica medindo 45 x 45 x 20 cm, com a parte interna dividida em 9 áreas de 15 x 15 cm (Figura 18), foi utilizada neste ensaio. O número de áreas percorridas pelos animais durante um período de 3 minutos foi considerado indicativo de locomoção. Grupos de 4 camundongos (*Swiss*) foram tratados pela via i.p com veículo, compostos C1 e C2 isolados de *P. pubescens* (30 mg/Kg) ou Pentobarbital (35mg/Kg) 30 minutos antes do experimento. O registro dos campos percorridos foi feito a olho nu.



**Figura 18-** Foto demonstrativa do experimento *open-field*.

##### 4.2.3.2.2 Contorções abdominais induzidas por ácido acético

Grupos experimentais de 6 camundongos (*Swiss*) foram tratados com o veículo, indometacina (30 mg/kg), extrato bruto (EB), compostos C1 e C2 isolados da *P. pubescens* nas doses de 10, 30, 100 e 300 mg/Kg, pela via

intraperitoneal (i.p.). Após 30 minutos, os animais receberam ácido acético (0,8% 0,1 mL/10g, i.p.). As contorções da parede abdominal, seguidas de torções do tronco e extensão dos membros posteriores produzidas, foram contadas, imediatamente após injeção do ácido acético, durante 15 minutos, como indicativo de nocicepção (Koster *et al.*, 1959; Vacher *et al.*, 1964).

#### **4.2.3.2.3 Algesia induzida por Formalina**

Grupos experimentais de 6 camundongos (*Swiss*) foram tratados pela via intraperitoneal com o veículo, morfina (10 mg/kg), indometacina (30 mg/kg) ou C1 isolado de *P. pubescens* (3, 10, 30 e 100 mg/Kg). Após 30 minutos foi administrada uma solução de formalina na concentração de 2% (formaldeído em PBS) por via subplantar (s.pl.) (20 µL/ pata) na pata posterior direita dos animais. Para a injeção s.pl., a agulha, com o bisel voltado para cima, foi inserida cuidadosamente através de um dos coxins plantares, sua visualização através da pele permitiu que a formalina fosse sempre injetada na mesma região da pata. O tempo que os animais permaneceram lambendo as patas, durante um período de 45 minutos, foi indicativo de nocicepção. Os primeiros cinco minutos determinaram a resposta à dor de origem neurogênica; os 25-45 minutos finais, estão relacionados à resposta a dor de origem inflamatória (Tjolsen *et al.*, 1992; Hunskaar *et al.*, 1995).

#### **4.2.3.2.4 Hiperalgisia (Randal Sellito)**

Empregou-se o método originalmente descrito por Randal e Sellito (1957), com adaptações relacionadas ao protocolo do ensaio e mensuração dos dados. Utilizou-se carragenina (2,5% em solução salina) como indutor de hiperalgisia. Grupos experimentais de 6 ratos (*Wistar*) foram submetidos à pressão mecânica

(0-500 g), produzida com auxílio de um analgesímetro (Ugo Basile modelo 37215), na pata direita antes da injeção de carragenina, a fim de determinar o valor basal. Após essa determinação, os animais receberam carragenina por via subplantar (s.pl.) (100 µL/ pata) na pata direita traseira e, 2:30 horas depois, foram ressubmetidos ao estímulo. Observada a hipernocicepção, os animais foram tratados pela via intraperitoneal com o veículo, indometacina (30 mg/kg) ou C1 isolado de *P. pubescens* (30 mg/Kg). Após 30, 60, 120 e 180 minutos do tratamento, foi avaliada a pressão máxima suportada pelo animal, através da retirada espontânea da pata inflamada do equipamento. Os resultados estão expressos como porcentagem da pressão suportada em cada grupo, comparados a pressão obtida no basal (100%). Para os cálculos, utilizou-se a fórmula:

$$\%P = PT_x \cdot 100\% / P_{\text{basal}}$$

Onde:

%P= Porcentagem da pressão suportada;

PT<sub>x</sub>= Pressão suportada nos diferentes tempos (gramas);

P<sub>basal</sub>= Pressão basal (gramas), suportada antes da injeção de carragenina.

#### **4.2.3.2.5 Alodínia induzida por CFA-Adjuvante de Freund**

Empregou-se o método descrito por Villetti *et al.* (2003) com algumas modificações. Uma solução de CFA (*Complete Freund Adjuvant*) foi utilizada para induzir inflamação. Grupos experimentais de 5 ratos *Wistar* receberam CFA na pata direita e salina (NaCl 0,9%) na pata esquerda, num volume constante de 0,1 mL (s.pl.). Um estímulo mecânico de baixa pressão (0-35 g num período de 20 segundos), correspondente a resposta dolorosa ao toque (alodínia), foi produzido com auxílio do aparelho Dynamic Plantar Anaesthesiometer (Ugo Basile, modelo 37450). Foram realizadas quatro avaliações consecutivas em ambas as patas, as

médias dessas determinações foram utilizadas para os cálculos dos índices de alodínia, utilizando a fórmula:

$$\text{Pressão pata esquerda}_{(g)} / \text{Pressão pata direita}_{(g)} = \text{índice de alodínia}$$

As medições foram realizadas nos tempo 4 horas, 24 horas e 14 dias após injeção de CFA. Para avaliar a possível atividade anti-alodínica em cada fase, os animais foram tratados com veículo (10 ml/kg, i.p.) ou C1 (30 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes do estímulo pressórico. Um valor basal foi determinado previamente à injeção de CFA.

### **4.3 Análise Estatística**

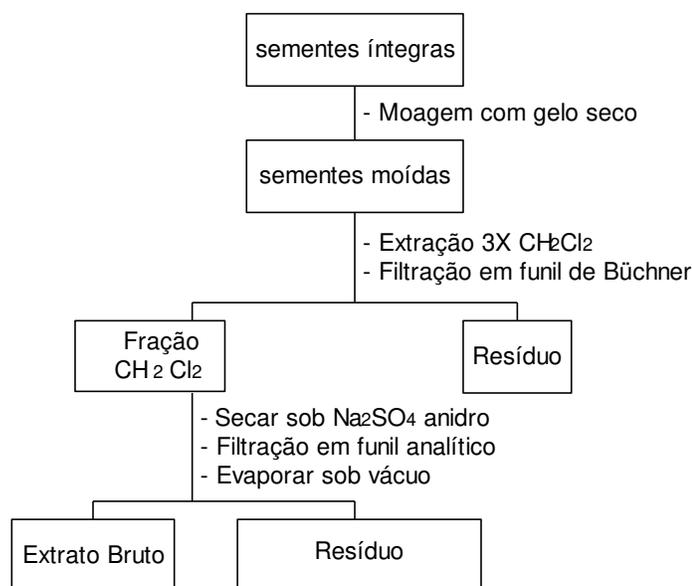
Todos os resultados foram submetidos a análise de variância de uma única via (ANOVA), considerando-se como nível crítico  $p \leq 0,05$  para que seja considerados diferença significante entre os grupos controle e tratados, seguidos do Teste de Duncan, utilizando o software StatSoft.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Estudos Fitoquímicos

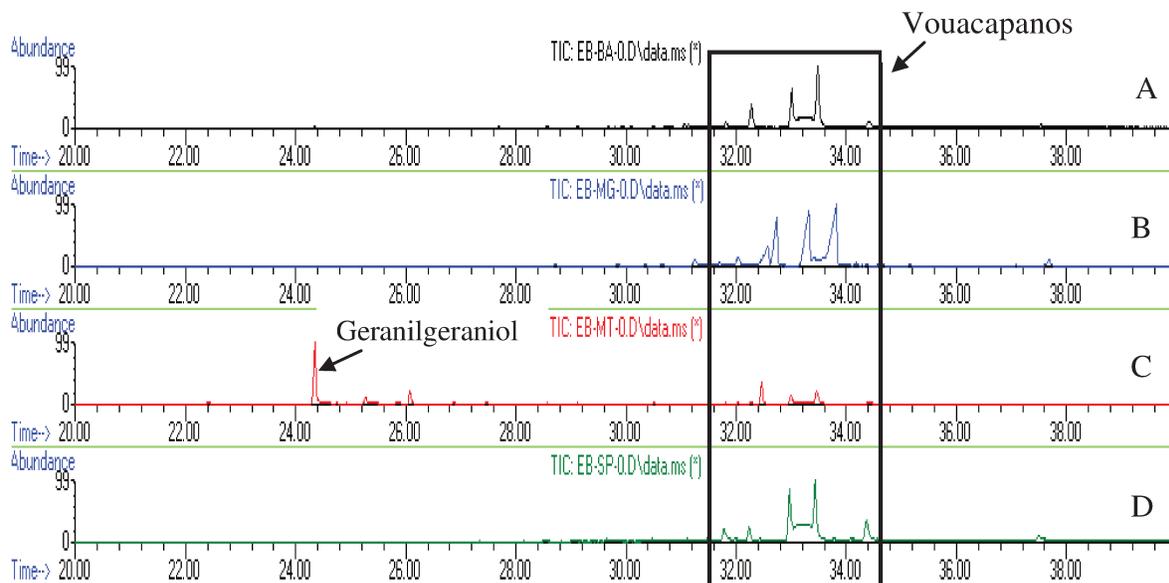
#### 5.1.1 Obtenção do Extrato Bruto

Para iniciar os trabalhos, foram realizados a extração do óleo das sementes de *Pterodon pubescens* e o preparo do extrato bruto, utilizando diclorometano como solvente extrator (Spindola, 2006), de acordo com o procedimento descrito no fluxograma representado na Figura 19.



**Figura 19-** Fluxograma do procedimento adotado para obtenção do extrato bruto diclorometânico de *P. pubescens*.

Sementes procedentes de São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Mato Grosso foram utilizadas para obtenção dos extratos brutos. O rendimento médio das extrações foi de 40%. Por meio de análises por cromatografia a gás com detector de massas (CG/EM), monitoraram-se os extratos para avaliação da presença de compostos vouacapânicos (Figura 20).



**Figura 20-** Cromatograma comparativo obtido por CG/EM (HP6890/HP5975) dos extratos brutos de *P. pubescens* produzidos a partir das sementes provenientes da Bahia (A), Minas Gerais (B), Mato Grosso (C) e São Paulo (D), com destaque para a região dos compostos vouacapanicos e composto geranilgeraniol.

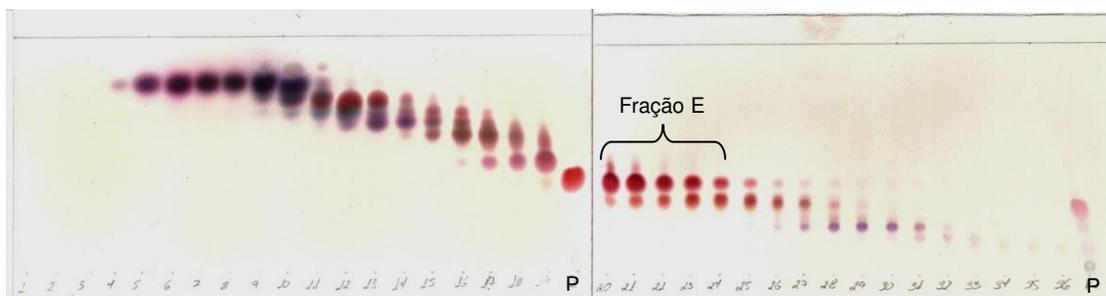
Para o fracionamento, foram escolhidos os extratos produzidos com sementes de São Paulo (EBSP) e Minas Gerais (EBMG), devido à abundância em compostos vouacapanicos e a disponibilidade de material vegetal. Esses extratos foram preparados a partir de 600 g e 10,5 Kg de sementes fornecendo 246 g e 4 Kg de extrato bruto EBMG e EBSP, respectivamente.

Foram realizados diversos fracionamentos em escala piloto e laboratorial, para a obtenção de vouacapanos em quantidade suficiente para os estudos de estabilidade.

### 5.1.2 Fracionamento I

Uma alíquota (240 g) do extrato bruto EBMG foi fracionada por cromatografia em coluna filtrante. A proporção de amostra para fase estacionária na coluna foi de 1:8 (m:m).

As 36 frações resultantes foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) (Figura 21) e agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico em 9 grupos: **A**(F1-10); **B**(F11-14); **C**(F15-16); **D**(F17-19); **E**(F20-24); **F**(F25-26); **G**(F27-29); **H**(F30-31); **I**(F32-36).



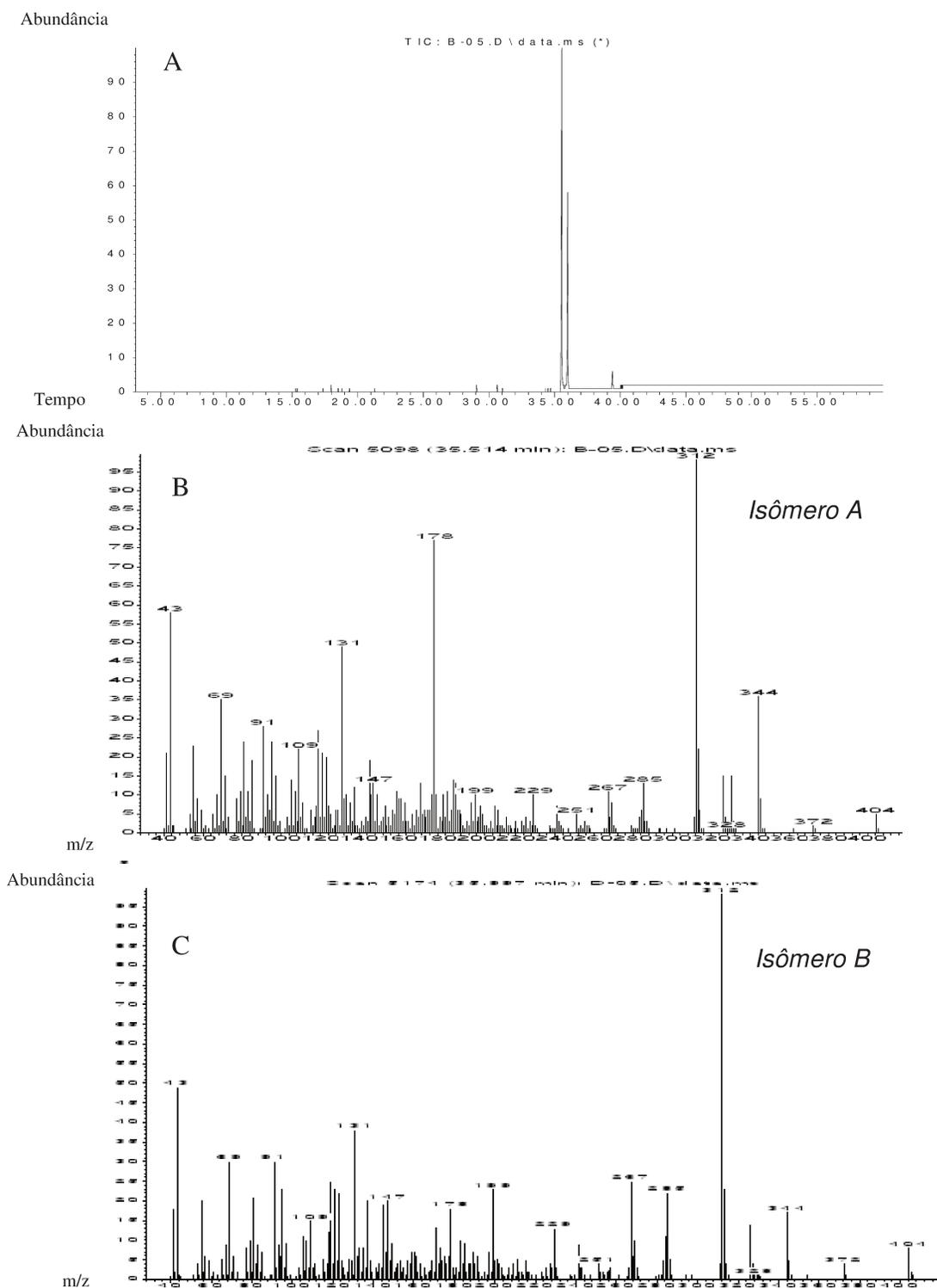
**Figura 21-** Cromatografia em camada delgada das frações resultantes do fracionamento do extrato EBMG de *P. pubescens*. P) padrão de 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxiyouacapano-17 $\beta$ -oato de metila. Fase móvel: n-hexano/acetato de etila (40/60); revelador: anisaldeído.

Durante a evaporação do solvente da fração E, ocorreu a formação de cristais (8,4 g- 3,5%) (Figura 22) que foram caracterizados, através de análise em CG-EM (Figura 23) e comparação com amostras autênticas, como sendo a mistura dos isômeros de posição: A) éster 6 $\alpha$ -hidroxi-7 $\beta$ -acetoxi-youacapano-17 $\beta$ -oato de metila e B) éster 6 $\alpha$ -acetoxi-7 $\beta$ -hidroxi-youacapano-17 $\beta$ -oato de metila (Figura 24).

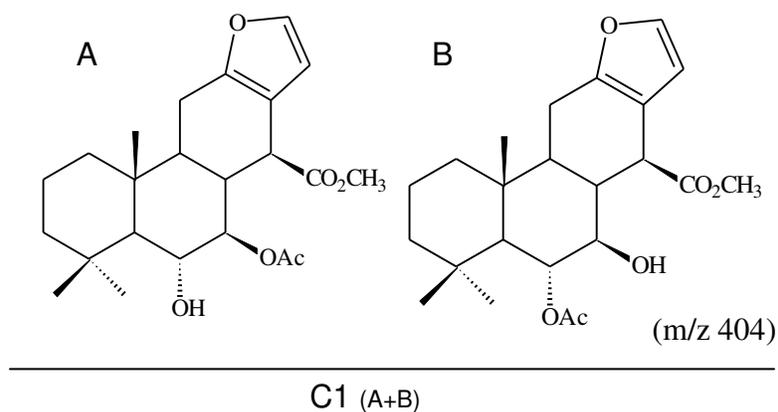


**Figura 22-** Foto dos cristais formados através da concentração da fração E, resultante do fracionamento do extrato bruto EBMG, produzido a partir das sementes de *P. pubescens*.

A mistura de isômeros apresentou ponto de fusão na faixa de 178-182°C.



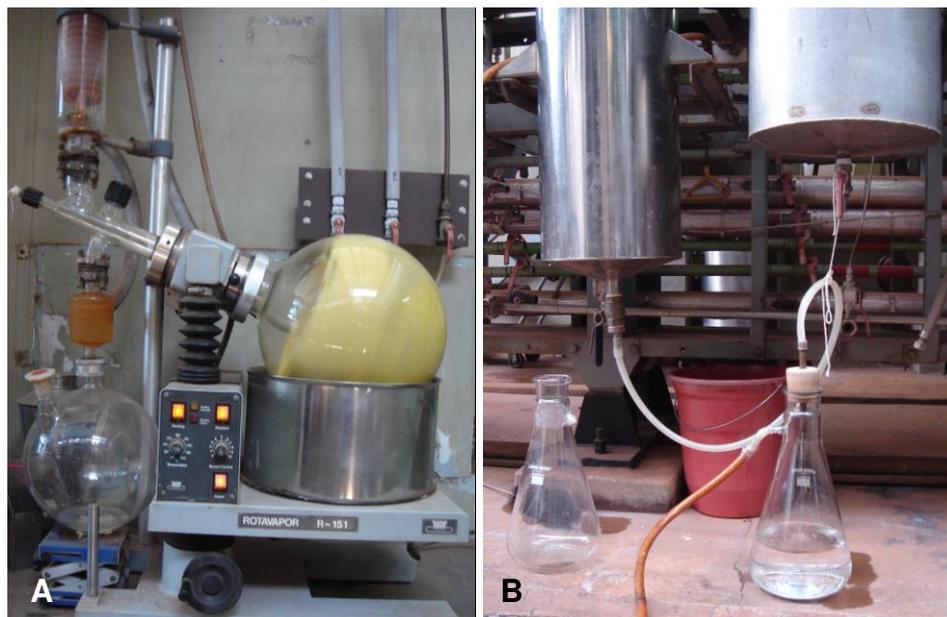
**Figura 23-** A) Cromatograma (região entre 5 e 55 min.); B, C) fragmentogramas dos isômeros (ion molecular u.m.a 404) observados por CG/EM (HP6890/ HP5975) dos cristais precipitados da fração E, proveniente do fracionamento do extrato bruto EBMG de *P. pubescens*.



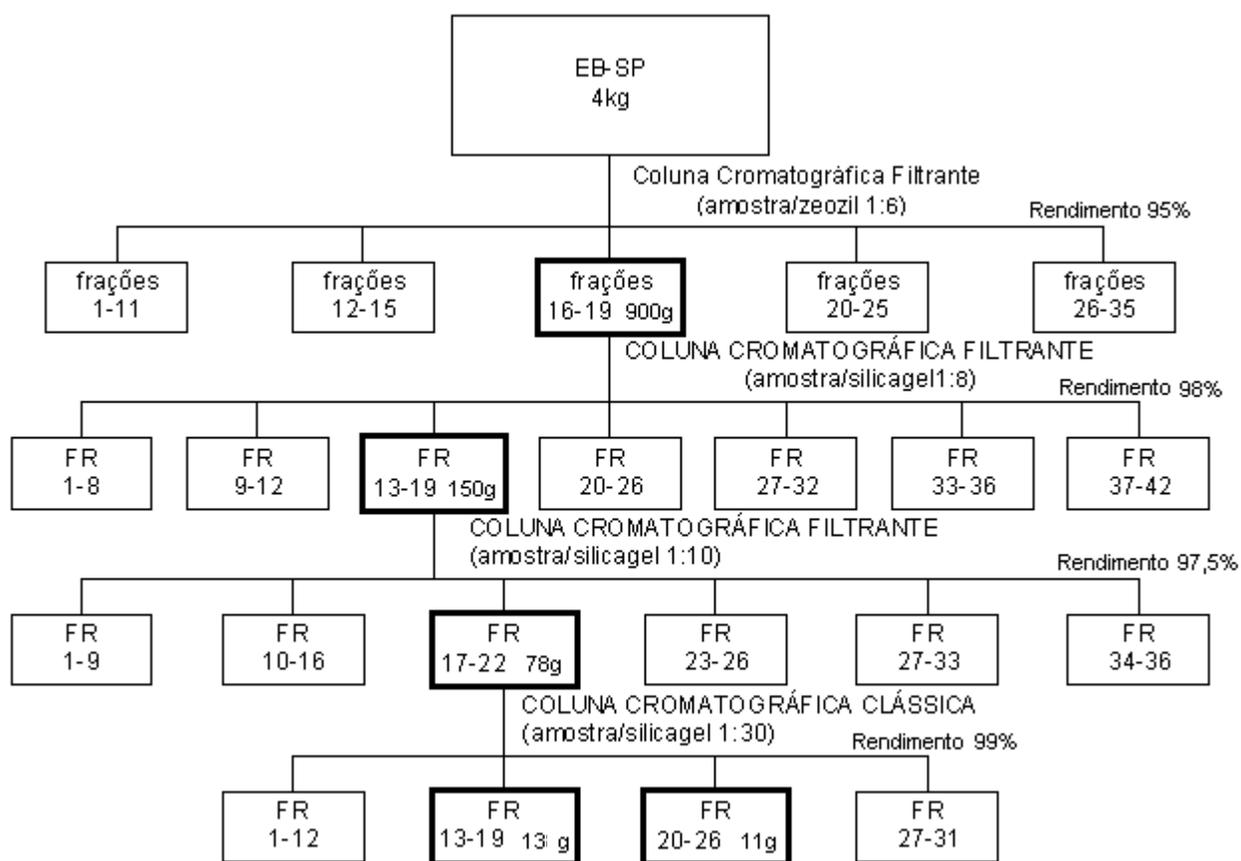
**Figura 24-** Estrutura molecular dos isômeros de posição que constituem a mistura denominada C1 A) éster 6 $\alpha$ -hidroxi-7 $\beta$ - acetoxi-vouacapano-17 $\beta$ -oato de metila e B) éster 6 $\alpha$ -acetoxi-7 $\beta$ -hidroxi-vouacapano-17 $\beta$ -oato de metila.

### 5.1.3 Fracionamento II

Foram realizadas diversas purificações a partir do extrato EBSF (Figura 25) utilizando métodos cromatográficos em coluna, para obtenção de quantidade suficiente de vouacapanos para os ensaios *in vitro* e *in vivo*.



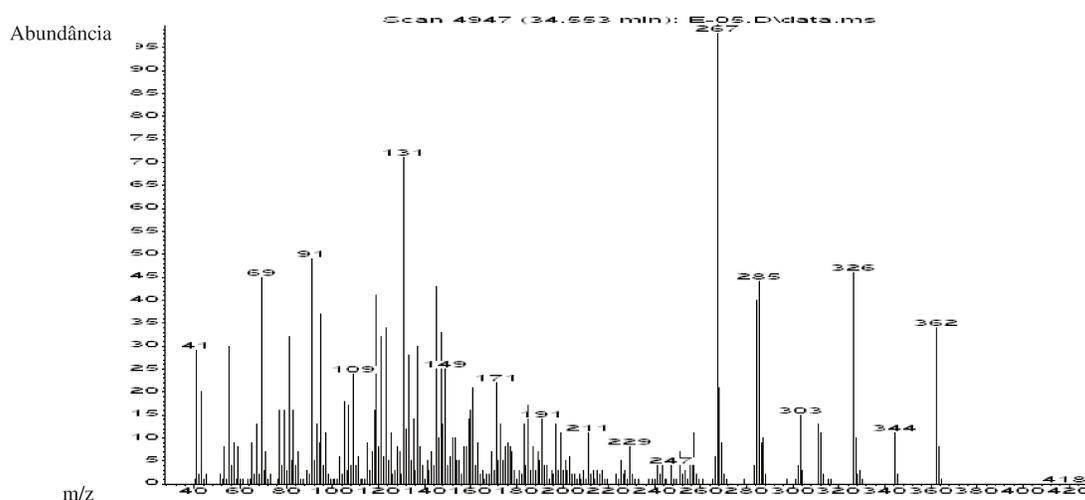
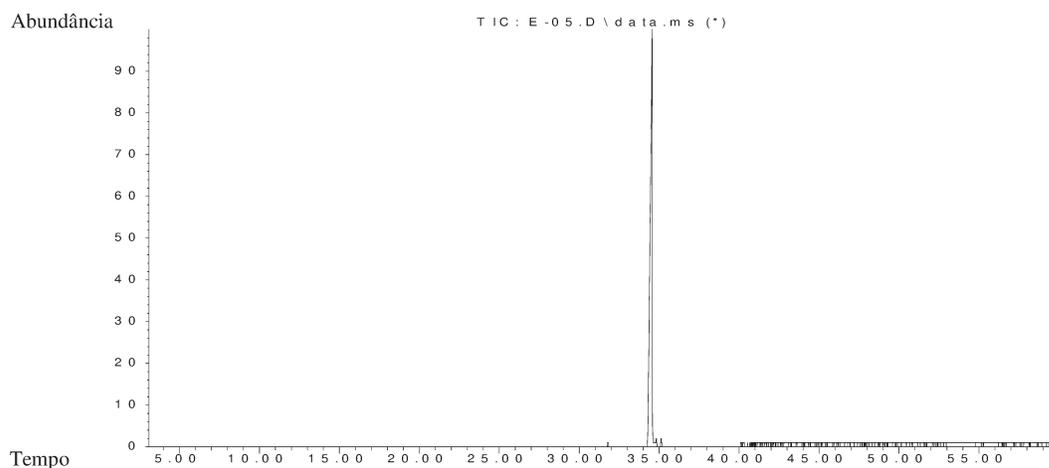
**Figura 25-** Foto ilustrativa do procedimento adotado para o preparo da amostra (A) que foi colocada na coluna cromatográfica e coleta das frações(B).



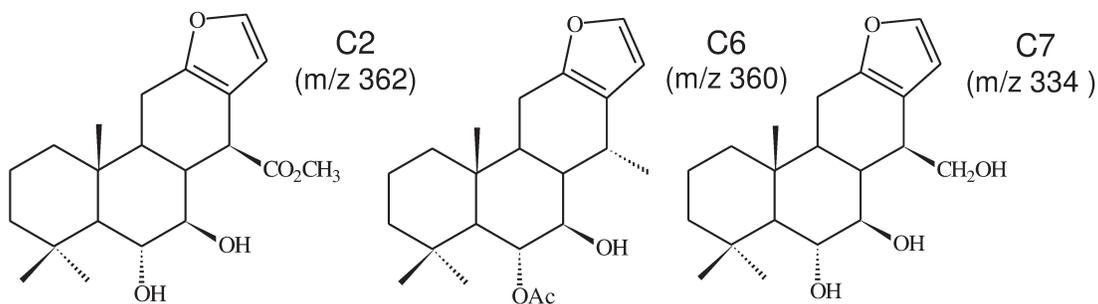
**Figura 26-** Fluxograma do fracionamento do extrato EBSP da *P. pubescens*, através de métodos cromatográficos em coluna, para obtenção de compostos vouacapânicos.

O composto éster 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxivouacapano-17 $\beta$ -oato de metila (C2) (Figura 27) foi isolado por precipitação da fração 13-19 e C1 por precipitação da fração 20-26 (Figura 26). O ponto de fusão dos compostos isolados foi observado na faixa de 178-182°C e 205,7°C para C1 e C2, respectivamente.

A Figura 28 compara a estrutura molecular do composto C2, isolado nesse trabalho, com a estrutura do 6 $\alpha$ -acetoxi,7 $\beta$ -hidroxivouacapano (C3) e 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxivouacapano-17 $\beta$ -metilenol (C7), isolados e identificados em trabalhos anteriores.



**Figura 27-** Cromatograma (região entre 5 e 55 min.) e fragmentograma (íon molecular u.m.a 362) obtidos por CG/EM (HP6890/ HP5975) do composto C2 de *P. pubescens*.



**Figura 28-** Estrutura molecular do composto éster 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxivouacapano-17 $\beta$ -oato de metila (C2), 6 $\alpha$ -acetoxi,7 $\beta$ -hidroxivouacapano (C6) e 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxivouacapano-17 $\beta$ -metilenol (C7).

O potencial farmacológico dos compostos C1 e C2 foi avaliado em ensaios de triagem envolvendo a avaliação da atividade locomotora e ação antinociceptiva.

## **5.2 Ensaios Farmacológicos com os Compostos Isolados**

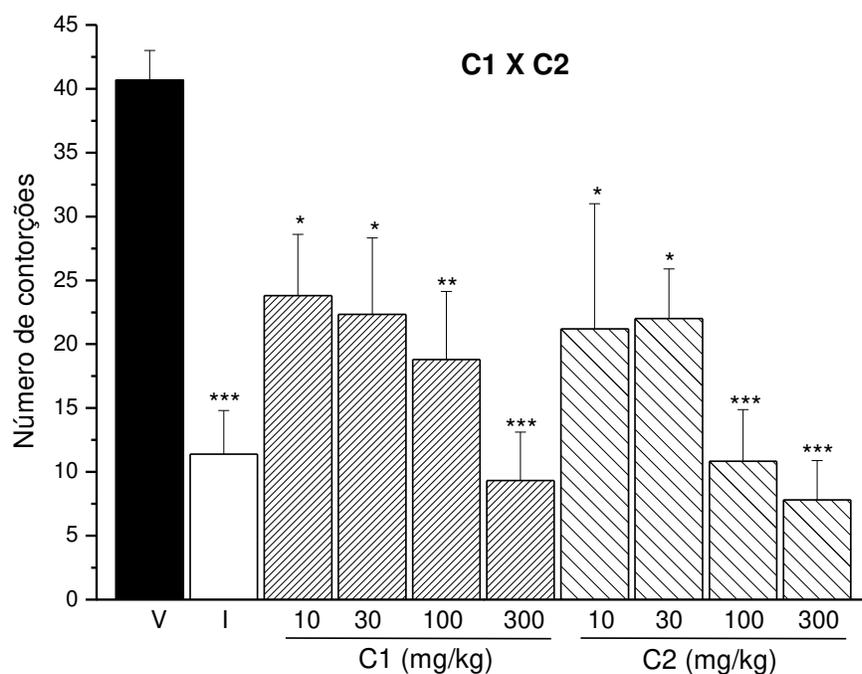
### **5.2.1 Avaliação da Atividade Locomotora (*Open-field*)**

No grupo controle, os animais tratados previamente com veículo (10 mL/kg; i.p.), percorreram  $48,2 \pm 2,2$  áreas no período de 3 minutos. O animais previamente tratados com C1 e C2 (30 mg/Kg; i.p.) percorreram  $40 \pm 9$  e  $42 \pm 3,6$  áreas, respectivamente, enquanto o grupo controle positivo pentobarbital (35 mg/Kg; i.p.) percorreu  $13,7 \pm 6,1$  (ANOVA:  $F_{(3,12)} = 6,62$  \* $p \leq 0,01$ ).

Para avaliação do potencial antinociceptivo utilizou-se o ensaio das contorções abdominais induzidas por ácido acético.

### **5.2.2 Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético**

No grupo controle, previamente tratado com veículo (10 mL/kg; i.p.), a injeção de ácido acético (0,8% em salina 0,9%; i.p.) induziu  $41 \pm 2$  contorções durante os 15 minutos de avaliação experimental. O pré-tratamento com o composto C1, nas doses de 10, 30, 100 e 300 mg/kg (i.p.), reduziu o número de contorções abdominais em 41% ( $24 \pm 5$ ), 46% ( $22 \pm 6$ ), 54% ( $19 \pm 5$ ) e 78% ( $9 \pm 4$ ), respectivamente, enquanto o composto C2 reduziu as contorções, nessas mesmas doses, em 49% ( $21 \pm 10$ ), 46% ( $22 \pm 4$ ), 73% ( $11 \pm 4$ ) e 80% ( $8 \pm 3$ ), respectivamente. A indometacina (30 mg/Kg; i.p.), controle positivo deste experimento, apresentou uma redução do número de contorções abdominais em 73% ( $11 \pm 3$ ). Os resultados estão representados na Figura 29.



**Figura 29-** Gráfico demonstrando os resultados do ensaio das contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,8% em salina) em camundongos previamente tratados (30 min.) pela via intraperitoneal com o veículo (V) (10mL/kg), indometacina (I) (30mg/kg) ou compostos isolados do óleo das sementes da *P. pubescens* (C1 e C2) nas doses de 10, 30, 100 ou 300 mg/kg. Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão de até 6 animais por grupo experimental (ANOVA:  $F_{(9,50)} = 6,01$  \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

A dose necessária para reduzir 50% do efeito ( $DE_{50}$ ) foi calculada por regressão logarítmica, a partir dos resultados obtidos na curva dose-resposta. Os compostos C1 e C2 apresentaram  $DE_{50}$  de 35,6 e 18,7 mg/Kg, respectivamente.

Dando sequência ao trabalho, optou-se por utilizar C1 devido a sua maior disponibilidade de massa e por ter demonstrado potencial atividade antinociceptiva, sem afetar a atividade locomotora. Não há relatos na literatura descrevendo as ações farmacológicas de C1, portanto, avaliações com ensaios de algesia (teste da formalina), de hiperalgesia (Randal Sellito) e de alodínia (Von Frey) foram realizados para investigação de possíveis mecanismos de modulação deste composto.

### 5.2.3 Algesia induzida por Formalina

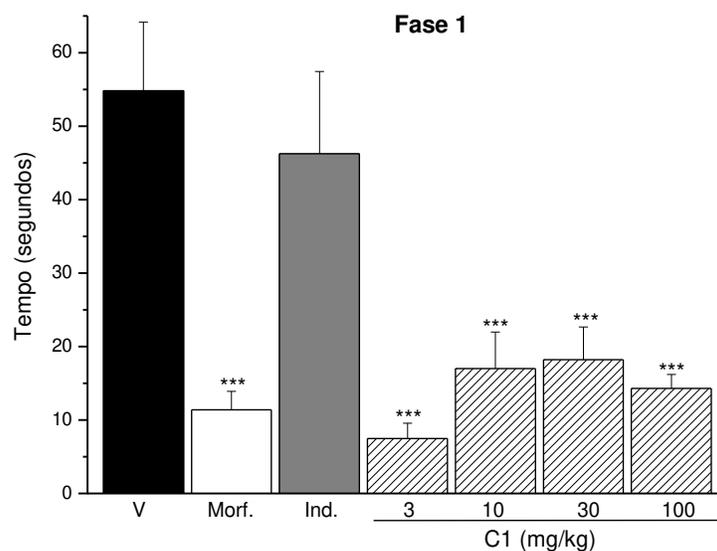
A injeção subplantar de formalina (2% em PBS, 20 $\mu$ L) na pata posterior de camundongos produziu intensa resposta nociceptiva em duas fases distintas: a primeira de 0 a 5 minutos (dor neurogênica) e a segunda de 25 a 40 minutos (dor inflamatória).

#### Fase I (0-5 minutos):

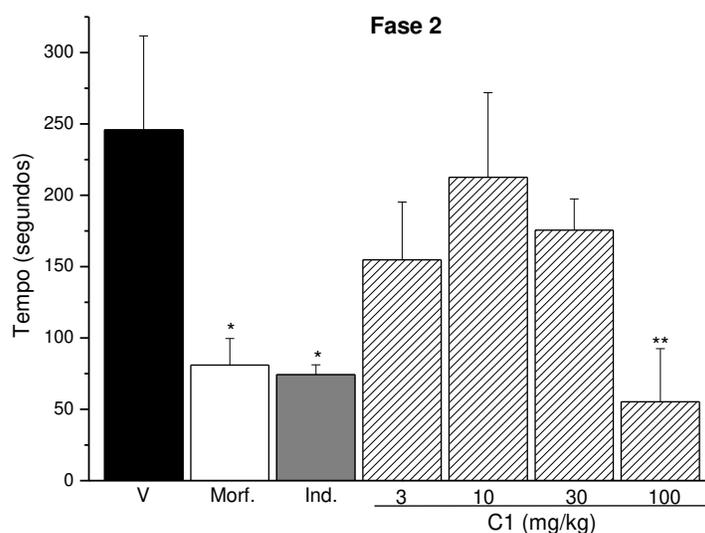
Nos animais previamente tratados (30 min.) pela via intraperitoneal com veículo (10 mL/kg), o tempo de reação foi de  $54,8 \pm 9,3$  segundos. O pré-tratamento com C1 nas doses de 3, 10, 30 e 100 mg/kg (i.p.) reduziu em 86% ( $7,5 \pm 2$ ), 69% ( $17 \pm 5$ ), 67% ( $18,2 \pm 4,5$ ) e 74% ( $14,3 \pm 1,9$ ) o tempo de reação, respectivamente. Os controles morfina (10 mg/kg; i.p.) e indometacina (30 mg/kg; i.p.), apresentaram redução de 79% ( $11,4 \pm 2,5$ ) e 16% ( $46,2 \pm 11,2$ ) respectivamente. Os resultados estão demonstrados no gráfico da Figura 30.

#### Fase II (25-40 minutos):

Nos animais previamente tratados (30 min.) pela via intraperitoneal com veículo (10 mL/kg), o tempo de reação foi de  $245,8 \pm 65,9$  segundos. O pré-tratamento com C1 nas doses de 3, 10, 30 e 100 mg/kg (i.p.) apresentou redução do tempo de reação de 37% ( $154,8 \pm 40$ ), 13% ( $212,7 \pm 59$ ), 28,6% ( $175,5 \pm 22$ ) e 77% ( $55,3 \pm 37,3$ ), respectivamente. Os controles morfina (10 mg/kg; i.p.) e indometacina (30 mg/kg; i.p.), apresentaram redução de 67% ( $81 \pm 18,7$ ) e 70% ( $74 \pm 7$ ) respectivamente. Os resultados estão demonstrados no gráfico da Figura 31.



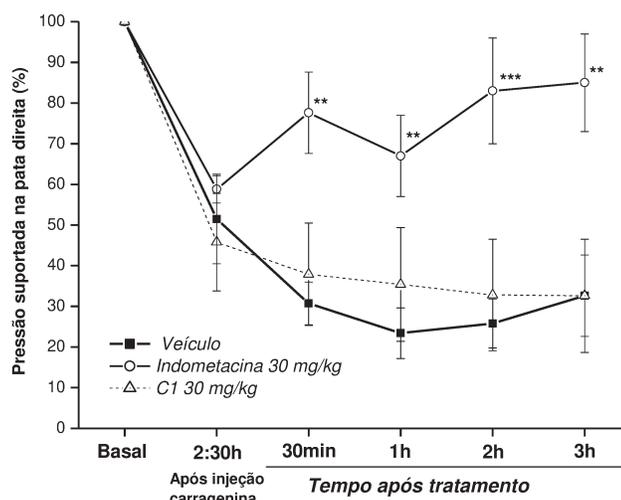
**Figura 30-** Gráfico demonstrando os resultados da reatividade a aplicação subplantar de formalina na pata posterior de camundongos previamente tratados (30 min) via i.p. com veículo (V) (10mL/kg), morfina (morf) (20 mg/Kg), indometacina (I) (30mg/kg) ou composto C1 isolado do óleo das sementes da *P. pubescens* nas doses de 3, 10, 30 ou 100 mg/kg. Os resultados, referentes a fase I do ensaio, estão expressos em média  $\pm$  erro padrão de até 6 animais por grupo experimental (ANOVA:  $F_{(6,33)} = 4,86$  \*\*\* $p \leq 0,001$ ).



**Figura 31-** Gráfico demonstrando os resultados da reatividade a aplicação subplantar de formalina na pata posterior de camundongos previamente tratados (30 min) via i.p. com veículo (V) (10mL/kg), morfina (morf) (20 mg/Kg), indometacina (I) (30mg/kg) ou composto C1 isolado das sementes da *P. pubescens* nas doses de 3, 10, 30 ou 100 mg/kg. Os resultados, referentes a fase II do ensaio, estão expressos em média  $\pm$  erro padrão de até 6 animais por grupo experimental (ANOVA:  $F_{(6,33)} = 2,97$  \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ ).

## 5.2.4 Hiperalgisia (Randal Sellito)

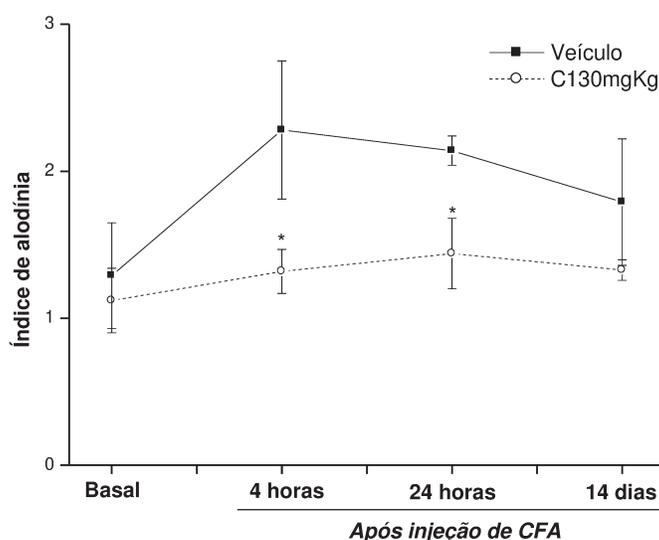
Inicialmente foi realizada a medição basal da pressão máxima suportada pelos animais antes da aplicação da carragenina. Essa pressão (g) foi convertida para porcentagem e considerada 100% (normalização dos valores dos grupos). As medições subsequentes estão expressas como a porcentagem da pressão suportada em relação à medição basal. A injeção s.pl. de carragenina produziu hiperalgisia 2h30min. após sua administração, apresentando queda das porcentagens para  $51,5 \pm 11\%$ ,  $58,8 \pm 3,4\%$  e  $45,8 \pm 12\%$  nos grupos veículo, indometacina e C1, respectivamente. A porcentagem da pressão suportada pelo grupo tratado com veículo foi de  $30,7 \pm 5,25\%$ ,  $23,4 \pm 6,2\%$ ,  $25,8 \pm 6\%$  e  $32,6 \pm 10\%$  nos tempos 30 min., 1, 2 e 3 horas após a administração, respectivamente. O grupo tratado com indometacina (30 mg/Kg; i.p.) suportou o equivalente a  $77,6 \pm 10\%$ ,  $67 \pm 10\%$ ,  $83 \pm 13\%$  e  $85 \pm 12\%$  em 30 min, 1, 2 e 3 horas após a administração, respectivamente, enquanto o grupo tratado com C1 (30mg/Kg; i.p.), nesses mesmos tempos, suportou  $38 \pm 12,6\%$ ,  $35,4 \pm 14\%$ ,  $32,8 \pm 13,7\%$  e  $32,6 \pm 13,9\%$ , respectivamente. Os resultados estão demonstrados na Figura 32.



**Figura 32-** Gráfico demonstrando a porcentagem de pressão suportada na pata direita de ratos tratados via i.p. com veículo (10mL/kg), indometacina (30mg/kg) ou composto C1 isolado das sementes da *P. pubescens* (30mg/kg). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão de até 6 animais por grupo experimental [ANOVA: 30 min.( $F_{(4,25)} = 3,72$ ;  $**p \leq 0,01$ ); 1h( $F_{(4,25)} = 3,78$ ;  $**p \leq 0,01$ ); 2h( $F_{(4,25)} = 8,44$ ;  $***p \leq 0,001$ ); 3h( $F_{(4,25)} = 6,08$ ;  $** \leq 0,01$ ).

### 5.2.5 Alodínia induzida por CFA

Uma única injeção de CFA (0,1 mL; s.pl.) manteve a pata sensibilizada durante todo experimento (14 dias), como demonstrado pela curva do grupo tratado com veículo (Figura 33). Os índices de alodínia na medição basal foram de  $1,29 \pm 0,36$  para o grupo veículo e  $1,12 \pm 0,22$  para o grupo C1. O pré-tratamento (30 min.) com veículo (10mL/Kg; i.p.) apresentou índice de alodínia de  $2,28 \pm 0,47$ ;  $2,14 \pm 0,1$  e  $1,79 \pm 0,43$  após 4 horas, 24 horas e 14 dias da injeção de CFA, respectivamente. No grupo pré-tratado com C1 (30mg/Kg; i.p.), os índices apresentados foram de  $1,31 \pm 0,15$ ;  $1,44 \pm 0,23$  e  $1,33 \pm 0,07$  após 4 horas, 24 horas e 14 dias da injeção de CFA, respectivamente.



**Figura 33-** Gráfico demonstrando o índice de alodínia, calculado a partir das pressões suportadas nas patas direita e esquerda, em resposta ao estímulo pressórico de baixa pressão (toque), em ratos tratados via i.p. com veículo (10mL/kg) ou C1 isolado das sementes da *P. pubescens* (30mg/kg). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão de até 5 animais por grupo experimental [ANOVA: 4 horas ( $F_{(4,20)} = 0,49$ ;  $*p \leq 0,05$ ); 24 horas ( $F_{(4,20)} = 2,83$ ;  $*p \leq 0,05$ )].

## 5.3 Estudos de Estabilidade

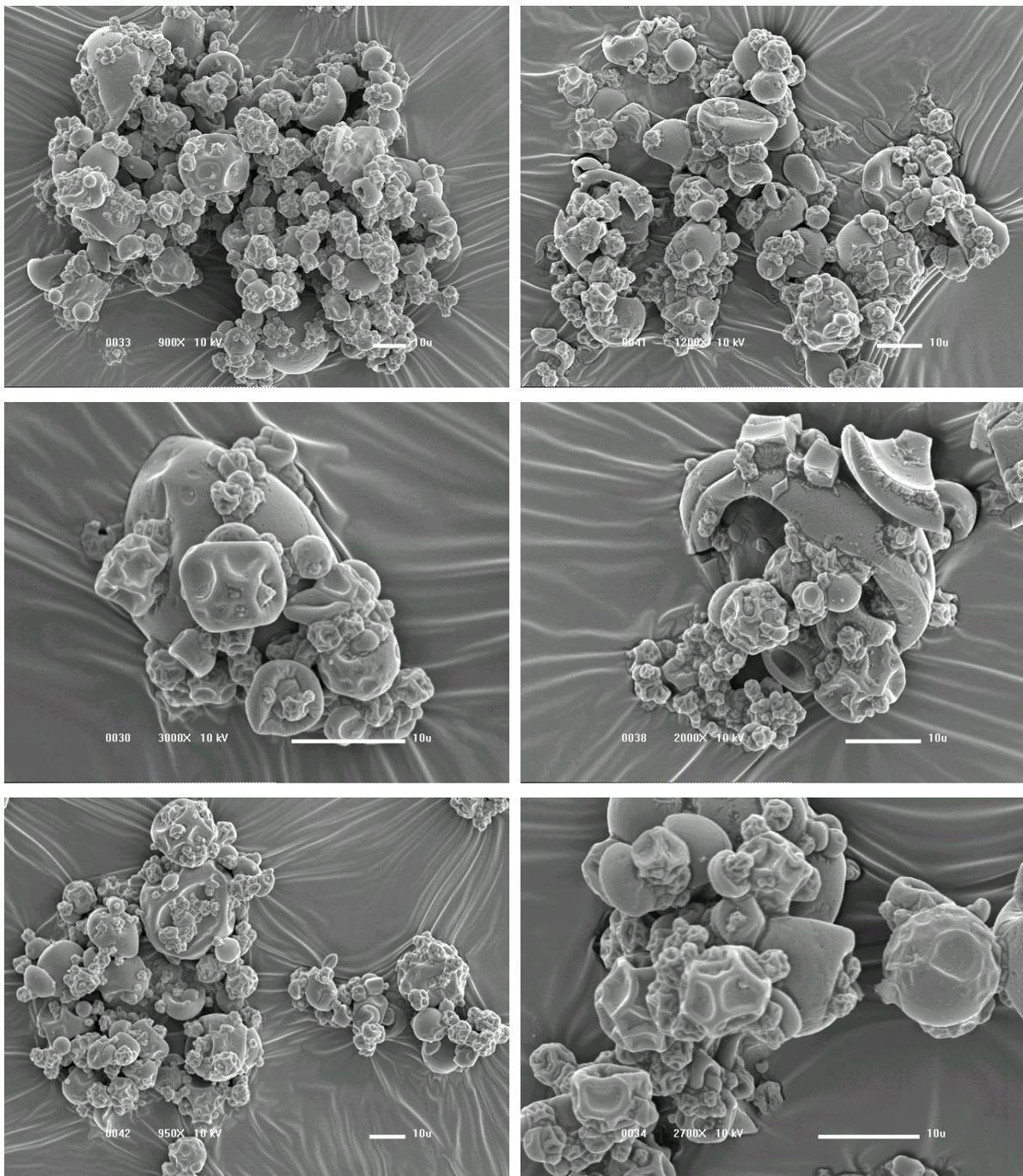
### 5.3.1 Microencapsulação da amostras

Para os estudos de estabilidade, os extratos brutos produzidos a partir do óleo das sementes de *P.pubescens* provenientes de São Paulo (EBSP), Mato Grosso (EBMT) e Bahia (EBBA) além da mistura (C1) dos isômeros éster 6 $\alpha$ -hidroxi-7 $\beta$ - acetoxi-vouacapano-17 $\beta$ -oato de metila e éster 6 $\alpha$ -acetoxi-7 $\beta$ -hidroxi-vouacapano-17 $\beta$ -oato de metila, foram microencapsulados pelo processo de atomização utilizando um mini *spray dryer* Buchi B-290. Os extratos foram escolhidos de acordo com os perfis químicos e a disponibilidade do material vegetal, contemplando duas amostras ricas em vouacapanos (EBSP e EBBA) e uma com perfil diferenciado (EBMT) que possui como composto majoritário o geranilgeraniol.

As microcápsulas e os controles (amostras não encapsuladas, denominadas livres) foram armazenados em câmara climática com condições controladas de temperatura (40°C) e umidade (70%), conforme estabelecido pela Anvisa (RE nº1- 2005) para estudos de estabilidade acelerada (Anvisa, 2009).

Observou-se a morfologia externa das microcápsulas contendo C1, referentes ao tempo 0 e 150 dias do estudo de estabilidade, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 34).

Para o monitoramento da ação nos estudos de estabilidade utilizaram-se os ensaios de atividade anticâncer *in vitro* e atividade antinociceptiva em modelos animais.



**0 dias**

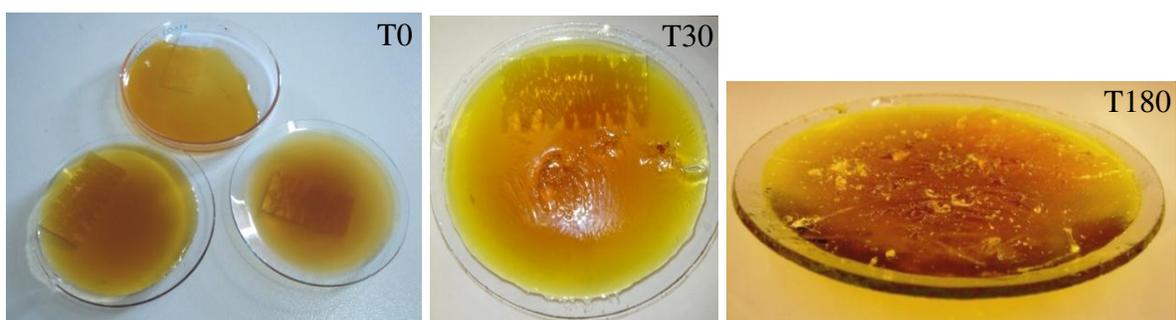
**150 dias**

**Figura 34-** Imagens obtidas através de MEV (JEOL) das formulações obtidas por *spray drying* com goma arábica, maltodextrina e C1 proveniente de *P. pubescens*, nos tempos 0 e 150 dias do estudo de estabilidade.

### 5.3.2 Estabilidade dos Extratos Brutos

#### 5.3.2.1 Avaliação do Aspecto Físico

Observaram-se alterações macroscópicas dos extratos na forma livre durante o estudo de estabilidade (Figura 35). O enrijecimento foi notado a partir do 30º dia do estudo, progredindo para um aspecto visual típico de estado vítreo no tempo 180 dias, tornando o manuseio da amostra inviável. As microcápsulas, no entanto, mantiveram suas características iniciais (Figura 36).



**Figura 35-** Foto demonstrativa dos extratos brutos na forma livre retirados da câmara de estabilidade nos tempos 0, 30 e 180 dias.



**Figura 36-** Foto demonstrativa das microcápsulas dos extratos brutos produzidas por *spray drying* e armazenadas na câmara de estabilidade.

### 5.3.2.2 Monitoramento Químico

Para avaliação do perfil químico dos extratos EBBA, EBSP e EBMT determinou-se a concentração de C1 (Tabela 2) pela análise quantitativa através do método da adição de padrão interno, utilizando dibutilftalato como padrão.

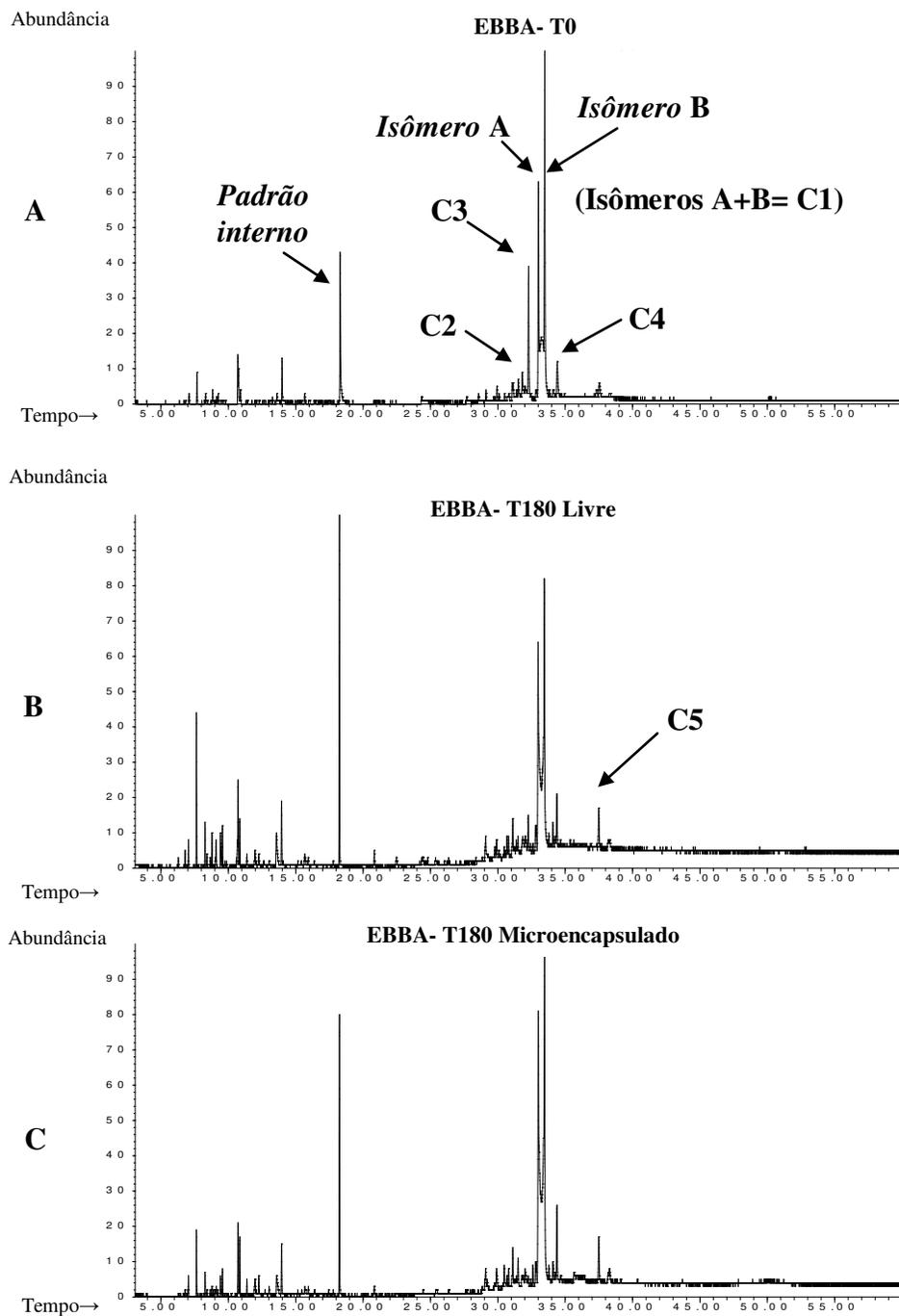
**Tabela 2-** Concentração de C1 nos extratos EBBA, EBSP e EBMT nos tempos 0 e 180 dias, determinada por quantificação em CG/EM (HP6890/ HP5975), através do método do padrão interno.

Amostras		% C1 (T 0)	% C1 (T180)
EBBA	Livre	8	13
	Microencapsulado	8	17
EBSP	Livre	8,7	13
	Microencapsulado	9	17,5
EBMT	Livre	2,8	9,6
	Microencapsulado	3	10,9

Considerando o perfil químico e a grande disponibilidade de amostra, o extrato EBBA foi escolhido para uma discussão mais detalhada. A proporção entre os isômeros de posição A e B, cuja mistura constitui C1, a concentração dos compostos vouacapânicos C2 e compostos não identificados com m/z 358 (C3), m/z 372 (C4) e m/z 374 (C5), que apresentaram variações durante o estudo de estabilidade, foram monitorados (Tabelas 3 e 4). As estimativas das concentrações desses compostos foram obtidas por extrapolação, a partir das abundâncias relativas observadas nos cromatogramas obtidos por CG/EM e utilizados para quantificação de C1 (Figura 37).

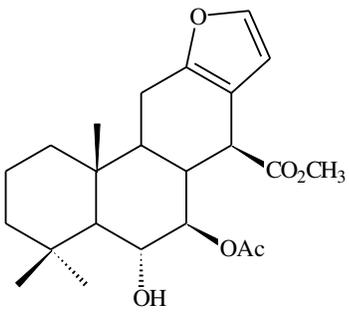
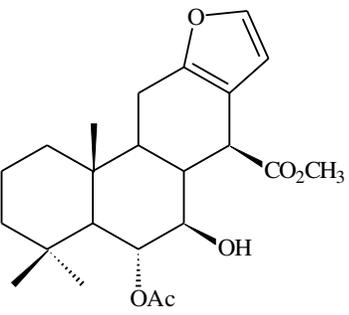
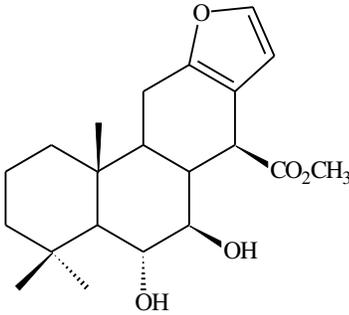
**Tabela 3-** Estimativa da proporção entre os isômeros de C1 no extrato EBBA nos tempos 0 e 180 dias, determinada a partir das suas abundâncias relativas.

Isômeros de C1	T0 (%)	T180 Livre (%)	T180 Micro (%)
A	38	48,9	48,5
B	62	51,1	51,5



**Figura 37-** Cromatogramas do extrato EBBA no tempo 0 (A) e no tempo 180 dias na forma livre (B) e microencapsulada (C), obtidos por CG/EM (HP6890/HP5975), com destaque para os compostos monitorados C1, C2, C3, C4 e C5.

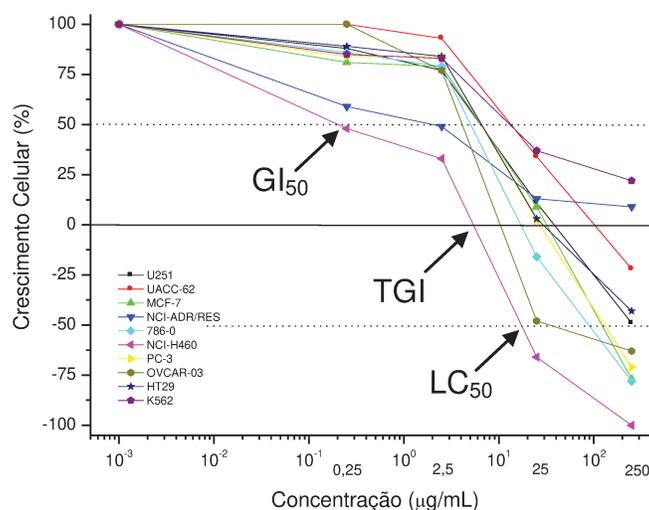
**Tabela 4-** Estimativa das concentrações de C1, C2, C3, C4 e C5 presentes no extrato EBBA nos tempos 0 (T0) e 180 dias (T180) na amostra livre e microencapsulada.

Compostos	m/z	Estrutura	T0 (%)	T180 Livre (%)	T180 Micro. (%)
C1	404		8	13	17
		+			
					
C2	362		0,35	-	-
C3	358	Não identificado	1,54	0,40	0,31
C4	372	Não identificado	0,67	0,83	1,05
C5	374	Não identificado	-	0,66	0,71

Legenda: (-) não detectado.

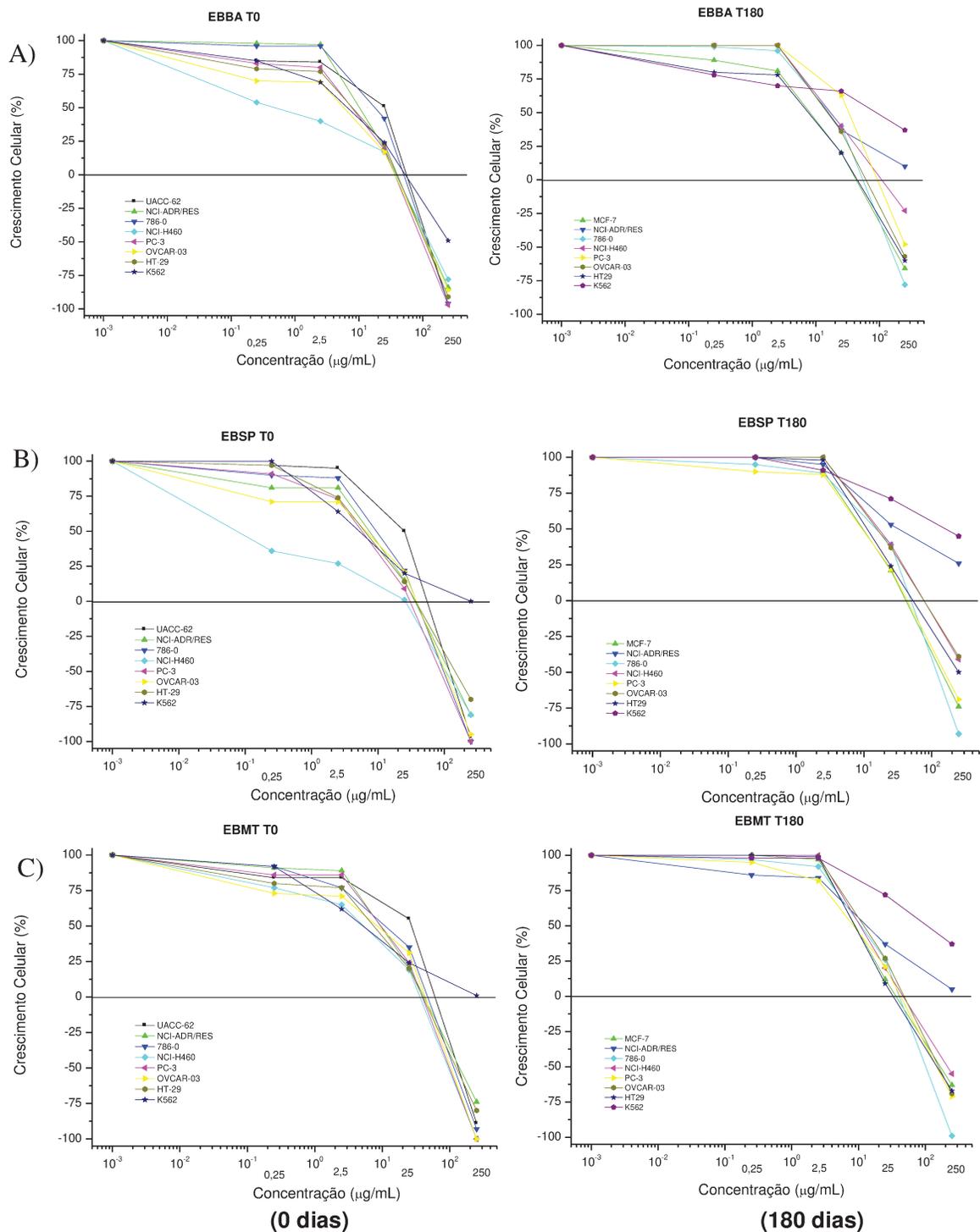
### 5.3.2.1 Atividade Anticâncer *in vitro*

Os extratos foram avaliados em cultura de células tumorais humanas nas formas livre, microencapsulada ou extraída da microcápsula. Os gráficos relacionam a porcentagem de crescimento celular com a concentração das amostras (Figura 38). Os valores abaixo de 100% e acima de zero representam crescimento celular, enquanto os negativos (abaixo de zero) representam morte celular, pois a quantidade de células (aferida pela absorbância no final do experimento), no segundo caso, é menor do que aquela que iniciou o experimento (absorbância  $T_0$ ). As concentrações efetivas  $GI_{50}$  (concentração para inibir 50 % do crescimento celular), TGI (concentração para inibir 100% do crescimento celular) e  $LC_{50}$  (concentração para que ocorra 50% de morte celular), são parâmetros utilizados para mensurar a atividade. No presente trabalho, optou-se pela concentração efetiva TGI, devido ao perfil de atividade apresentado pelas amostras.



**Figura 38-** Gráfico demonstrativo relacionando a porcentagem de crescimento celular com a concentração das amostras, em destaque as concentrações efetivas  $GI_{50}$  (concentração para inibir 50 % do crescimento celular), TGI (concentração para inibir 100% do crescimento celular),  $LC_{50}$  (concentração para que ocorra 50% de morte celular).

Os valores de TGI dos extratos EBSP, EBMT e EBBA foram calculados e apresentados na tabela 5, 6 e 7, respectivamente.



**Figura 39-** Gráficos demonstrativos da atividade anticâncer *in vitro* dos extratos A) EBBA, B) EBSP e C) EBMT nos tempos 0 e 180 dias, em cultura de células tumorais humanas (UACC-62, NCI-ADR/RES, 786-O, NCI-H460, PC-3, OVCAR-3, HT-29, MCF-7 e K562), relacionando porcentagem de crescimento versus concentração dos compostos. Ensaio da Sulforrodamina B após 48 h de exposição.

**Tabela 5-** Valores de TGI (inibição de crescimento total) do extrato bruto EBSP nos diferentes tempos do estudo de estabilidade ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Amostras EBSP		UACC-62	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-H460	PC-3	OVCAR-3	HT-29	K562	MCF-7
T0	Livre	40,95	31,64	31,65	7,46	25,76	30,85	32,95	158,76	-
	Mic	41,77	89,83	80,16	11,04	39,12	49,74	73,20	>250	-
T15	Livre	40,57	21,11	33,04	>250	53,95	31,84	92,47	147,83	-
	Mic	70,23	82,32	75,84	21,57	56,60	64,85	67,91	>250	-
T30	Livre	35,63	21,36	156,01	>250	43,91	128,72	216,96	>250	41,25
	Mic	18,12	26,47	18,61	19,16	36,30	10,55	49,14	>250	28,91
T60	Livre	15,03	34,88	>250	30,28	54,26	>250	185,41	>250	34,99
	Mic	15,29	6,26	11,15	14,52	34,84	18,12	28,19	>250	29,53
	Ext.	13,55	5,37	18,77	22,65	19,43	38,99	34,02	>250	27,05
T90	Livre	65,68	250	51,58	250	42,29	30,45	32,59	143,59	132,17
	Mic	187,22	136,89	102,77	250	168,86	57,65	67,41	132,66	128,19
	Ext.	40,01	0,27	35,72	4,92	21,43	22,49	36,84	222,3	68,76
T120	Livre	189,20	>250	24,42	220,54	17,80	15,53	62,62	25,39	14,96
	Mic	>250	>250	72,02	>250	>250	43,90	117,99	237,77	60,90
	Ext.	23,08	>250	30,34	176,02	25,02	27,93	55,95	>250	12,82
T150	Livre	40,86	>250	39,73	59,82	18,65	12,50	48,25	2,94	16,86
	Mic	69,33	>250	69,76	119,17	38,26	47,09	86,93	81,72	37,42
	Ext.	34,91	>250	28,50	65,03	28,01	17,05	22,12	26,40	8,69
T180	Livre	-	>250	40,41	80,07	40,58	80,70	55,55	>250	38,40
	Mic	-	>250	72,18	65,15	82,17	90,05	102,25	>250	54,40
	Ext.	-	>250	36,04	72,68	28,16	36,36	30,78	>250	25,65

Legenda: (Mic.) microencapsulado, (Ext.) extraído, (-) não determinado.

**Tabela 6-** Valores de TGI (inibição de crescimento total) do extrato bruto EBMT nos diferentes tempos do estudo de estabilidade ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Amostras EBMT		UACC-62	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-H460	PC-3	OVCAR-3	HT-29	K562	MCF-7
T0	Livre	50,90	38,16	39,43	27,94	32,46	35,94	33,75	185,45	-
	Mic	40,36	41,39	40,42	191,22	42,90	51,41	95,02	227,20	-
T15	Livre	40,34	33,39	37,74	44,19	30,95	36,70	37,44	185,06	-
	Mic	68,09	56,44	48,66	74,41	51,20	5082	49,11	61,55	-
T30	Livre	110,95	35,88	60,62	>250	169,70	145,75	117,13	>250	43,96
	Mic	41,46	50,16	>250	>250	97,98	128,39	191,83	>250	44,32
T60	Livre	26,91	29,32	65,32	>250	>250	38,57	30,23	>250	36,53
	Mic	110,95	81,41	>250	>250	226,54	134,39	49,36	18,12	45,30
	Ext.	20,40	15,50	13,16	148,53	35,28	28,16	30,37	31,70	18,28
T90	Livre	74,10	47,47	56,47	221,78	32,73	36,59	40,12	97,15	59,13
	Mic	121,04	31,77	66,45	250	62,37	54,29	52,64	212,49	68,60
	Ext.	73,40	35,15	37,07	11,33	33,10	27,37	33,28	21,57	43,36
T120	Livre	32,82	>250	25,86	49,64	14,27	21,57	42,86	1,92	9,91
	Mic	64,69	>250	46,77	75,62	>250	44,48	67,89	47,32	29,80
	Ext.	44,71	>250	29,93	76,10	15,51	32,85	45,37	1,96	12,35
T150	Livre	37,00	>250	20,43	96,46	10,97	5,69	60,50	14,81	17,13
	Mic	66,92	>250	34,57	74,77	>250	34,04	70,57	16,77	29,47
	Ext.	54,80	>250	18,88	92,13	1,14	5,43	48,38	0,92	11,01
T180	Livre	-	>250	32,57	48,75	38,32	44,99	34,75	>250	38,16
	Mic	-	>250	58,06	56,71	38,58	74,37	43,88	>250	32,07
	Ext.	-	>250	34,52	59,63	40,86	26,26	46,36	>250	40,23

Legenda: (Mic.) microencapsulado, (Ext.) extraído, (-) não determinado.

**Tabela 7-** Valores de TGI (inibição de crescimento total) do extrato bruto EBBA nos diferentes tempos do estudo de estabilidade ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Amostras EBBA		UACC-62	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-H460	PC-3	OVCAR-3	HT-29	K562	MCF-7
T 0	Livre	43,47	34,70	38,90	16,66	31,42	28,17	33,74	48,03	-
	Mic.	58,61	91,53	43,35	7,41	65,55	57,99	65,49	>250	-
T 15	Livre	75,65	95,28	65,00	43,27	71,01	43,14	105,43	>250	-
	Mic	100,63	128,02	69,21	>250	>250	248,17	184,15	>250	-
T 30	Livre	25,90	32,62	185,93	>250	30,28	2,38	21,88	24,01	15,10
	Mic	24,86	88,9	18,83	>250	>250	4,63	42,45	30,24	58,56
T 60	Livre	28,06	66,15	37,25	>250	24,90	1,01	64,18	84,60	19,81
	Mic	18,03	101,42	>250	83,82	>250	2,42	90,87	32,93	104,88
	Ext.	11,73	2,76	12,17	4,71	23,05	2,43	22,10	>250	18,80
T 90	Livre	44,52	28,70	22,83	6,09	28,23	5,39	29,27	22,19	25,53
	Mic	77,21	11,03	104,04	250	42,68	55,94	69,99	89,99	78,78
	Ext.	71,77	31,92	64,42	18,88	37,88	17,51	56,11	250	79,64
T 120	Livre	54,37	>250	27,49	71,83	13,13	47,08	46,96	0,33	22,67
	Mic	114,83	>250	103,89	154,28	37,76	>250	98,96	2,86	53,75
	Ext.	40,70	>250	34,52	104,86	4,28	81,33	28,48	1,49	9,69
T 150	Livre	45,91	>250	38,67	85,73	7,05	59,07	47,43	0,43	16,18
	Mic	149,91	>250	182,67	149,02	16,07	101,72	119,69	2,44	50,85
	Ext.	37,36	>250	27,47	59,52	166,83	24,97	40,37	2,67	10,17
T 180	Livre	-	>250	48,57	114,50	96,97	60,05	40,74	>250	39,25
	Mic	-	>250	109,71	142,55	221,16	96,82	143,61	>250	107,54
	Ext.	-	>250	39,12	161,78	57,12	36,58	39,44	>250	33,76

Legenda: (Mic.) microencapsulado, (Ext.) extraído, (-) não determinado.

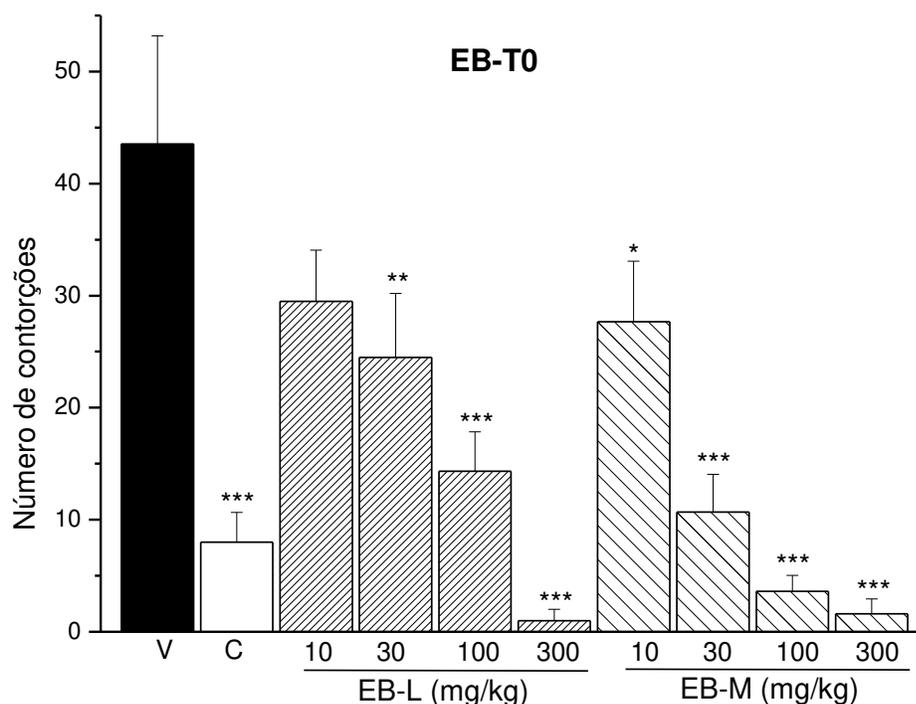
### 5.3.2.2 Atividade Antinociceptiva

Para avaliação da atividade antinociceptiva utilizou-se o ensaio das contorções abdominais induzidas por ácido acético, utilizando amostras do extrato EBBA microencapsulado e livre nos tempos 0 (T0) e 180 dias (T180) do estudo de estabilidade.

#### Tempo 0:

No grupo controle, previamente tratado com veículo (10 mL/kg; i.p.), a injeção de ácido acético (0,8% em salina 0,9%, i.p.) induziu  $43 \pm 9$  contorções durante os 15 minutos de avaliação experimental. O pré-tratamento com o EB das sementes da *P. pubescens* no tempo 0 nas doses de 10, 30, 100 e 300 mg/kg, reduziu o número de contorções abdominais em 33% ( $29 \pm 4$ ), 44% ( $24 \pm 6$ ), 67%

(14 ± 3) e 98% (1 ± 1) respectivamente, enquanto as microcápsulas do EB reduziram as contorções, nessas mesmas doses, em 35% (28 ± 5), 74% (11 ± 3), 91% (4 ± 1) e 95% (2 ± 1), respectivamente. A indometacina (30mg/kg; i.p.), controle positivo deste experimento, apresentou uma redução do número de contorções abdominais em 98% (8 ± 3). Os resultados estão representados no gráfico da Figura 40.

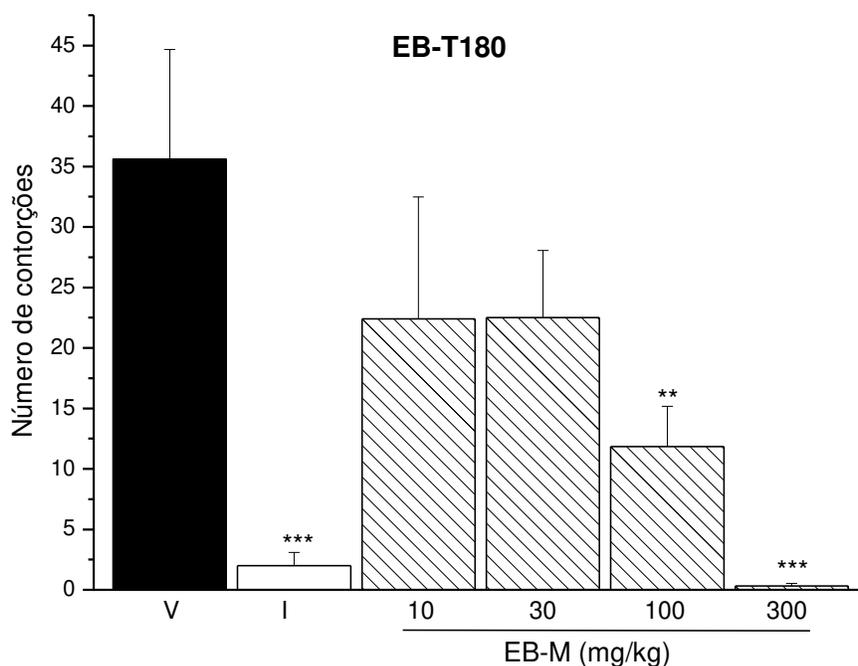


**Figura 40-** Gráfico demonstrando os resultados do ensaio das contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,8% em salina) em camundongos previamente tratados (30 min.) pela via intraperitoneal com o veículo(V) (10mL/kg), indometacina (I) (30mg/kg), extrato bruto das sementes da *P. pubescens* livre (EB-L) ou microencapsulado (EB-M), tempo 0 dias, nas doses de 10, 30, 100 ou 300 mg/kg. Os resultados são expressos em média ± erro padrão de até 6 animais por grupo experimental (ANOVA:  $F_{(9,50)} = 6,01$  \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

O extrato livre apresentou  $DE_{50}$  de 32,3 mg/Kg e o microencapsulado de 12,8 mg/Kg.

### Tempo 180 dias:

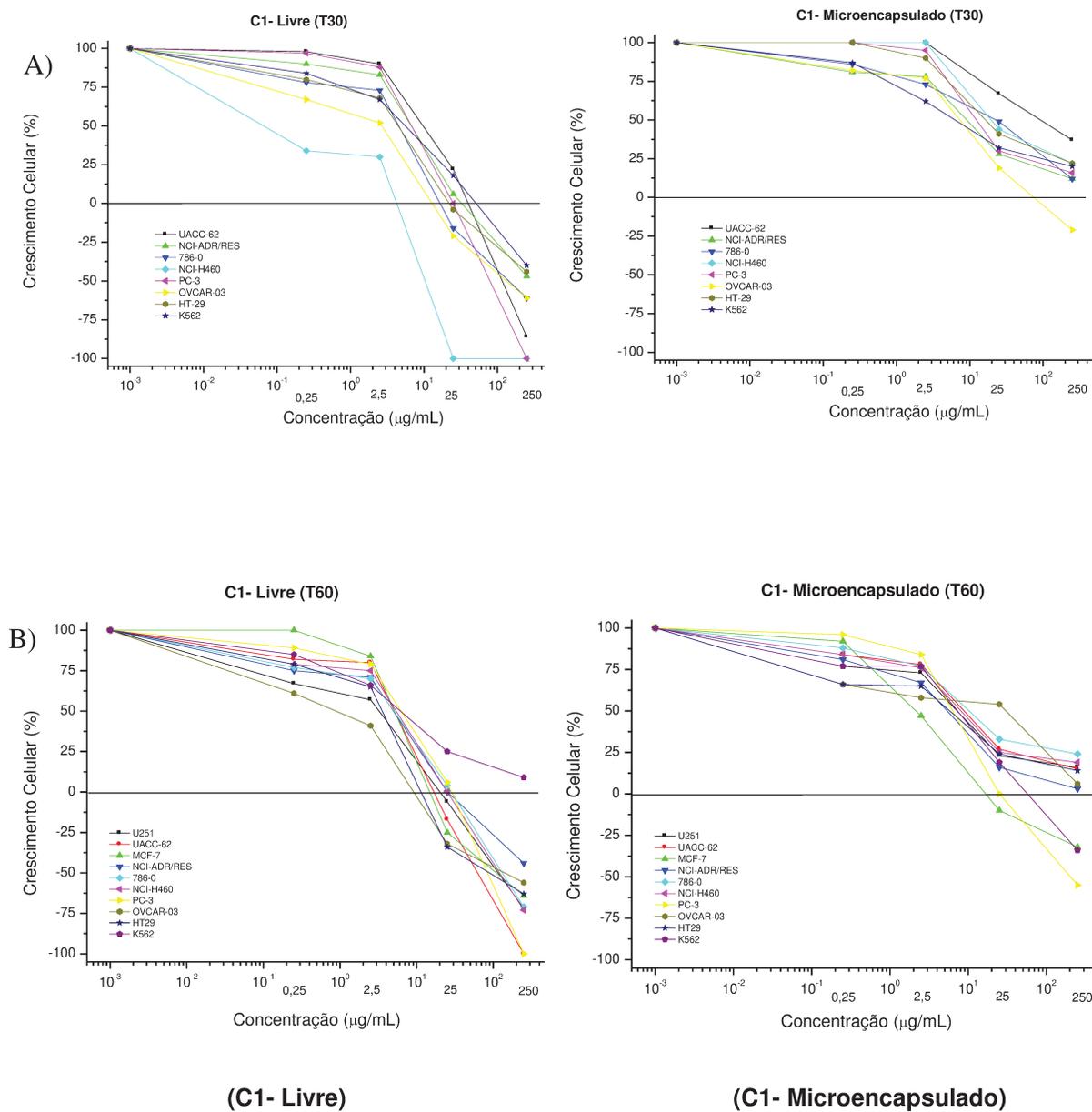
No grupo controle, previamente tratado com o veículo (10 mL/kg, i.p.), a injeção de ácido acético (0,8% em salina 0,9%, i.p.) induziu  $36 \pm 9$  contorções durante os 15 minutos de avaliação experimental. O pré-tratamento com as microcápsulas do EB-T180 nas doses de 10, 30, 100 e 300 mg/kg, reduziu o número de contorções abdominais em 39% ( $22 \pm 10$ ), 39% ( $22 \pm 5$ ), 67% ( $12 \pm 3$ ) e 99% ( $0,3 \pm 0,2$ ) respectivamente. A indometacina, controle positivo deste experimento, apresentou uma redução do número de contorções abdominais em 94% ( $2 \pm 1$ ). Os resultados estão representados na Figura 41.



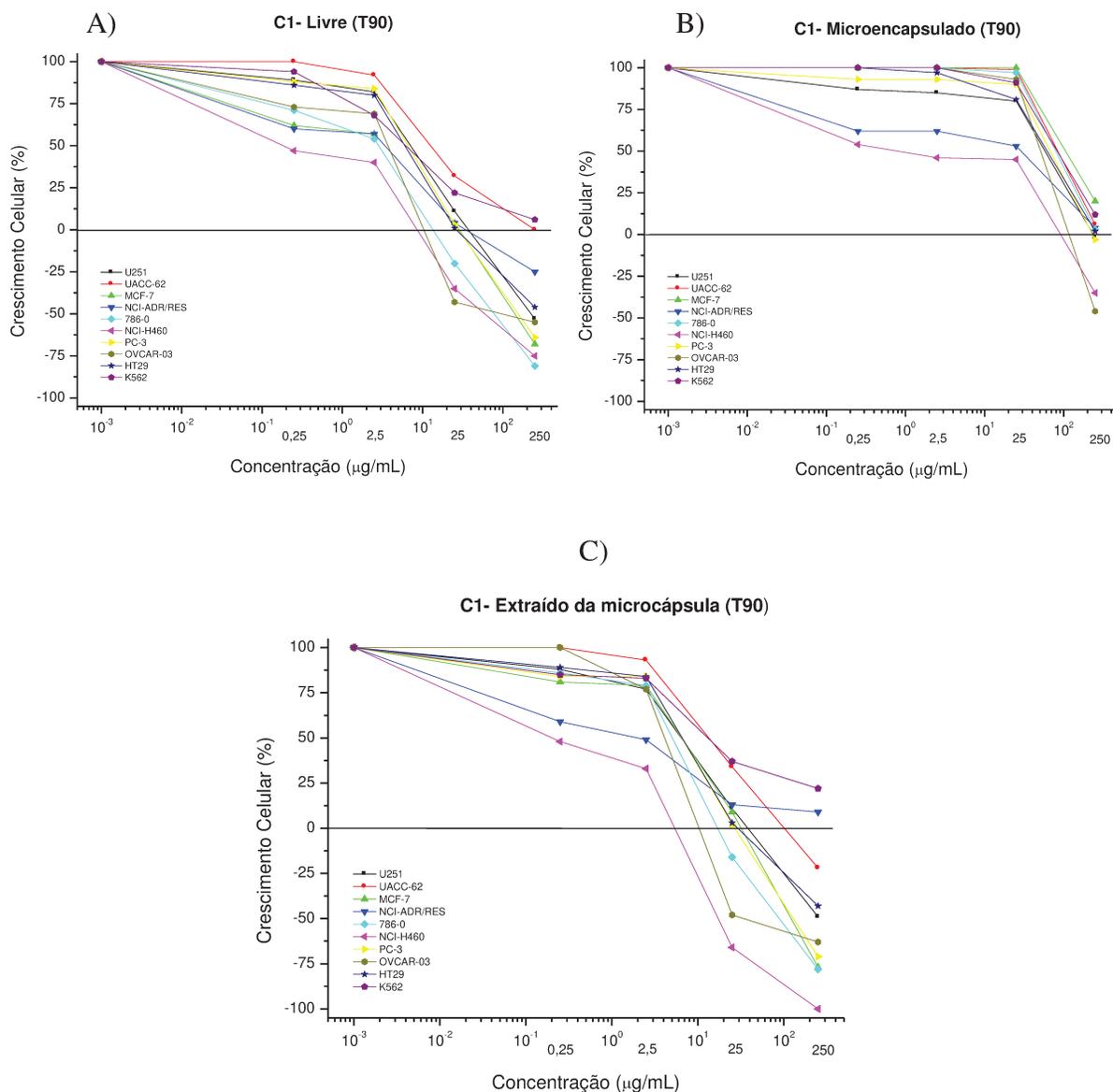
**Figura 41-** Gráfico demonstrando os resultados do ensaio das contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,8% em salina) em camundongos previamente tratados (30 min.) pela via intraperitoneal com salina (10mL/kg), indometacina (30mg/kg) ou extrato bruto das sementes da *P. pubescens* (tempo 180 dias) nas doses de 10, 30, 100 ou 300 mg/kg. Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão de até 6 animais por grupo experimental (ANOVA:  $F_{(5,30)} = 6,01$  \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

A  $DE_{50}$  do extrato microencapsulado foi de 32,4 mg/Kg.

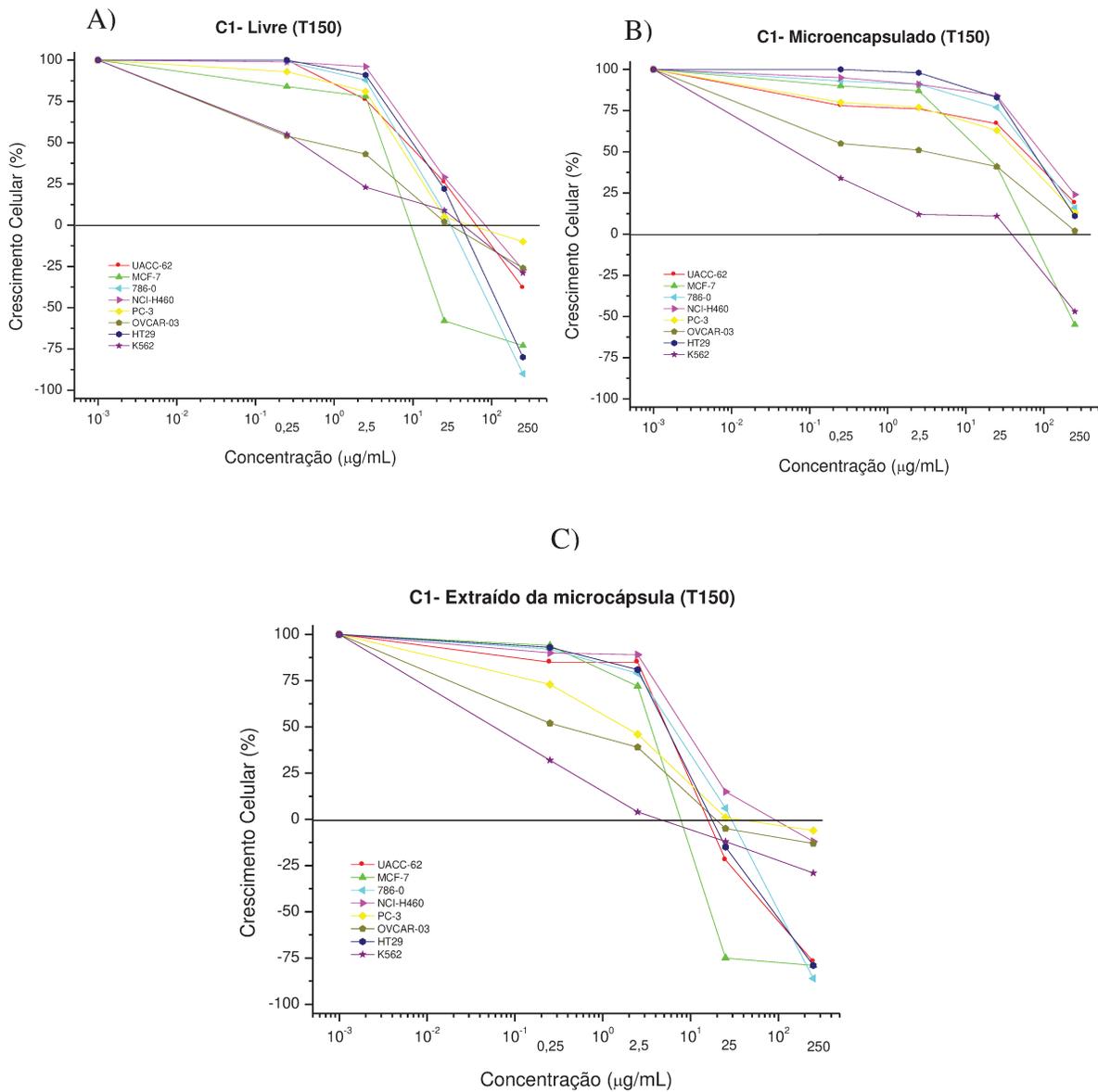




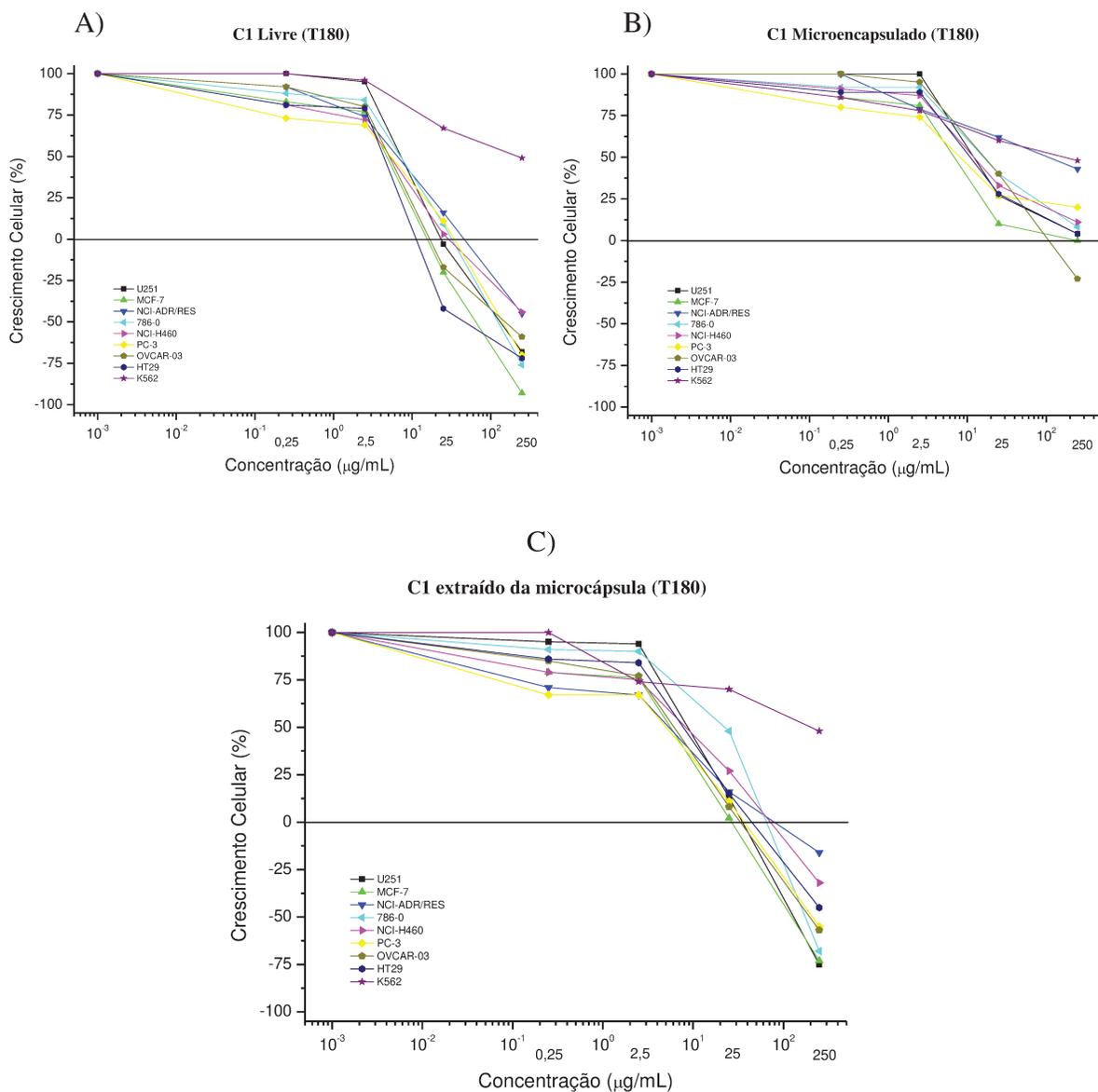
**Figura 43-** Gráficos da atividade anticâncer *in vitro* de C1 nas formas livre e microencapsulada nos tempos 30 (A) e 60 dias (B) do estudo de estabilidade, em cultura de células tumorais humanas (UACC-62, NCI-ADR/RES, 786-O, NCI-H460, PC-3, OVCAR-3, HT-29, K562 e MCF-7), relacionando porcentagem de crescimento versus concentração dos compostos. Ensaio da sulforrodamina B após 48 h de exposição.



**Figura 44-** Gráficos da atividade anticâncer *in vitro* de C1 nas formas livre (A), microencapsulada (B) e extraída da microcápsula (C) no tempo 90 dias do estudo de estabilidade, em cultura de células tumorais humanas (UACC-62, NCI-ADR/RES, 786-O, NCI-H460, PC-3, OVCAR-3, HT-29, K562 e MCF-7), relacionando porcentagem de crescimento versus concentração dos compostos. Ensaio da sulforrodamina B após 48 h de exposição.



**Figura 45-** Gráficos da atividade anticâncer *in vitro* de C1 nas formas livre (A), microencapsulada (B) e extraída da microcápsula (C) no tempo 150 dias do estudo de estabilidade, em cultura de células tumorais humanas (UACC-62, NCI-ADR/RES, 786-O, NCI-H460, PC-3, OVCAR-3, HT-29, K562 e MCF-7), relacionando porcentagem de crescimento versus concentração dos compostos. Ensaio da sulforrodamina B após 48 h de exposição.



**Figura 46-** Gráficos da atividade anticâncer *in vitro* de C1 nas formas livre (A), microencapsulada (B) e extraída da microcápsula (C) no tempo 180 dias do estudo de estabilidade, em cultura de células tumorais humanas (UACC-62, NCI-ADR/RES, 786-O, NCI-H460, PC-3, OVCAR-3, HT-29, K562 e MCF7), relacionando porcentagem de crescimento versus concentração dos compostos. Ensaio da sulforrodamina B após 48 h de exposição.

Os valores de TGI foram calculados e apresentados na Tabela 8.

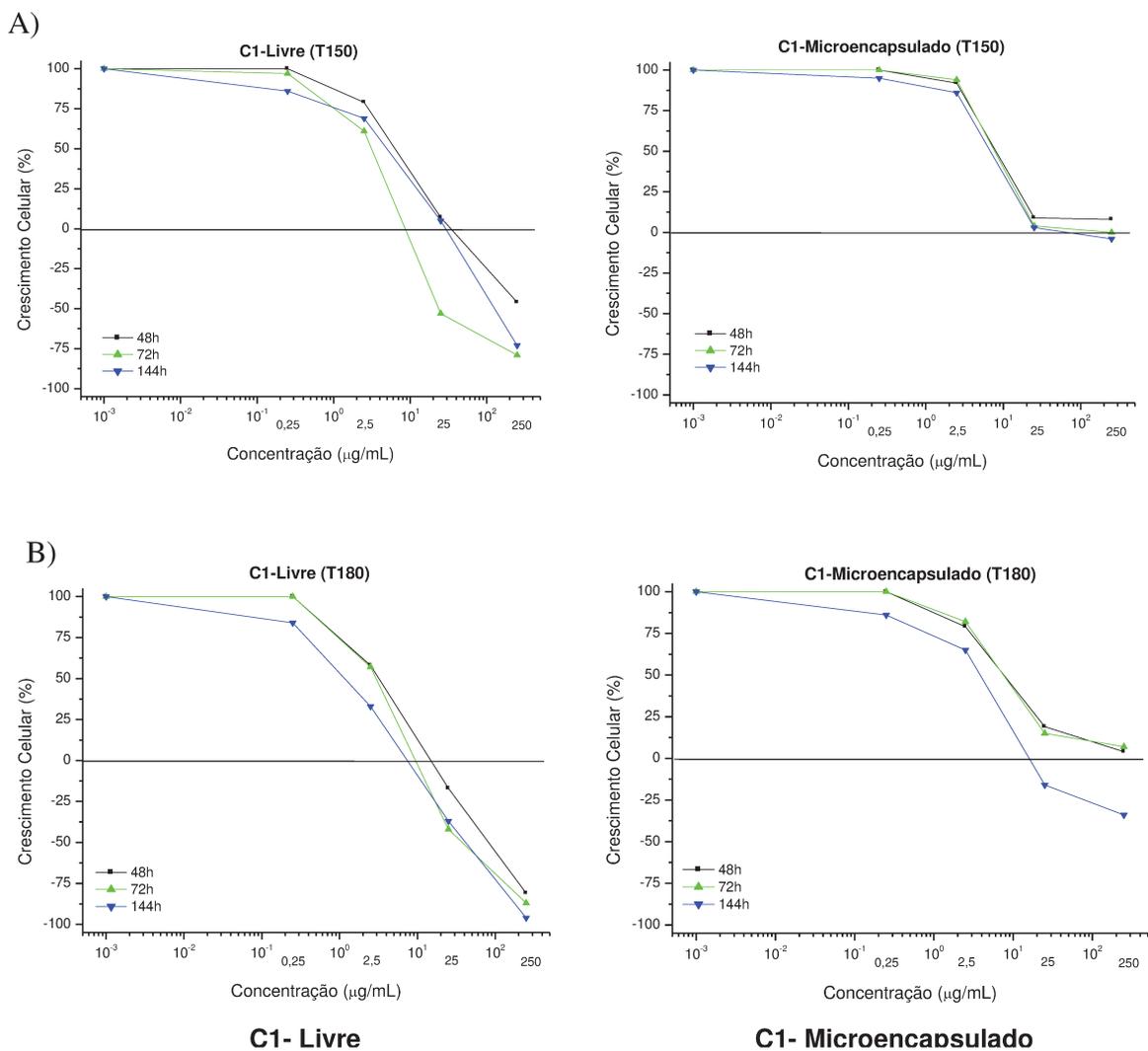
**Tabela 8-** Valores de TGI (inibição total do crescimento) de C1 nos diferentes tempos do estudo de estabilidade ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Amostra: C1		UACC-62	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-H460	PC-3	OVCAR-3	HT-29	K562	MCF-7
T 0	Livre	56,46	65,60	27,36	24,12	25,13	21,78	34,64	>250	-
	Mic	>250	>250	>250	116,55	>250	209,32	>250	>250	-
T 15	Livre	36,40	25,73	20,55	25,77	25,70	19,59	25,95	23,83	-
	Mic	>250	130,87	>250	>250	>250	>250	>250	>250	-
T 30	Livre	35,15	40,49	20,58	2,19	24,53	13,90	31,14	50,03	-
	Mic	>250	>250	>250	>250	>250	84,39	>250	>250	-
T 60	Livre	17,81	34,01	25,51	24,70	25,58	9,76	13,58	>250	18,69
	Mic	>250	185,11	>250	>250	32,76	>250	>250	61,14	29,25
T 90	Livre	193,57	47,51	12,52	6,53	30,65	12,87	36,81	220,61	20,75
	Mic	250	250	250	77,88	238,77	146,98	250	250	250
	Ext.	107,19	250	19,04	3,63	28,00	11,90	41,31	250	28,97
T150	Livre	64,12	>250	27,98	90,36	91,26	35,70	36,89	28,49	10,17
	Mic.	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	11,75	63,92
	Ext.	18,04	>250	26,46	105,48	76,74	42,46	19,65	8,33	7,66
T 180	Livre	-	46,97	30,29	36,77	28,40	22,34	12,76	>250	16,60
	Mic.	-	>250	>250	>250	>250	113,44	224,14	>250	143,91
	Ext.	-	90,12	60,50	72,37	32,48	34,54	48,77	>250	25,79

Legenda: (Mic.) microencapsulado, (Ext.) extraído, (-) não determinado.

A possibilidade da baixa potência observada para a amostra microencapsulada estar relacionada com um tempo insuficiente de exposição das amostras contra as linhagens, motivou a realização de um experimento adicional, com exposições de 72 e 144 horas além da tempo padronizado de exposição de 48 horas.

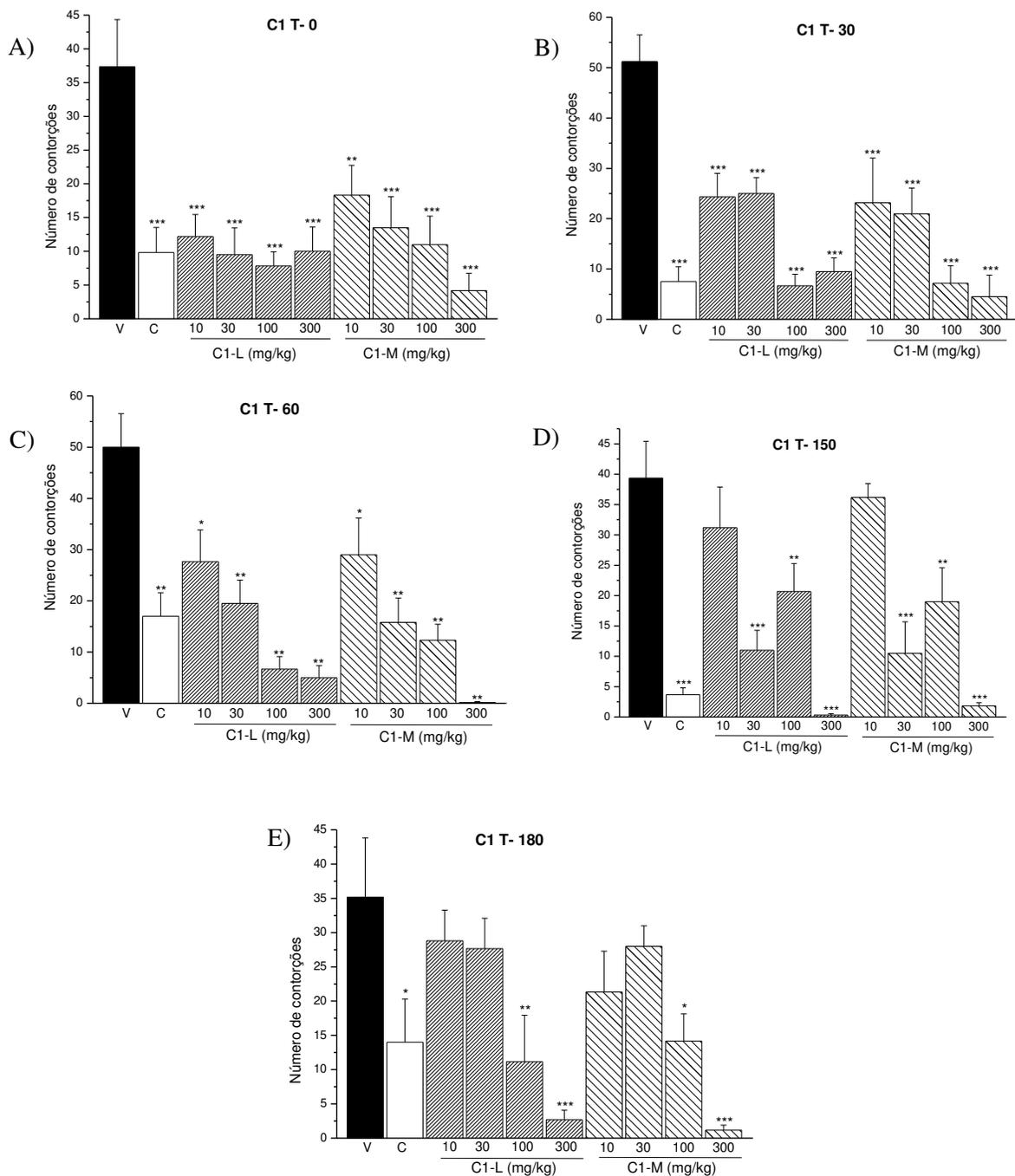
Os gráficos da Figura 47 representam a atividade anticâncer *in vitro* da amostra C1, na sua forma livre e microencapsulada nos tempos 150 e 180 dias do estudo de estabilidade, frente à linhagem de células tumorais humanas OVCAR-3, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do composto. O ensaio da sulforrodamina B foi realizado após 48, 72 ou 144 h de exposição das células às amostras.



**Figura 47-** Gráficos da atividade anticâncer *in vitro* do composto C1 nas formas livre e microencapsulada dos tempos 150 (A) e 180 dias (B) do estudo de estabilidade, em cultura de células tumorais humanas da linhagem OVCAR relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do composto. Ensaio da sulforrodamina B após 48, 72 ou 144 h de exposição.

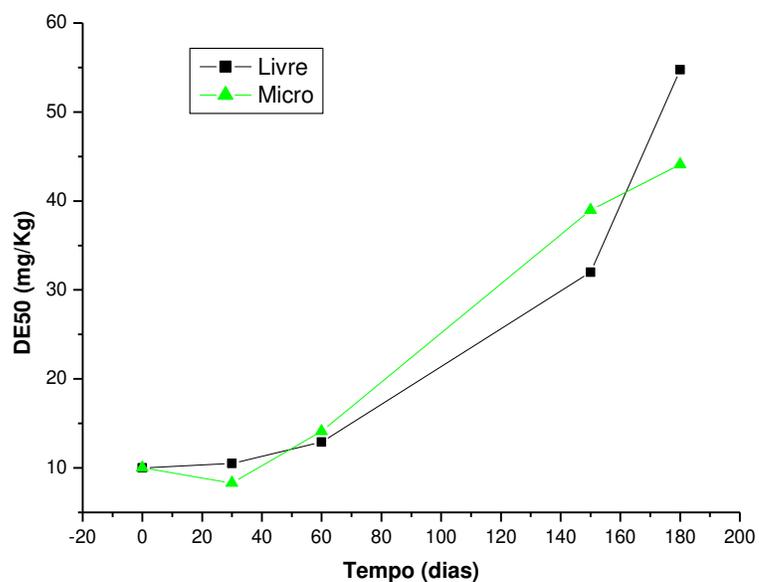
### 5.3.3.2 Atividade Antinociceptiva

Ensaio das contorções abdominais induzidas por ácido acético foram realizados com C1 livre e microencapsulado, dos tempos 0, 30, 60, 150 e 180 dias do estudo de estabilidade. Os resultados estão representados nos gráficos da Figura 48.



**Figura 48-** Gráficos dos resultados dos ensaios das contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,8% em salina) em camundongos previamente tratados (30 min.) pela via i.p. com o veículo (V) (10mL/kg), controle indometacina (C) (30mg/kg), mistura de isômeros isolada do óleo das sementes da *P. pubescens* na forma livre (C1-L) ou microencapsulada (C1-M), nas doses de 10, 30, 100 ou 300 mg/kg nos tempos 0 (A), 30 (B), 60 (C), 150 (D) e 180 dias (E). Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão de até 6 animais por grupo experimental (ANOVA: \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

Os valores de  $DE_{50}$ , calculados a partir do resultado das curvas dose-resposta, foram de 10; 10,5; 13; 32 e 55 mg/Kg para as amostras livres e 10; 8; 14; 39 e 44 mg/Kg para as microencapsuladas (Figura 49).



**Figura 49-** Gráfico demonstrando os resultados dos cálculos da dose efetiva ( $DE_{50}$ ) do composto C1 livre e microencapsulado nos tempos 0, 30, 60, 150 e 180 dias do estudo de estabilidade.

## 6 DISCUSSÃO

Desde meados dos anos 80, a influência dos produtos naturais para o descobrimento de novos protótipos para desenvolvimento de fármacos, foi ofuscada pela química combinatória e técnicas de modelagem por computador. Essa transição se deu pela expectativa de que essas novas técnicas permitiriam maciçamente identificar novos alvos terapêuticos. Porém, segundo Newman & Cragg (2007), McChesney *et al.* (2008) e Newman (2008), ficou demonstrado que faltavam, às bibliotecas combinatórias, a complexidade de novos esqueletos inovadores, associados a produtos naturais bioativos, com centros quirais, substituintes heterocíclicos e estruturas policíclicas. Portanto, os produtos naturais continuam sendo a mais produtiva fonte de novas moléculas para o desenvolvimento de novos fármacos (Harvey, 2008).

As plantas medicinais sintetizam vários compostos biologicamente ativos, que na maioria das vezes, são produtos do metabolismo secundário e estão relacionados à interação da planta com o ambiente. A ampla diversidade de metabólitos secundários está relacionada a diferentes atividades biológicas, justificando a necessidade de um aprofundamento no conhecimento das propriedades das espécies vegetais e sua utilização na formulação de medicamentos. Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários nas plantas, ocorrem em diferentes razões (sazonais e diárias; intra-planta, inter e intra-específica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão gênica pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos. A qualidade e a padronização de fitoterápicos têm papel fundamental na obtenção de produtos com constância de composição e propriedades terapêuticas reprodutíveis (Corrêa *et al.*, 2006).

Os estudos e a crescente utilização dos fitoterápicos fizeram despertar em

todo o mundo uma preocupação com a sua eficácia, pois além da influência do cultivo, o processamento inadequado das plantas pode ocasionar destruição das moléculas, implicando na perda da atividade farmacológica. Como exemplo, pode-se citar o uso do aquecimento excessivo na secagem da planta ou na evaporação do solvente empregado na extração dos princípios ativos. A vida útil do extrato também é limitada pela exposição ao oxigênio, umidade e luminosidade (Heinrich *et al.*, 2007). Segundo a Anvisa, para a transformação de uma planta em medicamento deve-se visar a preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a segurança de utilização, além de valorizar o seu potencial terapêutico. Portanto, a produção de medicamentos fitoterápicos requer, necessariamente, estudos prévios envolvendo aspectos botânicos, agrônômicos, químicos, estudos farmacológicos e toxicológicos, além do desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas, para garantia da padronização do medicamento fitoterápico (Anvisa, 2009).

Entre as alternativas que podem ser utilizadas para preservar as características do material vegetal, destaca-se a encapsulação em lipossomas, microemulsões, micro e nano partículas poliméricas que, além de prolongarem o tempo de estocagem de produtos alimentícios e farmacêuticos, são capazes de compartimentalizar o fármaco em ambientes restritos, de forma a direcioná-lo para regiões específicas, favorecendo sua interação com diferentes sistemas biológicos (Heinrich *et al.*, 2007).

Os estudos com produtos obtidos a partir das sementes *P. pubescens*, iniciados em 1998 pelo nosso grupo de pesquisa, tiveram como objetivo a avaliação da eficácia, englobando análises das atividades antiinflamatória e antinociceptiva em modelos animais, atividade anticâncer *in vitro*, além de estudos que verificaram eventuais efeitos toxicológicos (Denny, 2002; Spindola, 2006).

Denny (2002) demonstrou que o óleo de *P. pubescens*, obtido por prensagem das sementes, apresentou ação antiinflamatória nas doses de 200 e

300 mg/kg (v.o.), quando avaliado em modelo de edema de pata em camundongos e na dose de 300 mg/Kg, quando avaliado em modelo de edema de orelha em camundongos, produzido pela aplicação tópica de óleo de cróton. Em ratos adrenalectomizados o óleo manteve atividade antiedematogênica, eliminando a exclusividade da atividade antiinflamatória por corticóides endógenos. A ação antinociceptiva ficou evidenciada no teste de placa quente, onde o óleo na dose de 300 mg/kg (v.o.), dobrou o tempo para reação ao estímulo nociceptivo. Em ensaios toxicológicos, ratos tratados pela via subcutânea, por 14 dias, na dose 30 mg/kg não apresentaram alterações no ganho de peso e histopatológicas. Já nas doses de 100 e 300 mg/kg a redução no ganho de peso foi de 50 e 75%, respectivamente. Na dose de 300 mg/kg foram observadas ainda gastrite, discreta nefrite intersticial e vacuolização de hepatócitos. Essas ações são também observadas com os antiinflamatórios não esteroidais, que por inibição da síntese de prostaglandinas produzem esses efeitos adversos (Denny, 2002).

Identificada a ação do óleo das sementes obtido por prensagem, o trabalho teve sequência com Spindola (2006), avaliando os efeitos do extrato bruto diclorometânico (EB) obtido através da moagem das sementes juntamente com gelo seco, seguida de extrações com diclorometano. No ensaio hipocrático, modelo que permite observar possíveis mudanças comportamentais, observou-se que o tratamento pela via intraperitoneal com EB nas doses 30, 100, 300 e 1000 mg/kg, não demonstrou alterações significativas nas características gerais dos animais, quando observados por um período de três horas. Para avaliação da atividade antinociceptiva, Spindola (2006) utilizou os modelos de nocicepção de contorções abdominais induzidas por ácido acético, placa quente e algesia produzida pela injeção subplantar de formalina. No ensaio das contorções abdominais, o EB demonstrou-se efetivo nas doses de 100 e 300 mg/kg ( $p \leq 0,05$ ), caracterizando um aumento na atividade específica em relação ao óleo obtido por prensagem nos estudos realizados por Denny (2002), sugerindo que os compostos com potencial antinociceptivo foram extraídos pelo diclorometano. No

teste da placa quente observou-se efetividade nas doses de 100 e 300 mg/kg ( $p \leq 0,001$ ), sugerindo que o EB, quando avaliado por este ensaio, apresentava atividade em dor de origem neurogênica, atuando diretamente no SNC. Para o ensaio da formalina utilizou-se a dose de 1g/kg. O EB foi efetivo ( $p \leq 0,01$ ) na fase I (dor neurogênica) e na fase II (dor inflamatória), corroborando a ação antiinflamatória do óleo demonstrada por Denny em 2002 (Spindola, 2006).

Demonstrada a ação do EB, partiu-se para o fracionamento através de métodos cromatográficos em coluna filtrante e clássica, originando duas frações ativas: 1) fração com os componentes majoritários geranilgeraniol e 6 $\alpha$ -acetoxi-7 $\beta$ -hidroxivouacapano e 2) fração livre do composto vouacapânico. Ambas frações apresentaram efeitos antinociceptivos na dose de 300 mg/kg, v.o., nos ensaios das contorções abdominais induzidas por ácido acético e da capsaicina ( $p \leq 0,001$ ). No ensaio da placa quente, o tratamento prévio com naloxona não bloqueou a atividade dessas frações, administradas na dose de 100 mg/Kg, v.o., sugerindo o não envolvimento de receptores opióides na atividade antinociceptiva dos princípios ativos presentes nas frações (Spindola, 2006). O provável mecanismo de ação antinociceptiva está em fase de estudo (Spindola, 2010).

Em cultura de células tumorais humanas, o perfil de atividade (diminuição de crescimento e morte celular) apresentado pelo óleo de sucupira, foi muito semelhante ao apresentado pela dexametasona, indometacina e meloxicam. Considerando que as prostaglandinas desempenham papel importante na progressão e desenvolvimento tumoral, os estudos *in vitro* reforçaram a hipótese de inibição da síntese desses eicosanóides como provável mecanismo de ação dos princípios ativos desse óleo. Portanto, ensaios *in vitro* foram utilizados para o monitoramento do processo de isolamento dos diterpenos furânicos, envolvidos nas atividades antiinflamatória e antinociceptiva (Denny, 2002).

Em estudo do fracionamento biomonitorado do extrato diclorometânico das sementes de *P. pubescens*, Spindola e colaboradores (2009) relataram a atividade

anticâncer *in vitro*, em cultura de células tumorais humanas, dos compostos éster 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxiouacapano-17 $\beta$ -oato de metila (C2), 6 $\alpha$ -acetoxi-7 $\beta$ -hidroxiouacapano (C6) e 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxiouacapano-17 $\beta$ -metilenol (C7) (Figura 28). Os compostos apresentaram grande seletividade, dependente da concentração, para linhagem de próstata (PC-3). O composto C6 foi 26 vezes mais potente para inibir 50% do crescimento da linhagem PC-3, 15 vezes mais citostático e 6 vezes menos tóxico, quando comparado com o controle doxorrubicina. Esta seletividade para linhagem PC-3 sugeriu que os furanoditerpenos analisados possuem mecanismo de ação similar, provavelmente envolvendo receptores androgênicos.

A atividade antinociceptiva dos compostos C2 e geranigeraniol, isolados das sementes de *P. pubescens*, bem como os mecanismos envolvidos na ação desses compostos, foi demonstrada recentemente por Spindola e colaboradores (Spindola *et al.*, 2010).

Tendo em vista os resultados anteriormente apresentados, o presente estudo avaliou os benefícios do processo de microencapsulação por *spray drying*, para preservação das características e ações biológicas *in vitro* e *in vivo* dos extratos e compostos isolados, obtidos de *P. pubescens*.

Inicialmente, considerando a necessidade de padronização da matéria-prima para o desenvolvimento dos estudos, avaliou-se o perfil cromatográfico, observado por CG/EM, dos extratos brutos produzidos a partir do óleo das sementes de *P. pubescens*, provenientes dos estados de Minas Gerais (EBMG), Mato Grosso (EBMT), Bahia (EBBA) e São Paulo (EBSP) (Figura 20). Constatou-se que o extrato EBMT se diferenciava significativamente dos demais por apresentar um componente majoritário que foi caracterizado, através de seus dados espectrais, como sendo o composto geranigeraniol, anteriormente identificado por Spindola (2006). As amostras EBMG, EBBA e EBSP demonstraram perfis análogos, ricos em vouacapanos, com algumas variações na

abundância dos compostos.

Com o propósito de isolar compostos vouacapânicos para utilização neste trabalho, optou-se pelo fracionamento dos extratos EBMG e EBSP, ricos nesses componentes. Os vouacapanos isolados: C1 (mistura dos isômeros éster 6 $\alpha$ -hidroxi-7 $\beta$ -acetoxi-vouacapano-17 $\beta$ -oato de metila e éster 6 $\alpha$ -acetoxi-7 $\beta$ -hidroxi-vouacapano-17 $\beta$ -oato de metila) e C2 (éster 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxivouacapano-17 $\beta$ -oato de metila) foram avaliados nos ensaios de atividade locomotora (*open-field*) e atividade antinociceptiva (contorções abdominais induzidas por ácido acético) para comparação do perfil farmacológico.

A avaliação farmacológica iniciou com o teste *open-field*, com a finalidade de avaliar se os compostos interferiam na atividade locomotora dos animais. Os ensaios de nocicepção envolvem ações comportamentais, portanto, uma droga que interfira na locomoção poderia produzir um resultado falso positivo. O tratamento com C1 e C2 (30 mg/Kg, i.p.) não afetou a locomoção dos animais, ao contrário do observado no tratamento com o controle positivo pentobarbital (35 mg/Kg, i.p.), que reduziu significativamente a locomoção ( $p \leq 0,001$ ).

Para avaliação da atividade antinociceptiva, utilizou-se o ensaio das contorções abdominais induzidas por ácido acético. O ácido acético é um estímulo conveniente para testes de triagem por produzir uma resposta cuja intensidade depende da interação de vários eventos, neurotransmissores e neuromoduladores que determinam a nocicepção, tais como cininas, acetilcolina, substância P e prostaglandinas. Neste modelo pode-se avaliar se a amostra apresentava ou não ação analgésica, seja por dor neurogênica (periférica), central ou inflamatória. Desta forma, pode-se concluir que o modelo é sensível a substâncias analgésicas de ação central ou periférica dotada dos mais variados mecanismos de ação (Shafiee *et al.*, 2003; Cervero & Naird, 1999). A reação dolorosa deste teste é sensível a drogas com atividade analgésica semelhante à aspirina, aos antagonistas de receptores cininérgicos e aos analgésicos opióides de ação

central e periférica (Siegmund *et al.*, 1957; Ochi *et al.*, 2002).

Alguns autores citam o uso de soluções de ácido acético com concentrações de 0,6% (Santos *et al.*, 2005), 0,7% (Shafiee *et al.*, 2003) ou 0,8% (Gonçales *et al.*, 2005), por isso padronizou-se a concentração que melhor respondesse aos testes em nossos laboratórios. A concentração de 0,8% foi a que melhor promoveu a resposta nociceptiva nos animais. O volume da solução injetada foi constante (10 mL/Kg).

No ensaio das contorções, a atividade dos vouacapanos C1 e C2 foi avaliada através de curvas dose-resposta, utilizando as doses de 10, 30, 100 e 300 mg/Kg. Os compostos foram ativos em todas as doses, apresentando dose efetiva (DE<sub>50</sub>) de 35,6 mg/Kg para C1 e 18,7 mg/Kg para C2.

O composto C2 está inserido em trabalhos paralelos a este, com a avaliação dos mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva (Spindola, 2010). Para C1, no entanto, ainda não haviam relatos na literatura descrevendo suas ações farmacológicas. Em vista disso, aliado ao alto rendimento apresentado nos processos de fracionamento, escolheu-se C1 para dar sequência aos trabalhos.

Antes de iniciar os estudos de estabilidade, realizaram-se alguns ensaios complementares para comprovação da atividade antinociceptiva de C1. O ensaio das contorções abdominais possui baixa especificidade, pois vários compostos como anti-histamínicos, parassimpatomiméticos, estimulantes do sistema nervoso central, inibidores da MAO, antagonistas serotoninérgicos, neurolépticos e bloqueadores adrenérgicos podem também inibir as contorções (Rates e Barros, 1994). Utilizou-se, portanto, o ensaio da formalina em camundongos, modelo químico de nocicepção, que fornece uma resposta mais específica comparativamente ao modelo do ácido acético (Tjolsen *et al.*, 1992). Descrito originalmente em gatos e ratos, o ensaio da formalina foi adaptado para camundongos (Hunskaar *et al.*, 1985). A injeção subcutânea de formalina

determina o aparecimento de uma gama de respostas motoras bem caracterizadas, cuja quantificação permite que se avalie a intensidade da resposta nociceptiva (Dubuisson e Dennis, 1977). A estimulação de fibras nervosas nociceptivas aferentes produz dor intensa, revelada por lambidas, mordidas e “sacolejos” vigorosos da pata injetada (Tjolsen *et al.*, 1992).

Em roedores, o ensaio da formalina caracteriza-se por apresentar duas fases distintas de nocicepção (fase I e fase II). A *fase I* inicia logo após a injeção da formalina e estende-se durante os primeiros 5 minutos. É a fase onde ocorre a produção da dor neurogênica, possivelmente através da estimulação direta de terminações aferentes nociceptivas. A participação de mediadores periféricos como a substância P, bradicinina, histamina e serotonina é bem comprovada. Na medula, a mediação ocorre principalmente através da liberação de substância P e glutamato. Esta fase é inibida por agonistas opióides, como o fentanil e morfina, e por agonistas ou antagonistas de receptores de bradicinina B1 e B2 (Hunskaar *et al.*, 1986, Hunskaar & Hole, 1987). A *fase II* coincide como aparecimento da dor de origem inflamatória. Ocorre entre 25 e 45 minutos após a injeção da formalina e está relacionada com a produção e liberação de vários mediadores pró-inflamatórios como a histamina, serotonina, prostaglandinas e bradicinina. Esta fase é sensível aos antiinflamatórios não esteroidais e esteroidais e aos analgésicos opióides de ação central ou periférica (Hunskaar & Hole, 1987).

As duas fases da resposta à formalina têm mediação química e mecanismos de modulação distintos, apresentando diferenças marcantes quanto a sua sensibilidade a drogas analgésicas. Um caráter neurogênico é atribuído à primeira fase, sendo sensível a analgésicos opióides e a alguns agonistas das vias descendentes, enquanto a segunda fase é mais bem caracterizada como dor de origem inflamatória, sendo sensível a analgésicos antiinflamatórios não-esteroidais (Hunskaar & Hole, 1987; Shibata *et al.*, 1989; Abbott *et al.*, 1995).

A estimulação nociceptiva prolongada pode produzir a facilitação da

transmissão dolorosa, podendo esta permanecer ativa além do período de estimulação. Tal fenômeno é decorrente do aumento da sensibilidade das terminações nociceptivas periféricas (sensibilização periférica) e pelo aumento da excitabilidade dos neurônios dorsais medulares no SNC (sensibilização central) (Rang & Dale, 1999). Como mecanismo geral, a estimulação nociceptiva promoveria a liberação de substância P e aminoácidos excitatórios (ex.: glutamato) de neurônios aferentes da medula dorsal. Deste modo, a substância P e os aminoácidos excitatórios, liberados na medula a partir das fibras C- aferentes durante a primeira fase de reação dolorosa induzida pela formalina, promoveriam a ativação de receptores glutamatérgicos. A consequente sensibilização dos neurônios espinhais por liberação do óxido nítrico e prostaglandinas, levaria a sensibilização central e hiperalgesia manifestadas durante a segunda fase (Wiertelak *et al.*, 1994; Carr e Goudas, 1999).

No ensaio da formalina, C1 apresentou diferentes comportamentos nas duas fases avaliadas. Na fase I (0-5 minutos), representativa da resposta à dor neurogênica, C1 demonstrou efetividade em todas as doses testadas, em especial na menor (3 mg/Kg). A resposta foi estatisticamente igual à apresentada pela morfina, controle positivo dessa fase do experimento. Este resultado sugere que a ação antinociceptiva da mistura C1 pode estar relacionada a mecanismos tanto centrais quanto periféricos.

Transcorridos 20 minutos da avaliação da dor neurogênica, iniciou-se a fase II do ensaio, com duração de 15 minutos. Nessa fase, representativa da resposta a dor de origem inflamatória, C1 foi efetivo apenas na maior dose (100 mg/Kg) com 77 % de redução a resposta nociceptiva. A indometacina, controle positivo da fase II, reduziu a resposta em 70 % e a morfina, que é ativa em ambas as fases, reduziu em 67 %. Estes resultados demonstraram que a atividade antinociceptiva de C1 está mais relacionada à dor neurogênica do que de origem inflamatória, como o evidenciado pela necessidade uma dose mais elevada para ser efetivo na segunda fase.

Finalizando os estudos das possíveis mediações, envolvidas na modulação do efeito antinociceptivo da amostra C1, realizaram-se dois ensaios complementares, um de hiperalgesia e um de alodínia. No ensaio de hiperalgesia foi avaliada a pressão máxima suportada pelos animais na pata inflamada pela injeção de carragenina. A redução da pressão suportada 2:30 horas após administração da carragenina, caracterizou o estado hiperalgésico. A indometacina (30 mg/Kg, i.p.), controle positivo deste experimento, demonstrou-se ativa em todas as fases (30 min, 1,2 e 3 horas pós-tratamento), enquanto C1 (30 mg/Kg; i.p.) apresentou redução não significativa da resposta nociceptiva em relação ao grupo tratado com veículo.

Com os resultados do ensaio de hiperalgesia, que possui essencialmente componentes inflamatórios, sugeriu-se que C1 tem maior afinidade por componentes neurogênicos, ou seja, do próprio receptor ou neurônio. Esse resultado corrobora o demonstrado pela segunda fase do teste da formalina, em que houve necessidade de aumento de dose para ter atividade na dor inflamatória. No ensaio de alodínia, onde se avaliou a resposta ao toque nos animais submetidos a injeção subplantar de CFA, a amostra C1 (30mg/Kg; i.p.) demonstrou-se efetiva nas duas primeiras fases (4 e 24 horas após administração de CFA). Neste ensaio utilizou-se um estímulo pressórico de baixa pressão ( $\leq 35$  gramas), correspondente a resposta ao toque, enquanto que no ensaio de hiperalgesia avaliou-se um estímulo doloroso ( $\leq 500$  gramas) num tecido inflamado. A dor persistente causada pela injeção s.pl. de CFA, envolve a liberação de vários mediadores de dor e inflamação, que aumentam a sensibilidade tanto nas vias periféricas, no local da lesão, como nas centrais (Sammad *et al.*, 2001).

Caracterizada a ação antinociceptiva de C1, iniciaram-se os estudos de estabilidade, com a microencapsulação deste composto e também dos extratos EBBA, EBSP e EBMT.

As microcápsulas foram produzidas por *spray drying* utilizando partes iguais de goma arábica e maltodextrina como materiais encapsulantes. As características de excelente emulsificação e retenção de voláteis inerentes a goma arábica, somadas a baixa viscosidade, baixo custo e alto poder de proteção contra oxidação da maltodextrina, tornam essa mistura uma ótima escolha para material de parede na produção de microcápsulas (Fernandes *et al.*, 2008).

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura demonstraram que o material microencapsulado possui superfície predominantemente rugosa (Figura 34), o que é muito comum para este tipo de técnica devido à contração das partículas durante a rápida secagem (Rosemberg *et al.*, 1990).

As amostras livres e microencapsuladas foram armazenadas em câmara climática com umidade e temperatura controladas (temperatura de 40° C e 70% de umidade) por um período de seis meses. Essas condições foram estabelecidas de acordo com as normas da Anvisa para o estudo de estabilidade acelerada, que são destinados a aumentar a velocidade de degradação química e modificação física de uma substância, usando condições forçadas de estocagem, com o propósito de monitorar as reações de degradação e prever o prazo de validade nas condições normais de armazenamento (Anvisa, 2009).

Entre os tempos 0 e 180 dias, as amostras foram coletadas e submetidas às avaliações do aspecto físico (consistência), da atividade anticâncer *in vitro* (ensaio da SRB) e ao monitoramento analítico (CG/EM). As quantificações de C1 nos extratos foram realizadas utilizando o método de padronização interna, que consiste em adicionar uma quantidade conhecida de uma substância (padrão interno) na amostra a ser analisada e relacionar as duas áreas obtidas. Esse método é o menos sensível a erros de injeção e variações instrumentais. Trata-se do melhor método para análise quantitativa, embora seja o mais trabalhoso (Collins *et al.*, 2006). Ensaio de avaliação da atividade antinociceptiva em modelo animal foram incluídos no estudo da amostra C1 e do extrato EBBA, com a

finalidade de avaliar a biodisponibilidade das amostras. EBBA foi escolhido por ser abundante em C1 e pela grande disponibilidade de amostra.

A atividade anticâncer *in vitro* foi avaliada através da exposição de células tumorais humanas, em fase exponencial de crescimento, a diferentes concentrações das amostras, sendo a quantificação final de células realizada pelo ensaio da sulforrodamina B (SRB). O ensaio da SRB é consideravelmente rápido, simples e apresenta sensibilidade comparável àquelas das metodologias fluorescentes e superior aos ensaios que utilizam corantes visíveis, mesmo em baixas concentrações celulares (Skehan *et al.*, 1990).

Os valores de TGI (concentração da amostra necessária para inibir totalmente o crescimento celular) foram utilizados como parâmetro para mensurar a atividade. O controle positivo doxorrubicina foi utilizado nos ensaios, para o monitoramento do perfil de resposta das linhagens empregadas.

Na comparação entre os extratos livres e microencapsulados, utilizaram-se os valores de TGI do extrato que foi extraído da microcápsula imediatamente antes do ensaio como representativo da amostra microencapsulada, ou seja, o extrato que estava microencapsulado e foi recuperado antes de submetido ao teste.

No monitoramento do extrato EBBA observaram-se variações na abundância de alguns compostos após armazenamento. A concentração desses compostos foi determinada analiticamente para C1 e por estimativa, através das abundâncias relativas, para os isômeros A e B, cuja mistura constitui C1 (Tabela 3), e para os compostos C2, C3, C4 e C5 (Tabela 4).

Na comparação entre os tempos 0 e 180 dias, notou-se uma diminuição na concentração dos compostos C2 e C3 e aumento na concentração dos compostos C1, C4 e C5 no tempo 180 dias em relação ao tempo 0, em especial na forma microencapsulada (Tabela 4). Houve também variações nas proporções relativas

entre os isômeros A e B de C1. No tempo 0 o isômero B representava 62% da mistura, tornando-se, no tempo 180 dias, praticamente equivalente ao isômero A (Tabela 3). Essas variações no perfil químico foram concomitantes a variações na atividade anticâncer *in vitro*.

A atividade das amostras frente as linhagens 786-0, UACC-62 e HT-29 manteve-se praticamente constante, principalmente na amostra microencapsulada. Esses dados sugerem que os compostos C2, C3, C4 e C5 não estão envolvidos na atividade, pois mesmo quando ausentes, a inibição do crescimento dessas linhagens foi mantida. C1, em contrapartida, parece ter envolvimento e sua ação independente da proporção entre os isômeros.

No tempo 180 dias, observou-se diminuição na potência frente as linhagens PC-3, OVCAR-3 e MCF-7, na amostra livre e em menor grau na microencapsulada. Correlacionando com o perfil químico, observou-se que C1 foi mais efetivo quando o isômero B esteve presente em maior proporção (tempo 0 dias), e que foi necessária uma concentração maior de C1 menos abundante em B (tempo 180 dias) para que a atividade fosse, ao menos parcialmente, restabelecida. Isso sugere que o isômero B é mais importante para atividade analisada.

A menor concentração dos compostos C2 e C3 no extrato foi concomitante com a perda significativa da atividade contra as linhagens NCI-ADR/RES, NCI-H460 e K562, sugerindo o envolvimento desses compostos com esta atividade.

Na análise da estabilidade do extrato EBSP, observou-se que a atividade frente as linhagens UACC-62 e 786-0 foi mantida a mesma tanto na amostra livre como na microencapsulada. Para as linhagens PC-3, OVCAR-3, MCF-7 e HT-29, a atividade foi mantida para amostra microencapsulada e diminuída para a amostra livre, enquanto que nas linhagens 786-0, UACC-62 a ação foi perdida. Este perfil de atividade foi análogo ao apresentado pelo extrato EBBA. A similaridade na ação provavelmente está relacionada à semelhança no perfil

químico desses extratos, que apresentam concentrações praticamente iguais do composto C1 (Tabela 2).

Uma diferença na composição dos extratos EBSP e EBBA pode explicar a maior efetividade do EBSP frente à linhagem PC-3. O extrato EBSP apresentou na sua constituição maior concentração do composto C2, que foi relatado por Spindola *et al.* (2009) como seletivo para esta linhagem.

A similaridade química observada nos extratos EBBA e EBSP não foi reproduzida para o extrato EBMT (Tabela 2). As concentrações de C1 (EBMT com 2,8%, EBBA e EBSP com 8%) exemplificam essa variabilidade. O aumento da concentração de C1 foi concomitante a diminuição da atividade frente às linhagens NCI-ADR/RES e NCI-H460, sugerindo que C1 não é fundamental para esta atividade. As linhagens OVCAR-3 e MCF-7, em contrapartida, mostraram-se mais susceptíveis às amostras abundantes em C1, corroborando a suspeita da relação deste composto com a atividade frente a essas linhagens hormônio-dependentes.

Nos ensaios *in vitro* ficou evidenciado que o extrato bruto manteve-se ativo após o processo de microencapsulação, dando respaldo a essa técnica. Fez-se necessário, no entanto, avaliar se as atividades *in vivo* eram mantidas, ou seja, se o extrato microencapsulado apresentava biodisponibilidade. Para isso, empregou-se o ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético, que avaliou a atividade antinociceptiva.

Os extratos livres e microencapsulados demonstraram atividade em todas as doses testadas (10, 30, 100 e 300 mg/kg, i.p.). Com os valores de DE<sub>50</sub> de 32,3mg/Kg para extrato livre e 12,8 mg/Kg para o microencapsulado, evidenciou-se que o processo de microencapsulação não apenas manteve a atividade do extrato *in vivo*, como aumentou a sua potência.

Um ensaio com as microcápsulas do extrato foi realizado no tempo 180 dias, demonstrando que a ação foi preservada (DE<sub>50</sub> de 32 mg/Kg). O extrato livre

não foi avaliado neste tempo devido ao aspecto vítreo da amostra, que impossibilitou a coleta do material em quantidade suficiente para o ensaio.

Observou-se que a microencapsulação viabilizou o uso do extrato bruto após estocagem, além de preservar suas atividades *in vitro* e *in vivo*, tornando essa técnica uma alternativa útil para aumentar o tempo de armazenamento.

Assim como os extratos brutos, a estabilidade de C1 foi monitorada. As imagens obtidas através da microscopia eletrônica de varredura (Figura 34), demonstraram que as microcápsulas mantiveram-se íntegras do tempo 0 ao 150 dias. A atividade anticâncer de C1 *in vitro* foi mantida constante, apresentado inibição total do crescimento de todas as linhagens testadas, com exceção da linhagem K562. Observou-se maior especificidade para as linhagem de ovário (OVCAR-3) e mama (MCF-7), cujos valores de TGI mantiveram-se baixos durante todo estudo, reafirmando a suspeita do envolvimento do composto C1 na atividade contra linhagens hormônio-dependentes.

Na comparação entre as amostras de C1 na forma livre e microencapsulada, no ensaio de atividade anticâncer *in vitro*, notou-se que a forma livre promoveu a morte celular nas linhagens avaliadas, enquanto que a amostra microencapsulada apresentou perfil de ação predominantemente citostático. A atividade frente a linhagem PC-3, como exemplo, demonstrou que 28 µg/mL de C1 livre eram suficientes para inibir totalmente o crescimento celular, em contrapartida, C1 microencapsulado, mesmo na maior concentração (250µg/mL), não apresentou a mesma atividade. Suspeitou-se que a baixa potência de C1 microencapsulado poderia estar relacionada com a forma de apresentação da amostra, por isso incluiu-se nos ensaios, a partir do tempo 90 dias, o composto extraído da microcápsula, ou seja, a microcápsula foi rompida e o material que estava armazenado no seu interior (recheio) foi recuperado e submetido aos testes. A atividade do composto extraído da microcápsula foi muito similar a atividade do composto livre. A possível relação entre a potência reduzida e um

tempo insuficiente de exposição das amostras contra as linhagens, motivou a realização de um experimento adicional, com exposições da amostra de 72 e 144 horas além da padronizada exposição de 48 horas. Observou-se uma leve melhora na atividade das amostras microencapsuladas com o aumento do tempo de exposição (Figura 47), sugerindo que houve uma liberação gradual do composto, porém, a efetividade continuou inferior à amostra livre. Ficou evidenciado, portanto, que a microcápsula íntegra não foi a forma ideal para os testes de atividade anticâncer *in vitro* e que para avaliação da estabilidade de uma amostra microencapsulada nesses ensaios deve-se realizar, previamente, a extração do material encapsulado.

Nos ensaios *in vivo*, utilizando o modelo de antinocicepção das contorções abdominais em camundongos, observou-se que as microcápsulas de C1 mantiveram a biodisponibilidade do composto e que tanto a forma livre quanto a microencapsulada foram efetivas nas doses testadas (10, 30, 100 e 300mg/Kg). Com o passar do tempo, as menores doses tanto de C1 livre quanto microencapsulado, apresentaram diminuição de atividade (Figura 48) o que resultou em crescentes doses necessárias para reduzir o número de contorções em 50% (DE<sub>50</sub>) (Figura 49). Observou-se uma diminuição gradativa na efetividade para ambas as amostras de C1, principalmente após o tempo 60 dias, mas a atividade, contudo, foi preservada até o final do estudo (tempo 180 dias).

As amostras de C1, livres ou microencapsuladas, demonstraram-se estáveis mesmo quando armazenadas em condições drásticas de temperatura e umidade. O processo de microencapsulação, além de não degradar as amostras, garantiu a resolução do inconveniente farmacotécnico de insolubilidade em solução aquosa.

As vantagens apresentadas pela microencapsulação dos produtos obtidos de *P. pubescens* motivam a continuidade dos estudos com essa espécie, visando estratégias em busca da padronização. Os fitoterápicos, assim como todos os

medicamentos, devem atender a critérios de qualidade, eficácia e segurança. A eficácia e a segurança compreendem estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos. A qualidade deve ser alcançada mediante o controle das matérias-primas e do produto acabado além de estudos de estabilidade. Estudos prévios com *P. pubescens* têm demonstrado a eficácia e dados sobre a toxicologia desta espécie. O presente estudo contemplou avaliações de estabilidade dos produtos obtidos de *P. pubescens*, em busca de parâmetros para produção de um produto final com qualidade. Aspectos agronômicos, genéticos, avaliações pormenorizadas da composição química da espécie vegetal, bem como estudos complementares de estabilidade, eficácia e toxicologia do produto acabado, são etapas a serem cumpridas e de suma importância para garantia da reprodutibilidade.

## 7 CONCLUSÕES

O presente trabalho pôde demonstrar:

- ✓ A variabilidade na composição química dos extratos brutos produzidos a partir das sementes de *Pterodon pubescens* Benth. de diferentes procedências.
- ✓ A atividade antinociceptiva, mais relacionada à dor de origem neurogênica do que inflamatória, da mistura C1 dos isômeros éster 6 $\alpha$ -hidroxi-7 $\beta$ -acetoxi-vouacapano-17 $\beta$ -oato de metila e éster 6 $\alpha$ -acetoxi-7 $\beta$ -hidroxi-vouacapano-17 $\beta$ -oato de metila, isolados do extrato bruto de *P. pubescens*;
- ✓ A manutenção da ação biológica *in vitro* e *in vivo* dos extratos brutos e amostra C1 após o processo de microencapsulação;
- ✓ A atividade anticâncer *in vitro* em cultura de células tumorais humanas do extrato frente às linhagens hormônio-dependentes, que foi mantida durante o estudo de estabilidade, estando diretamente relacionada à concentração dos isômeros da mistura C1;
- ✓ A especificidade para as linhagens de ovário e mama (hormônio-dependentes) na atividade anticâncer *in vitro* da amostra C1;
- ✓ A estabilidade da mistura C1 tanto livre quanto microencapsulada durante o estudo de estabilidade acelerada;
- ✓ A efetividade do extrato microencapsulado superior ao extrato livre no ensaio de atividade antinociceptiva e preservação da atividade após 180

dias de estocagem.

- ✓ O processo de microencapsulação por *spray drying* foi uma alternativa útil para prolongar o tempo de armazenagem dos extratos das sementes de *P. pubescens*, mantendo-os manuseáveis, diferente do extrato livre que demonstrou enrijecimento a partir do final do primeiro mês.
- ✓ A integridade na morfologia das microcápsulas após exposição a condições drásticas de temperatura e umidade.
- ✓ As microcápsulas, sem passarem por uma etapa extrativa, não constituem a amostra mais adequada para os testes de atividade anticâncer *in vitro*, devendo-se proceder a extração do material encapsulado previamente ao ensaio.
- ✓ O sinergismo existente entre os compostos ativos do extrato, evidenciado pela similaridade nas doses efetivas apresentadas para C1 isolado e o extrato bruto.
- ✓ As vantagens apresentadas pelo processo de microencapsulação dos produtos obtidos a partir de *P. pubescens* motivam a continuidade dos estudos de padronização com esta espécie, para viabilizar um produto que atenda os parâmetros de reprodutibilidade, eficácia e segurança.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, F.V.; FRANKLIN, K.B.J.; WESTBROOK, R.F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain.*, 60: 91-102, 1995.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária)- Legislação de medicamentos fitoterápicos. Resolução RE nº1- 2005. Disponível em: <<http://anvisa.gov.br>> acesso em janeiro de 2009.
- APPLETON, I. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and pain. In: DICKENSON, A.H.; BESSON, J.M. *The pharmacology of pain*, 44-60, 1997.
- BAE, E.K.; LEE, S.J. Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *Journal of Microencapsulation*, 25 (8): 549-60, 2008.
- BALDUCCI, L.; ERSHLER, W. B. Cancer and ageing: a nexus at several levels. *Nature Review: Cancer*, 5 (8): 655-62, 2005.
- BIANCO, R.; MELISI, D.; CIARDIELLO- TORTORA, G. Key cancer cell signal transduction pathways as therapeutic targets. *European Journal of Cancer*, 42: 290-4, 2006.
- BUFFO, R.A.; REINECCIUS, G.A.; OEHLERT, G.W. Factors affecting the emulsifying and rheologica; properties of gum acacia in beverages emulsions. *Food Hydrocolloids*, 15: 53-66, 2001.
- CALIXTO, N.O.; DA COSTA E SILVA, M.C.; GAYER, C.R.; COELHO, M.G.; PAES, M.C.; TODESCHINI, A.R. Antiplatelet activity of geranylgeraniol

isolated from *Pterodon pubescens* fruit oil is mediated by inhibition of cyclooxygenase-1. *Planta Medica*, 73 (5): 480-3, 2007.

- CAMPOS, A.M.; SILVEIRA, E.R.; BRAZ-FILHO, R.; TEIXEIRA, T.C. Diterpenoids from *Pterodon polygalaeflorus*. *Phytochemistry*, 36(2): 403-6, 1994.
- CARR, D.B.; GOUDAS, L.C. Acute pain. *Lancet*, 353 (9169): 2051-8, 1999.
- CARVALHO, J.C.T. *Fitoterápicos Anti-inflamatórios. Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*. São Paulo: Tecmedd, 384-400, 2004.
- CARVALHO, J.C.T.; SERTIÉ, J.A.A.; BARBOSA, M.V.J.; PATRÍCIO, K.C.M.; CAPUTO, L.R.G.; SARTI, S.J.; FERREIRA, L.P.; BASTOS, J.K.; Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. *Journal of ethnopharmacology*, 64: 127-33, 1999.
- CASTRO, M.A.S. Mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do 3-O-Glicosil- diidrocanferol, flavonóide extraído dos rizomas de *Cochlospermum regium* (algodãozinho) [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 2000.
- CCAC (Canadian Council on Animal Care). Legislative Jurisdiction Over Animals Used in Research. *Teaching and Testing*, 22 (1), 1998.
- CERVERO, F.; LAIRD, J.M. Visceral pain. *Lancet*, 19 (353): 2145-8, 1999.
- CHABNER, B.A.; ROBERTS JR, T.G. Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer*, 5 (1): 65-72, 2005.
- COELHO, L.; REIS, P.A.; LIMA, de C.F.; ROBERTO, C.; GAYER, M.; LOPES, C.; COSTA e SILVA, M.C.; SABINO, K.C.C.; TODESCHINI, A.R.; COELHO, G.P. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions

os *Pterodon pubescens* Benth. seeds. *J. Ethnopharmacology*, 98: 109-16, 2005.

- COELHO, M.G.P., MARQUES, P.R., GAYER, C.R.M., VAZ, L.C.A., NETO, J.F.N., SABINO, K.C.C., Subacute toxicity evaluation of a hydroalcoholic extract of *pterodon pubescens* seeds in mice with collagen-induced arthritis, *Journal of ethnopharmacology*, 77: 159-64, 2001.
- COLLINS, H.C.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Editora da Unicamp, 260-1, 2006.
- CORRÊA, A.P.R.; RODRIGUES, A.G.; BARBANO, D.B.A. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos - Ministério da Saúde, Secretária de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- CRAGG, G.M.; GROTHAUS, P.G.; NEWMAN, D.J. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. *Chemical Reviews*, 109 (7): 3012-43, 2009.
- DE AZEREDO, H.M.C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. *Alim. Nutr.*, 16 (1): 89-97, 2005.
- DENNY, C. Atividade Antiinflamatória do óleo de *Sucupira Pterodon pubescens* Benth. [dissertação] Piracicaba: Unicamp- Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 2002.
- DOS SANTOS FILHO, D.; VICHNEWSKI, W.; BAKER, P. M. ; GILBERT, B. Prophylaxis of Schistosomiaris. Diterpenes from *Pterodon pubescens*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 44: 51-3, 1972.
- DRAY, A. Peripheral mediators of pain. In Dickenson , A.H.; Beson, J.M. *The pharmacology of pain*, Berlin: Springer- Verlag, 21-41, 1997.

- DUARTE, I.D.G.; ALVES, D.L.F.; VELOSO, D.P.; NAKAMURA-CRAG, M. Evidence of the involvement of biogenic amines in the antinociceptive effects vouacapan extrated from *Pterodon polygalaeflorus* Benth. *Journal of Ethnopharmacology*, 55: 13-8, 1996.
- DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 4: 161-74, 1977.
- DUTRA, R.C.; BRAGA, F.G.; COIMBRA, E.S.; SILVA, A.D.; BARBOSA, N.R. Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19(2A): 429-35, 2009<sup>b</sup>.
- DUTRA, R.C.; PITTELLA, F.; FERREIRA, A.S.; LARCHER, P.; FARIAS, R.E.; BARBOSA, N.R. Efeito Cicatrizante das Sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel em Modelos de Úlceras Dérmicas Experimentais em Coelhos. *Lat. Am. J. Pharm.*, 28 (3): 375-82, 2009<sup>a</sup>.
- DUTRA, R.C.; TREVIZANI, R.; PITTELLA, F.; BARBOSA, N.R. Antinociceptive Activity of the Essential Oil and Fractions of *Pterodon emarginatus* Vogel Seeds. *Lat. Am. J. Pharm.*, 27 (6): 865-70, 2008.
- EUZÉBIO, F.P.G.; DOS SANTOS, F.J.L.; PILÓ-VELOSO, D.; RUIZ, A.L.T.G.; DE CARVALHO, J.E.; FERREIRA-ALVES, D.L.; DE FÁTIMA, A. Effect of 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxyvouacapan-17 $\beta$ -oic acid and its lactone derivatives on the growth of human cancer cells. *Bioorganic Chemistry*, 37: 96-100, 2009.
- FASCIO, M.; MORS, W.B.; GILBERT, B.; MAHAJAN, J.R.; MONTEIRO, M.B.; DOS SANTOS FILHO, D.; VICHNEWSKI, W. Diterpenoid Furans from *Pterodon* species, *Phytochemistry*, 15: 201-3, 1975.

- FERNANDES, L.P.; TURATTI, I.CC.; LOPES, N.P.; FERREIRA, J.C.; CANDIDO, R.C.; OLIVEIRA, W.P. Volatile retention and antifungal properties of *Lippia sidoides* essential oil. *Drying Technology*, 26: 1534-42, 2008.
- FERREIRA, R.A.; VIEIRA, M.Das G.G.C.; VON PINHO, É.V.R.; TONETTI, O. A. O. Morfologia da semente e de plântulas e avaliação da viabilidade da semente de sucupira-branca (*Pterodon pubescens* Benth. - Fabaceae) pelo teste de tetrazólio. *Revista Brasileira de Sementes*, 23 (1): 108-15, 2001.
- FILKOVÁ, I.; MUJUMDAR, A.S. Industrial *Spray Drying* systems in Handbook of Industrial drying, A. S. Mujumdar. Marcel Dekker Inc. New York, 742, 1995.
- FOLKMAN, J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Current Molecular Medicine*, 3: 643-51, 2003.
- FURST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res. Bull*, 48:129-41, 1999.
- GEBHART, G.F. Descending modulation of pain. *Neurosci. Biobehav.*, 27 (8): 729-37, 2004.
- GONÇALES, C.E.P.; ARALDI, D.; PANATIERI, R.B.; ROCHA, J.B.T.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C.W. Antinociceptive properties of acetylenic thiophene and furan derivatives: Evidence for the mechanism of action. *Life Sci.*, 76: 2221- 34, 2005.
- HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 13 (19-20): 894-901, 2008.

- HEINRICH, M.; BARNES, J.; GIBBONS, S.; WILLIAMSON, E. M. *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*, London: Elsevier, 2007.
- HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J. Neurosci. Methods*, 14: 69-73, 1985.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain.*, 30: 103-14, 1987.
- HUNSKAAR, S.; BERGER, O.G.; HOLE, K. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. *Pain* 25: 125-32, 1986.
- IBGE, 2007, disponível em <<http://www.ibge.gov.br/mapas/>> acesso em 05/06/2007.
- INGLETT, G.E.; GELBMAN, P.; REINECCIUS, G.A. Encapsulation of orange oil. Use of oligosaccharides from  $\alpha$ -amilase modified starches of maize, rice, cassava and potato. Chapter 4. In: RISH, S.J.; REINECCIUS, G.A. *Flavor Encapsulation*. ACS Symposium Series 370. American Chemical Society, 29-36, 1988.
- Instituto Nacional do Câncer (INCA), disponível em: <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em 15/01/2010.
- JACKSON, L.S.; LEE, K. Microencapsulation and the Food Industry, *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*, 24(4): 289-97, 1991.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413 (6852): 203-10, 2001.

- KINGHORN, A. D.; CHIN, Y. W.; SWANSON, S. M.; STEVEN, M. Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. *Current Opinion In Drug Discovery & Development*, 12 (2): 189-96, 2009.
- KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E.J. Acetic Acid for analgesic screening. *Fed. Proceeding.*, 18: 412, 1959.
- LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. *Lancet*, 353 (9164): 1607-9, 1999.
- LORENZI, H. Árvores Brasileiras. *Man. Ident. Cult. Plant. Arb. Nat. Bras*, 1: 227, 1998.
- MAHJAN, J.R.; MONTEIRO, M.B. New diterpenoids from *Pterodon emarginatus* Vog. *J. Chem. Soc. Perkin*, 1:520-5, 1973.
- MCCHESENEY, J.D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: back to the future or into extinction? *Phytochemistry*, 68: 2015-22, 2008.
- MENNA-BARRETO, R.F.S.; LARANJA, G.A.T.; SILVA, M.C.C.; COELHO, M.G.P.; PAES, M. C.; OLIVEIRA, M.M.; DE CASTRO, S. L. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. *Parasitol Res.*, 103: 111-7, 2008.
- MILLAN, M.J. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.*, 66 (6): 355-74, 2002.
- MONKS, A., SCUDIERO, D., SKEKAN, P., SHOEMAKER, R., PAULL, K., VISTICA, D., HOSE, C., LANGLEY, J., CRONISE, P., VAIGRO-WOLFF, A., GRAY-GOODRICH, M., CAMPBELL, H., MAYO, J., BOYD, M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured

Human Tumor Cell Lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 83: 757-66, 1991.

- MORS, W.B.; SANTOS FILHO, M.F.; MONTEIRO, H.B. Chemoprophylactic agent in Schistosomiasis: 14, 15-epoxigeranilgeraniol. *Science*, 157: 950-1, 1967.
- NEWMAN, D.J. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery?. *J Med Chem*, 51(9): 2589-99, 2008.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Source of New Drugs Over The Last 25 Years. *Journal of Natural Products*, 70 (3): 461-77, 2007.
- NICOLAU, K.C.; MONTAGNON, T. Molecules that changed the world. United States: Wiley-Vch, 23-6, 2008.
- NUNAN, E.A.; CARVALHO, M.G.; PILOVELOSO, D. Furane diterpenes with anti-inflammatory and pro-inflammatory activity. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 15 (6): 450, 1982.
- OCHI, T.; OHKUBO, Y.; MUTOH, S. The spinal antinociceptive effect of kyotorphin in mice: involvement of the descending noradrenergic and serotonergic systems. *Neurosci. Lett.*, 329 (2): 193-6, 2002.
- PIMENTA, A.T.A.; SANTIAGO, G.M.P.; ARRIAGA, A.M.C.; MENEZES, G.H.A.; BEZERRA, S.B. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvicida de *Pterodon polygalaeflorus* Benth. (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16(4): 501-5, 2006.
- RANDALL, R.O.; SELITTO, J.J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 111: 409-19, 1957.

- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. Farmacologia. Rio de Janeiro: Elsevier, 640-2, 2004.
- RATES, S.M.K.; BARROS, H.M.T. Modelos animais para avaliação da dor: métodos para triagem de novos analgésicos. *Rev. Bras. Farm.*, 75(2): 31-4, 1994.
- RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*, 16(6): 1195-236, 1998.
- RÉ, M.I. Microencapsulação: em busca de produtos “inteligentes”. *Ciência Hoje*, 27(162): 24-9, 2000.
- RISCH, S. J.; REINECCIUS, G. A. Flavor Encapsulation. ACS Symposium Series 370, *American Chemical Society*, Washington, D.C.-USA, 1-6, 1988.
- RISHTON, G.M. Natural Products as a Robust Source of New Drugs and Drug Leads: Past Successes and Present Day Issues. *The American Journal of Cardiology*, 101 (1): 43D-49D, 2008.
- RODRIGUES, R.A.F. Microencapsulação de extratos de plantas do cerrado brasileiro com potencial ação antiproliferativa e antimicrobiana. Projeto FAPESP 05/54582-4, 2005.
- RODRIGUES, R.A.F. Preparo, caracterização e avaliação funcional de microcápsulas obtidas por spray drying, contendo extrato de café crioconcentrado [tese]. UNICAMP- Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2004.
- ROSA, E.D.; TSUKADA, M.; FREITAS, L.A.P. Secagem por atomização na indústria alimentícia: Fundamentos e Aplicações. Depto de Engenharia Labmaq do Brasil, disponível em <<http://www.fazu.br/novo/jornada2006/palestras/enge/palestra2.pdf>>, acesso

em 27/06/2007.

- ROSEMBERG, M.; KOPELMAN, I.J.; TALMON, Y. Factors affecting retention in *spray drying* microencapsulation of volatile materials. *Journal Agricultural of Food Chemistry*, 38: 1288-94, 1990.
- ROSEMBERG, M.; YOUNG, S.L. Whey proteins as microencapsulation agents. Microencapsulation of anhydrous milkfat-structure evaluation. *Food Structure*, 12: 31-41, 1993.
- SALIB, N. A review of microencapsulation. *Pharmaceutical Industry*, 39(5): 506-12, 1997.
- SAMAD, T.A.; MOORE, K.A.; SAPIRSTEIN, A.; BILLET, S.; ALLCHORNE, A.; POOLE, S.; BONVENTRE, J.V.; WOOLF, C.J. Interleukin-1b-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature*, 410: 471-5, 2001.
- SANTOS, A.R.S; GADOTTI, V.M.; OLIVEIRA, G.L.; TIBOLA, D.; PASZUCK, A.P.; NETO, A.; SPINDOLA, H.M.; SOUZA, M.M.; RODRIGUES, A.L.S.; CALIXTO, J.B. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. *Neuropharmacol*, 48: 1021- 34, 2005.
- SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Can we conquer pain?. *Nat. Neurosci.*, 5: 1062-7, 2002.
- SHAFIEE, A.; BAGHERI, M.; SHEKARCHI, M.; ABDOLLAHI, M. The antinociceptive activities of 1-(4-aryl-2-thiazolyl)-3,5-disubstituted-2 pyrazolines in mouse writhing test. *J. Pharm. Sci.*, 6(3): 360-2, 2003.
- SHAHIDI, F.; HAN, X. Encapsulation of food ingredients. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 33(6): 501-47, 1993.

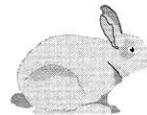
- SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain*, 38: 347-52, 1989.
- SHOEMAKER, R.H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer*, 6: 813-23, 2006.
- SIEGMUND, E.; CADMUS, R.; LU, G. Method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 95: 729, 1957.
- SILVA, M.C.C.; GAYER, C.R.M.; LOPES, C.S.; CALIXTO, N.O.; REIS, P.A.; PASSEAS, C.P.B.; PAES, M.C.; DALMAU, S.R.; SABINO, K.C.C.; TODESCHINI, A.R.; COELHO, M.G.P. Acute and topic anti-edematogenic fractions isolated from the seeds of *Pterodon pubescens*. *Pharmacy and pharmacology*, 55, 135-41, 2004.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82 (13): 1107-118, 1990.
- SPARKS, R.E. Microencapsulation. In: KIRK-OTTMER Encyclopedia of Chemical Technology. 3<sup>rd</sup> ed, John Wiley & Sons. New York, 15: 470, 1981.
- SPINDOLA, H.M. Atividade antinociceptiva do óleo das sementes de *Pterodon pubescens* Benth. [dissertação], UNICAMP- Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 2006.
- SPINDOLA, H.M. Atividade antinociceptiva e antitumoral de compostos isolados da *Pterodon pubescens* Benth. (*Leguminosae- Papillonoidea*). [tese], UNICAMP- Faculdade de Odontologia de Piracicaba-Unicamp, 2010.

- SPINDOLA, H.M.; CARVALHO, J.E.; RUIZ, A.L.T.G.; RODRIGUES, R.A.F.; DENNY, C.; SOUSA, I.M.O.; TAMASHIRO, J.Y.; FOGLIO, M.A. Furanoditerpenes from *Pterodon pubescens* Benth. with selective *in vitro* anticancer activity for prostate cell line. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(3): 569-75, 2009.
- SPINDOLA, H.M.; SERVAT, L.; DENNY, C.; RODRIGUES, R.A.; EBERLING, M.N.; CABRAL, E.; SOUSA, I.M.; TAMASHIRO, J.Y.; CARVALHO, J.E.; FOGLIO, M.A. Antinociceptive effect of geranylgeraniol and 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxyvouacapane-17 $\beta$ -oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Benth. *BMC Pharmacol.*, 10 (1): 1, 2010.
- SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E.C.; PEZZIN, A.P.T.; SILVA, D.A.K.; MEIER, M.M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. *Health and Environment Journal*, 7 (2), 2006.
- TJOLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51(1): 5-17, 1992.
- VACHER, P.J.; DUCHENE-MARULLAZ, P.J.; BARBOT, P. A propos de quelques produits usuels comparaison de deux methodes de etude des analgésiques. *Med. Exp.*, 11: 51-8, 1964.
- VALDUGA, A.T.; BATTESTIN, V.; FINZER, J.R.D. Secagem de extratos de erva-mate em secador por atomização. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23 (2): 184-9, 2003.
- VIEIRA, C.R.; MARQUES, M.F.; SOARES, P.R.; MATUDA, L.; DE OLIVEIRA, C.M.A.P.; KATO, L.; DA SILVA, C.C.; GUILLO, L.A. Antiproliferative activity of *Pterodon pubescens* Benth. seed oil and its active principle on human melanoma cells. *Phytomedicine*, 15(6-7): 528-32, 2008.
- VILLETI, G.; BERGAMARCHI, M.; BASSANI, F.; BOLZONI, P.T.; MAIORINO, M.; PIETRA, C.; RONDELLI, I.; CHAMIOT-CLARK, P.;

SIMONATO, M.; BARBIERI, M. Antinociceptive activity of the N-Metil-D-Aspartate receptor antagonist N-(2-Indanyl)-glycinamide Hydrochloride (CHF3381) in experimental Models of Inflammatory and Neurophatic Pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 306: 804-14, 2003.

- WENDEL, S., ÇELIK, M. Uma visão geral sobre o uso da tecnologia de Spray-Drying. *Pharmaceutical Technology*, 31-45, 1998.
- WIERTELACK, E.P.; FURNESS, L.E.; HORAN, R.; MARTINEZ, J.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R. Subcutaneous formalin produces centrifugal hiperalgesia at a non- injected site via NMDA-nitric oxide cascade. *Brain. J. Immunopharm*, 22: 1131-5, 1994.

# ANEXO



CEEA/Unicamp

## Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

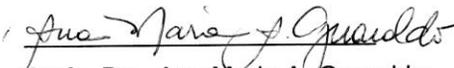
### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1951-1**, sobre "**Atividade antinociceptiva de amostras microencapsuladas obtidas de *Pterodon pubescens* Benth**", sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Mary Ann Foglio / Leila Servat**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **1º. de setembro de 2009**.

### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1951-1**, entitled "**Antinociceptive activity of microencapsulated extracts from *Pterodon pubescens* Benth**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **September 1, 2009**.

Campinas, 1º. de setembro de 2009.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva