



VERONICA CRISTINA GOMES SOARES

MODULAÇÃO DAS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E
ENZIMÁTICAS DAS SPLA2 BÁSICAS DE *Bothrops Jararacussu* E *Crotalus*
durissis ssp POR EXTRATOS SEMI PURIFICADOS OBTIDOS A PARTIR DE
Tithonia Diversifolia.

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Instituto de Biologia



VERONICA CRISTINA GOMES SOARES

MODULAÇÃO DAS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E
ENZIMÁTICAS DAS SPLA2 BÁSICAS DE *BOTHROPS JARARACUSSU* E
CROTALUS DURISSUS SSP POR EXTRATOS SEMI PURIFICADOS OBTIDOS A
PARTIR DE *TITHONIA DIVERSIFOLIA*.

*Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para obtenção do Título de
Doutora, em Biologia Funcional e
Molecular, na Área de BIOQUÍMICA.*

Orientador: MARCOS HIKARI TOYAMA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA VERONICA
CRISTINA GOMES SOARES E ORIENTADA PELO
PROF. DR. MARCOS HIKARI TOYAMA

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

So11m Soares, Veronica Cristina Gomes, 1977-
Modulação das atividades farmacológicas, bioquímicas e enzimáticas das sPLA2 básicas de *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus ssp* por extratos semi purificados obtidos a partir de *Tithonia diversifolia* / Veronica Cristina Gomes Soares. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Marcos Hikari Toyama.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Tithonia diversifolia*. 2. *Bothrops*. 3. *Crotalus*. 4. Inibidores de fosfolipase A2. 5. Inflamação. I. Toyama, Marcos Hikari. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Titulo em outro idioma: Modulation of pharmacological, biochemical and enzymatic activities of basics sPLA2 from *Bothrops jararacussu* and *Crotalus durissus ssp* by semi purified extracts obtained from *Tithonia diversifolia*

Palavras-chave em inglês:

Tithonia diversifolia

Bothrops

Crotalus

Phospholipase A2 inhibitors

Inflammation

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Marcos Hikari Toyama [Orientador]

Amanda Martins Baviera

Cintia Maria Saia Cereda

Fabio Henrique Ramos Fagundes

Murilo Baena Lopes

Data de defesa: 30-05-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 30 de maio de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama (orientador)

Assinatura

Profa. Dra. Carmen Verissima Ferreira Halder

Assinatura

Dra. Cíntia Maria Saia Cereda

Assinatura

Prof. Dr. Fabio Henrique Ramos Fagundes

Assinatura

Prof. Dr. Murilo Baena Lopes

Assinatura

Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

Assinatura

Prof. Dr. Marcello Lancellotti

Assinatura

Dra. Daniela Carla da Silva Damico

Assinatura

RESUMO

Mesmo após décadas do descobrimento dos anti-inflamatórios inibidores de fosfolipase continua a busca por novas moléculas que sejam capazes de apresentar esse efeito terapêutico sem a indução de efeitos colaterais. O objetivo deste estudo foi obter extrato polar de partes aéreas de *Tithonia diversifolia*, viabilizando um padrão de qualidade para esse extrato a partir da identificação de seus principais constituintes e após essa determinação, avaliar o seu efeito sobre a atividade de frações de fosfolipase A2 básicas secretórias (sPLA2) obtidas de *Bothrops jararacussu* (Bj) e *Crotalus durissus ssp* (Cd). Os extratos foram obtidos por infusão e decocção e após a identificação dos constituintes por cromatografia e LC/MS-MS, determinou-se que o extrato de melhor rendimento foi obtido por decocção e que seus principais constituintes são derivados do ácido cinâmico: cafeoil-glicosídico, tagitinina C e ácido quínico. A técnica de molecular imprint (MP) permitiu uma separação dos constituintes sendo uma metodologia prática. O extrato polar apresentou atividade anti-agregante plaquetária na concentração de 0,6 a 20µg/mL, frente ao estímulo de indução por trombina, o que representa que o chá não é tão inerte e que pode promover complicações em indivíduos com distúrbios de coagulação. A purificação de Bj e Cd foi realizada por técnicas cromatográficas, com rendimento de aproximadamente 30% ($p < 0,05$) de sPLA2. Ensaio enzimático *in vitro*, que utilizou substrato cromogênico sintético de PLA2 o 4-nitro-3-octanoiloxi-benzóico (NOBA) identificou que o extrato polar foi capaz de reduzir em 60% ($p < 0,05$) a atividade enzimática de sPLA2 de Bj, independente do tipo de tratamento aplicado. A redução da atividade de sPLA2 de Cd foi reduzida em 30% ($p < 0,05$) quando a mesma foi incubada por 30 min em presença do extrato. As modificações dos efeitos patológicos causados por sPLA2s foram avaliadas por ensaios *in vivo*. A ação edematogênica de sPLA2 de Bj foi reduzida em 50% ($p < 0,05$), quando esta estava em presença do extrato, independente de prévia incubação, já a mesma ação para sPLA2 de Cd foi reduzida drasticamente pelo extrato, no entanto, após 60 min da administração do agente indutor de inflamação, a capacidade miotóxica com consequente liberação de creatina-quinase (CK) foi modulada pelo extrato de forma distinta dependendo da fonte de sPLA2. Para sPLA2 de Bj o extrato promoveu uma atividade protetora de liberação de CK, pois reduziu a liberação da enzima quando foi aplicado intraperitoneal 30 min antes do agente agressor, no entanto, a sPLA2 de Cd apresentou capacidade reduzida de liberação de CK quando foi incubada com o extrato por 30min antes da aplicação do mesmo no músculo do cobaio. Diante da ação do

extrato sobre a inflamação induzida por sPLA2 buscou-se, através de técnica da reação da polimerase em cadeia em tempo real (PCR em tempo real), determinar a influência do extrato na expressão de genes envolvidos na inflamação. Determinou-se que o gene Nf-Kb, embora responda a presença do extrato, é o que mais tardiamente é ativado (ou expresso), possivelmente por ser nuclear. Através desses ensaios foi possível determinar a ação desses extratos sobre a resposta inflamatória aguda induzida pela ação de sPLA2s de venenos de serpentes.

Palavras-Chave: *Asteraceae*, *Bothrops*, *Crotalus*, Inibidores de Fosfolipase A2 e Inflamação.

ABSTRACT

Even after decades of the discovery of the anti-inflammatory inhibitors of phospholipase, there is a continuous search for new molecules which are able to provide this therapeutic effect without inducing side effects. The aim of this study was to obtain polar extract of the aerial parts of *Tithonia diversifolia*, enabling a quality standard for this extract from the identification of its main constituents and after this determination, to evaluate its effect on the activity of fractions A2 phospholipase basic secretory (sPLA2) obtained from *Bothrops jararacussu* (Bj) and *Crotalus durissus ssp* (Cd). The extracts were obtained by decoction and infusion and after the identification of the chromatography and LC / MS-MS. It was determined that the best yield of extract was obtained by decoction and its main constituents are cinnamic acid derivatives: caffeoyl - glycosidic, tagitinina C and quinic acid. Molecular imprint technique (MP) enabled separation of the constituents being a practical methodology. The polar extract showed anti-platelet activity at a concentration of 0.6 to 20 µg/mL, opposite the stimulus induced by thrombin, which indicates that tea is not as inert and may promote complications in patients with coagulation disorders. Purification of Bj and Cd was performed by chromatographic techniques, with a yield of approximately 30% ($p < 0,05$) of sPLA2. In vitro enzyme assay, which used synthetic chromogenic substrate of sPLA2 4-nitro-3-octanoyloxy benzoic acid (NOBA), it was identified that the polar extract was able to reduce by 60% ($p < 0,05$) the enzymatic activity of sPLA2 Bj, regardless of the type of treatment applied, the reduction of the activity of sPLA2 Cd was reduced by 30% ($p < 0,05$) when it was incubated for 30 min in presence of the extract. The modifications of the pathological effects caused by sPLA2s were evaluated by in vivo tests. The edematous action of sPLA2 Bj was reduced by 50% ($p < 0,05$) when it was in presence of the extract, independent of incubation, since the same action for sPLA2 Cd was drastically reduced by the extract, however, after 60 min of administration of the agent inducer of inflammation, the myotoxic capacity with consequent release of creatine - kinase (CK) was modulated by the statement differently depending on the source of sPLA2, sPLA2 Bj to extract promoted a protective activity of CK release, because it reduced the release of enzyme, when applied intraperitoneally, 30 min before the offending agent, however, sPLA2 Cd showed reduced ability to release when CK was incubated with the extract for 30 min before application of the same muscle. Before the action of the extract on the sPLA2 induced inflammation was sought through the technique of polymerase chain reaction in real time (real time PCR), to determine the influence of the extract on the expression of genes involved in

inflammation. We determined that Nf - Kb gene was the answer that although the presence of the extract is that the later is activated (or expressed), possibly because it was nuclear. Through these studies it was possible to determine the effect of these extracts on the acute inflammatory response induced by the action of sPLA2s from snake venoms.

Key words: *Asteraceae*, *Bothrops*, *Crotalus*, Phospholipase A2 inhibitors, Inflammation.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 23 |
| 1.1. Produtos naturais com finalidade terapêutica | 23 |
| 1.2. <i>Tithonia diversifolia</i> | 24 |
| 1.3. Extratos vegetais | 29 |
| 1.4. Molecular Imprint | 30 |
| 1.5. Inflamação | 33 |
| 1.6. Fosfolipases (PLAs) e inflamação..... | 34 |
| 1.7. Fosfolipases (PLA) e inibição por extratos vegetais | 38 |
| 2. OBJETIVO GERAL | 41 |
| 2.1. Objetivos Específicos | 41 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 42 |
| 3.1 Reagentes e Consumíveis | 42 |
| 3.2. Obtenção dos extratos de <i>Tithonia diversifolia</i> | 42 |
| 3.2.1. Obtenção de partes aéreas de <i>Tithonia diversifolia</i> | 42 |
| 3.2.2. Preparação dos extratos brutos de partes aéreas de <i>Tithonia diversifolia</i> | 42 |
| 3.2.3. Avaliação dos principais constituintes de <i>Tithonia diversifolia</i> por HPLC..... | 43 |
| 3.2.4. Preparação da polimerização in bulk (molecular imprint) para extrato de <i>Tithonia diversifolia</i> | 43 |
| 3.3. Ensaio de Agregação Plaquetária..... | 44 |
| 3.3.1. Voluntários para o ensaio de agregação plaquetária..... | 44 |
| 3.3.2. Agregação plaquetária..... | 44 |
| 3.3.3. Análise estatística para o ensaio de Agregação Plaquetária | 45 |
| 3.4. Ensaio in vitro e in vivo da modulação de PLA2s. | 45 |
| 3.4.1. Purificação das sPLA2 de <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Crotalus durissus ssp</i> por técnicas de cromatografia..... | 45 |
| 3.4.2. HPLC de troca iônica (SP 5PW) | 45 |
| 3.4.3. HPLC em fase reversa coluna C18 | 46 |
| 3.4.4. Modulação da atividade enzimática por técnica in vitro | 46 |
| 3.4.5. Animais de experimentação..... | 47 |
| 3.4.6. Ensaio de edema de pata..... | 47 |
| 3.4.7. Ensaio de miotoxicidade (Liberação de creatina quinase – CK) | 48 |
| 3.4.8. Análise dos dados da atividade enzimática in vitro, miotoxicidade e edema de pata..... | 48 |
| 3.4.9. Isolamento do RNA | 48 |
| 3.4.10. Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)..... | 49 |
| 3.4.11. Análise dos resultados de biologia molecular | 50 |
| 4. RESULTADOS..... | 51 |
| 4.1. Coleta, preparação dos extratos polares de <i>T. diversifolia</i> e identificação dos constituintes químicos | 51 |
| 4.2. Determinação da eficácia da técnica de molecular imprint para purificação de extratos de <i>T. diversifolia</i> | 55 |
| 4.3. Avaliação da atividade de extratos de <i>T. diversifolia</i> sobre a agregação plaquetária | 58 |

| | |
|---|----|
| 4.4. Purificação das sPLA2 de <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Crotalus durissus ssp.</i> | 59 |
| 4.5. Avaliar a influência de extrato de <i>T. diversifolia</i> sobre atividade enzimática de sPLA2, utilizando substrato sintético | 61 |
| 4.6. Influência de extrato de <i>T. diversifolia</i> sobre o edema de pata induzido por sPLA2 de <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Crotalus durissus ssp.</i> | 64 |
| 4.7. Avaliação do efeito de extrato de <i>T. diversifolia</i> sobre o miotoxicidade induzido por sPLA2 de <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Crotalus durissus ssp.</i> | 65 |
| 4.8. Identificação do mecanismo molecular pelo qual os extratos de <i>T. diversifolia</i> podem modular os genes envolvidos na inflamação, quando essa é induzida por sPLA2 de venenos de serpentes;..... | 68 |
| 5. DISCUSSÃO | 71 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 75 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 76 |
| ANEXOS..... | 80 |

DEDICATÓRIA

Ninguém vibrou mais pelas minhas vitórias,
Ou sofreu mais pelas minhas angustias do que você...
Ninguém merece mais esse título ou esse momento do que você...
Pelo amor incondicional, pelo apoio e pelas escadas que construiu;
Para que meus degraus fossem pequenos...
Dedico a você MÃE os meus momentos e esse trabalho.

Ao Meu Pai... (in memória)
Por ter escolhido uma mulher tão maravilhosa para ser minha MÃE!

"Às vezes a vida te bate com um tijolo na cabeça. Não perca a fé. Estou convencido de que a única coisa que me fez continuar foi que eu amava o que eu fazia. Você precisa encontrar o que você ama. E isso vale para o seu trabalho e para seus amores. Seu trabalho irá tomar uma grande parte da sua vida e o único meio de ficar satisfeito é fazer o que você acredita ser um grande trabalho. E o único meio de se fazer um grande trabalho é amando o que você faz (...)"
Steve Jobs

AGRADECIMENTOS

Tenho medo de agradecer pouco aos muitos que passaram por esse trabalho.

Histórico: Parte 1

Maria do Carmo

Continua sendo a minha mãe Farmacêutica, que me ensinou a ser profissional, a achar uma bactéria linda, uma célula geniosa, um laboratório o meu santuário. Tudo que sei e cada conquista em minha profissão passa por você. Ao **Neto** pela paciência em escutar momentos intermináveis de assuntos de laboratório.

Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolitto (in memória)

Meu primeiro orientador, pela paciência, pelo aprendizado foi pelo que tive no começo e por saber que existiam ORIENTADORES como o senhor que consegui terminar. Afinal “Só encontramos algo, quando sabemos o que procuramos”.

Profa. Dra. Maria Stella G. Raddi

Minha orientadora de mestrado, por me deixar independente na pesquisa o seu maior ensinamento, que posso não ter compreendido, mas que hoje agradeço por ter sido essencial.

Prof. Dr. Sérgio Marangoni

Por me receber em seu laboratório e as minhas alunas também.

Paulo Baldasso (Paulinho)

Técnico incrível que me recebeu e ajudou em tudo, muito obrigada.

Ao Meu Avô Mário Soares

Por me ensinar a ler no editorial do Jornal O Estado de São Paulo.

Parte 2

Aos amigos

“Amigo é aquele que sabe tudo a seu respeito e, mesmo assim, ainda gosta de você.”

Kim Hubbard

Cibele, Karina, Rodrigo

Meus melhores companheiros de laboratório, saudades de todos os cafês e momentos em Araraquara.

Flávia, John, Pessoa e Vanessa

Cada um com seu dom faz da minha vida mais feliz, sendo certo, que sou uma pessoa melhor porque tenho vocês. A Flávia que passou pelo estágio probatório, com louvor e sempre defendeu as pessoas do meu incrível humor. John pelo silêncio sempre oportuno e pontuações certeiras. Pessoa, por ser a única pessoa a me fazer trabalhar, nos finais de semana, feriados e pelo tempo em que todos sumiram e você me suportou firme e forte!! Vanessa... pelo meu presente dos céus, o Augusto, afilhado lindo, com uma agenda lotada.

Antigas alunas... hoje amigas

Alana, Mayara, Lígia e Stepheny

Minhas ex-alunas de iniciação científica, tenho orgulho de vocês e agradeço, cada experimento que vocês me ajudaram a fazer, cada projeto que concretizaram.

Aos meus colegas professores

Luciana e Fábio, Cristina Tischer, Sabrina Marques, Érica Lopes, Cláudia Moura, Érica Ribas, Valnice Nogueira, Héder Frank, Guga Menga, William Estevão, Ana Maria, Alex Conti, Mônica Levada, Nilsa Wadt, Marcelo Wadt, Patrícia Sampaio, Sandra Morini.

Agradeço por tornarem a difícil tarefa de ensinar divertida, sem vocês minhas noites não seriam tão agradáveis.

OBS: Sabrina... por ser a minha melhor e pior amiga, ever...

“Power is being told you're not loved and not being destroyed by it.” (Madonna).

Aos meus colegas professores do Meta

Marli

Santo Antônio coloca alguns anjos na minha vida, com certeza, aos 4 anos você foi um anjo da guarda e nossas longas conversas e caminhadas, me ensinaram, entre tantas coisas, a guardar o dinheiro do ônibus para tomar sorvete, hoje você cuida de um dos meus sonhos como se fosse seu e não tenho como agradecer!

Eliana Denardi, Clorinda Mingoni, Denis, Makay, Pedro, Zig, Carlos, Ivanildo, Vinícius, Rafael, Maurício, Eduardo (clone), Amanda, Débora, Hipólito, Vanderlei, Ana, Nicole, Samanta, Helaine e Sérgio.

Sem vocês seria impossível colocar tantas almas perdidas no ruma da universidade, obrigada, por compartilhar as conquistas, acreditar no sonho e desculpar meus erros.

Dra. Jocemeire Batista

Pela paciência... pelas horas de argumentação a cada conduta, por me respeitar como paciente e acima de tudo como pessoa, pelas mãos sábias e cirurgias impecáveis (pelos piercings azuis), por ser minha médica e amiga.

Sérgio, Patrícia, Leila, Fátima e Dna. Amélia... Uma família que escolhi com o coração, e vai entender!! Paty, minha sobrinha roubada, Sérgio por ser o melhor trainee de Congresso!

Família

Rosinha, Cida, Hermínia, Patrícia... Talles, Marquinhos, Cristiane, Thiago

“Recordei de amigos e parentes distantes, aqueles que eu sempre deixo para depois porque moram muito longe ou acabaram se tornando pessoas muito diferentes de mim, sempre penso “mês que vem faço contato com eles”. (Tati Bernardi)

Não deixei por último...

Apenas está na ordem, pois quando tudo me sumiu... tudo ficou impossível, só poderia... rezar!!

"Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta."
Chico Xavier

Agradecimentos a FAPESP

A elaboração desta tese tornou-se possível devido ao auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa Científica do Estado de São Paulo - FAPESP, na forma de bolsa de estudo.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1: Estrutura da Tagitinina C isolada a partir de extrato metanólico de partes aéreas de <i>T. diversifolia</i> (Ziémons et al., 2007)..... | 28 |
| Figura 2: Esquema geral de partição e separação provável dos principais metabólitos presentes em plantas (Filho e Yunes, 1997)..... | 30 |
| Figura 3: Esquema de obtenção de molecular imprint..... | 32 |
| Figura 4: Sítios de clivagem das diferentes PLAs (Fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phospholipase.jpg?uselang=pt-br)..... | 35 |
| Figura 5: Estrutura química dos glicerofosfolípidios de membranas celulares (modificada por Diz, 21012)..... | 36 |
| Figura 6: Metabolismo do ácido araquidônico (Fonte: http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=8&materia_id=131&materiaver=1)..... | 37 |
| Figura 7: Cromatogramas da aplicação de extratos de <i>T. diversifolia</i> , obtidos por infusão A e decocção B, em coluna semi-preparativa, para separação dos principais constituintes dos extratos..... | 53 |
| Figura 8: Cromatogramas comparando o perfil de HPLC da infusão (A) e após eluição com metanol em NIP (B) e MIP (C)..... | 56 |
| Figura 9: Cromatogramas comparando o perfil de HPLC da infusão (A) e após eluição com acetonitrila em NIP (B) e MIP (C)..... | 57 |
| Figura 10: Curva de dose-resposta para a inibição da agregação de plaquetas para diferentes concentrações de infusão de <i>T. diversifolia</i> (Teste de Fisher, * p < 0,05)..... | 58 |
| Figura 11: Perfil cromatográfico de veneno total de <i>Bothrops jararacussu</i> (Bj) em cromatografia de troca iônica e após a purificação e obtenção de sPLA2 por cromatografia de fase reversa..... | 59 |
| Figura 12: Perfil cromatográfico de veneno total de <i>Crotalus durissus</i> (Cd) em cromatografia de troca iônica e após a purificação e obtenção de sPLA2 por cromatografia de fase reversa..... | 60 |
| Figura 13: Atividade enzimática <i>in vitro</i> da sPLA2 de <i>Bothrops jararacussu</i> sobre o substrato sintético NOBA e após tratamento com extrato de <i>T. diversifolia</i> , avaliação pela formação de substrato colorido por tempo de reação. Cada ponto representa a média de n=5 (ANOVA)..... | 61 |
| Figura 14: Atividade enzimática <i>in vitro</i> da sPLA2 de <i>Crotalus durissus</i> sobre o substrato sintético NOBA e após tratamento com extrato de <i>T. diversifolia</i> . Avaliação pela formação de substrato colorido por tempo de reação. Cada ponto representa a média de n=5 (ANOVA)..... | 63 |
| Figura 15: Edema de pata em camundongos com fração de sPLA2 de <i>Bothrops jararacussu</i> em presença de extrato de <i>T. diversifolia</i> . Cada ponto representa o valor de n=5. * significativo para todos os tratamentos quando comparados com o controle (ANOVA)..... | 64 |
| Figura 16: Edema de pata em camundongos com fração de sPLA2 do veneno de <i>Crotalus durissus</i> tratado com extrato de <i>T. diversifolia</i> . Cada ponto representa o valor de n=5. * Significativo para todos os tratamentos quando comparados com o grupo controle (ANOVA)..... | 65 |
| Figura 17: Avaliação do efeito do extrato de <i>T. diversifolia</i> sobre atividade miotóxica da fração de sPLA2 obtida a partir do veneno <i>Bothrops jararacussu</i> . Cada ponto representa | |

| | |
|---|----|
| o valor de n=5 (ANOVA, *p<0,05)..... | 66 |
| Figura 18: Avaliação do efeito do extrato de <i>T. diversifolia</i> sobre atividade miotóxica da fração de sPLA2 do veneno de <i>Crotalus durissus</i> . Cada ponto representa o valor de n=5 (ANOVA *p<0,05)..... | 67 |
| Figura 19: Gel obtido pela amplificação de genes relacionados à inflamação induzida por sPLA2 e após tratamento com extrato de <i>T. diversifolia</i> | 69 |
| Figura 20: Curvas de qPCR para genes relacionados a inflamação induzida por sPLA2 e tratamento com extrato de <i>T. diversifolia</i> | 70 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Principais efeitos biológicos da <i>Tithonia diversifolia</i> e referências bibliográficas. | 27 |
| Tabela 2: Rendimento das frações dos extratos de <i>Thitonia diversifolia</i> obtidos por infusão e decocção, após 6 coletas. | 52 |
| Tabela 3: Dados de CLAE-DAD-EM do decocto das partes aéreas de <i>Tithonia diversifolia</i> | 54 |
| Tabela 5: Valores da atividade enzimática por tempo expressos em porcentagens para sPLA2 de <i>Crotalus durissus</i> e tratamento com extrato de <i>T. diversifolia</i> . *p<0,05 | 63 |

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

PLA2 - Fosfolipase A2
sPLA2 - Fosfolipase A2 secretória
cPLA2 - Fosfolipase A2 citossólica
Cd - *Crotalus durissus ssp*
Bj - *Bothrops jararacussu*
Td - *Tithonia diversifolia*
MIP - Molecular imprint
NOBA - 4-nitro-3octanoiloxi-benzóico
HPLC - High-Performance Liquid Chromatography
CK - Creatina quinase
PCR - Reação da Polimerase em Cadeia
COX-1 - Ciclooxygenase 1
COX-2 - Ciclooxygenase 2
MIC - Concentração inibitória mínima
MM - Molécula Modelo
MF - Monômeros Funcionais
ALC - Agente de Ligação Cruzada
IR - Iniciador Radicalar
AA - Ácido Araquidônico
DP - Desvio Padrão
AGE - Ácidos Graxos Essenciais

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produtos naturais com finalidade terapêutica

A busca de compostos obtidos a partir de plantas tem proporcionado à indústria farmacêutica fonte de pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos. A importância histórica desses compostos, como protótipos de categorias terapêuticas, data do século XVIII com a descoberta da digitoxina e, no século seguinte, da morfina, quinina, atropina, efedrina, cocaína e tubocurarina (Schenkel, Gosmann e Petrovick, 1999).

O Instituto Nacional de Saúde dos E.U.A (NIH) relatou que oitenta por cento (80%) da população mundial depende de plantas medicinais para os cuidados primários à saúde (Harvey *et al.*, 1998). Em contrapartida a Organização Mundial de Saúde (OMS) busca incentivar o desenvolvimento da medicina tradicional como uma fonte de menor custo, especialmente nos países em desenvolvimento. Dos fármacos mais vendidos na atualidade, cerca de 50% são derivados de produtos naturais (Schuster, 2001).

A biodiversidade brasileira abriga entre 15% - 20% do número total de espécies do planeta. Entretanto, muito pouco tem sido realizado para transformar esse potencial em vantagem competitiva, principalmente se considerarmos a utilização como forma de inserção social, proteção e manutenção dessa biodiversidade (Gottlieb, Kaplan e Borin, 1996).

No decorrer de cinco anos, de 2003 a 2008, no Brasil, foram requeridas apenas 25 patentes de extratos com potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos. A maioria dos processos de patente consistia em produtos com atividade anti-inflamatória, antialérgica, antiparasitária e para o tratamento de doenças infecciosas. As universidades foram as principais responsáveis pela maioria das descobertas que levaram às patentes (Balbani, Silva e Montovani, 2009).

Atualmente, das 96 moléculas, ativas como fármacos e que gozam do direito patentário no Brasil, apenas uma é resultado de pesquisa brasileira (ANVISA, 2011). A escassez de uma política nacional para a inovação na área dos medicamentos de origem vegetal possivelmente seja a responsável pelo fato de que apesar de toda produção científica realizada a partir da segunda metade do século passado, os esforços não resultaram necessariamente em desenvolvimento tecnológico e menos ainda em novos produtos ou medicamentos (Fernandes, 2001). Apenas em fevereiro de 2005, um grupo de trabalho

interministerial foi constituído por decreto presidencial para formular a política nacional de fitoterápicos, e a partir desse momento o fomento a pesquisas com o foco em plantas medicinais aumentou (Brasil, 2005).

A validação da eficácia do uso de plantas medicinais, a partir de testes farmacológicos e bioquímicos, tem gerado resultados promissores no desenvolvimento de novos medicamentos. Esses resultados originam-se de uma estratégia de pesquisa que parte de informações bibliográficas, etnobotânicas e/ou etnofarmacológicas e segue com a realização de ensaios *in vitro* e *in vivo* (Fapesp, 2008).

Os fitocomplexos são um grupo de princípios ativos (metabólitos secundários) que, em conjunto, explicam qualitativamente e quantitativamente as ações farmacológicas de uma planta medicinal. Nos fitocomplexos esses princípios ativos, na maioria das vezes, apresentam função sinérgica, antagônica ou protetora (Silva, 2003). Na fitoterapia a planta é utilizada integralmente, isto é com todos seus constituintes químicos, conferindo atividade terapêutica um pouco diferente daquela apresentada por princípios ativos isolados (Miguel e Miguel, 2000).

Graças aos avanços tecnológicos e legislativos, o momento é oportuno para a procura de novas estruturas com atividade farmacológica a partir de produtos naturais. No entanto, a obtenção de princípios ativos isolados pode ser complexa porque a maioria dos produtos naturais são misturas ou extratos (Schuster, 2001). A alternativa coerente para essa situação é a busca de fitofármacos compostos por fitocomplexos, obtidos a partir de extratos de plantas com reconhecidas atividades etnofarmacológicas.

1.2. *Tithonia diversifolia*

Tithonia diversifolia (Hemsley) A. Gray (Asteraceae) é um arbusto nativo do México, também encontrado em regiões da África, Austrália, Ásia, América do Norte e Central. Suas flores são comumente conhecidas como girassol Mexicano ou malmequer (tree marigold) (Pereira, Vichnewski e Nasi, 1997). A flor da *T. diversifolia*, conhecida como crisântemo (*Chrysanthemum*) foi usada como ornamento decorativo pelo Imperador da China na antiguidade (Rungeler *et al.*, 1998). Passados os séculos essas flores continuam sendo usadas com finalidade ornamental ou como adubo para agricultura (Thijssen, Murithi e Nyaata,

1993).

As folhas são a principal parte da planta utilizada em etnomedicina, principalmente na forma de chá ou extratos alcoólicos. As partes aéreas são tradicionalmente administradas sob a forma de infusão ou decocção, ou maceradas em álcool, para o tratamento de malária nas ilhas de São Tomé e Príncipe e Golfo da Guiné. Também são utilizadas para o tratamento de: *diabetes mellitus*, dores estomacais, indigestão, dores de garganta e dores hepáticas por tribos do Kenya (Kokwaro, 1976) (Takanashi, 1998). Além disso, tem sido utilizada pela medicina tradicional em Taiwan para tratamento de diabetes, com a finalidade de diminuir os sintomas como: poliúria e polidipsia (Kuo e Chen, 1998). Na Nigéria existem relatos informais dos praticantes de fitoterapia que correlacionam a *T. diversifolia* com o tratamento para o alívio das dores menstruais (Akobundu e Agyakwa, 1987; Tona *et al.*, 1998; Tona *et al.*, 1999.).

Ensaio realizado com o extrato metanólico de *T. diversifolia* demonstrou atividade contra o *Plasmodium falciparum* e contra o vírus da imunodeficiência adquirida tipo 1 (HIV-1, III cepa B) e tipo 2 (HIV-2, cepa ROD) com valores de MIC de 62,5 µg/mL (Maregesi *et al.*, 2009).

Os extratos de *T. diversifolia* são tradicionalmente utilizados para o tratamento de diabetes, diarreia, dores menstruais, malária, hematomas, hepatites, hepatomas e cicatrização de feridas (Kuroda *et al.*, 2007.).

Apesar de mais de um século de esforços e o otimismo inicial, um mundo livre de malária permanece uma visão mais distante do que nunca. A resistência multidroga é um dos problemas mais importantes no controle da malária ao longo dos anos. Esse cenário levou os cientistas a buscarem outras soluções e uma delas foi investigar as ações de plantas medicinais. Os resultados positivos obtidos com os testes realizados com a *Artemisia annua* encorajaram os fitoterapeutas a isolarem princípios ativos de plantas medicinais frequentemente utilizadas na etnomedicina para o tratamento da doença (Agbedahunsi, 2000).

Atualmente a *T. diversifolia* desperta especial interesse como agente antimalárico (Goffin *et al.*, 2002). Há evidências *in vitro* da atividade antiplasmódica e estudo *in vivo* demonstrou efeito antimalárico em ratos (Elufioye, Agbedahunsi e Adesanya, 2004).

Com o envelhecimento da população mundial, cresceu o número de doenças metabólicas crônicas como a hipertensão e o diabetes. Novos compostos antidiabéticos

despertam interesse pelo amplo mercado de consumidores para os próximos anos. Dose única do extrato aquoso da *T. diversifolia* apresentou atividade antihiperlicemiante (Miura T. *et al.*, 2005).

A *T. diversifolia* demonstrou reduzir a glicemia em linhagem de ratos diabéticos tipo 2 (KK-Ay), porém não apresentou efeito sobre os níveis glicêmicos de ratos normais, indicando que o extrato é útil para o tratamento da diabetes Tipo 2. Parece provável que essa planta exerce sua atividade antihiperlicemiante após o processo de metabolização, pois o efeito hipoglicemiante foi efetivo após 7 horas da administração do extrato. Os níveis glicêmicos dos animais após a administração de extrato etanólico a 80% de *T. diversifolia* foi menor do que após a administração do grupo tratado com extrato aquoso. Administrações repetidas de *T. diversifolia* resultaram em hipoglicemia com redução do nível de insulina sanguínea. Esses resultados indicam que o extrato da planta é capaz de reduzir a hiperinsulinemia em ratos diabetes tipo 2 (Miura T. *et al.*, 2005).

Estudos farmacológicos que partiram de informações do uso folclórico dessa planta medicinal demonstraram as seguintes atividades, descritas na **Tabela 1**.

Tabela 1: Principais efeitos biológicos da *Tithonia diversifolia* e referências bibliográficas.

| EFEITOS BIOLÓGICOS | REFERÊNCIAS |
|---------------------------|---|
| Analgésico | Owoyele et al., 2004 |
| Antidiarreico | Kokwaro, 1976; |
| Anti-inflamatório | Rungeler et al., 1998 |
| Antimalárico | Makinde et al., 1989; Agbedahunsi et al., 1998; Awe; Opeke, 1990; Agbedahunsi; Aladesanmi, 1993; Goffin et al., 2002; Elufioye et al., 2004; |
| Antiviral | Maregesi et al., 2009 |
| Espasmolítico | Tona et al., 1998 e 2000; |
| Antidiabética | Takanashi, 1998; Kuo; Chen, 1990; Miura et al., 2005 |
| Quimioprotetor | Gu et al., 2002 |

Um estudo sistemático de triagem fitoquímica de compostos bioativos de plantas superiores, realizado com extrato etanólico a 80% de *T. diversifolia*, através de um método de citotoxicidade biomonitorado, resultou no isolamento e identificação estrutural de 12 sesquiterpenos, incluindo 3 novos compostos e 3 flavonoides conhecidos. Os extratos etanólicos a 80% demonstraram atividade citotóxica contra células HL-60 com IC50 de 4,10 µg/ml (Kuroda *et al.*, 2007.). Estudos realizados com extratos de *T. diversifolia* resultaram no isolamento de cadinane, chromene, eudesmane, flavona, germacrane e derivados de eudesmane (Kuo e Chen, 1998).

Como parte da pesquisa em curso para o desenvolvimento de novos agentes quimioprotetores derivados de plantas medicinais com a finalidade de obter um agente antineoplásico eficiente, extrato metanólico de partes aéreas de *T. diversifolia* apresentou diversas atividades biológicas significativas em screening preliminar, dentre elas: antiproliferativa realizada em ensaio com linhagem de câncer de colon (Col2), indução de

diferenciação celular em teste com promielócitos de leucemia humana (HL-60) e inibição do crescimento do tumor em cultura de tecido de mama de ratos cujo tumor havia sido induzido com DMBA (Pezzuto, 1997; Kinghorn A. D *et al.*, 1998).

Um fracionamento guiado por bioensaio, após maceração em solução de etil-acetato, usando ensaio antiproliferativo como fator de descarte de frações não ativas, permitiu o isolamento de 3 novos sesquiterpenos e 8 terpenoides conhecidos (Gu J. Q. *et al.*, 2002).

Os estudos fitoquímicos revelam que extratos de *T. diversifolia* apresentam em sua composição estruturas de sesquiterpenos, sendo a Tagitinina C um dos princípios ativos mais isolados e identificados a partir de partes aéreas da planta.

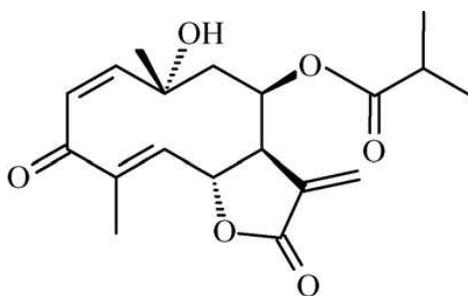


Figura 1: Estrutura da Tagitinina C isolada a partir de extrato metanólico de partes aéreas de *T. diversifolia* (Ziémonsá *et al.*, 2007).

Para comprovar o efeito anti-inflamatório de um extrato é importante estimar a atividade em fase aguda e crônica da doença. A indução de inflamação com carragenina normalmente é escolhida para os testes, pois apresenta sensibilidade principalmente na fase aguda (Winter, Rusley e Nuss, 1962; Dirosa, Giroud e Willoughby, 1971; Di Rosa, 1972; Bonta, Adolfs e Parnham, 1979; Calixto, Otuki e Santos, 2003).

Usando diferentes modelos, outros pesquisadores encontraram que os compostos extraídos das partes aéreas de *T. diversifolia* demonstraram efeito anti-inflamatório. Esse efeito foi confirmado usando fator de transcrição e reação com a via do ácido araquidônico. Posteriormente foi atribuída a atividade anti-inflamatória aos compostos: diversifolina, diversifolina metil éter e tirotundina (Kuo e Chen, 1998; Rungeler *et al.*, 1998; Tona *et al.*, 2000).

1.3. Extratos vegetais

A partir das últimas décadas, o consumo individual de fitoterápicos cresceu em todo o mundo, aumentando também os investimentos em pesquisas para obtenção de novos medicamentos. A confirmação da eficácia de muitas plantas medicinais possibilitou atingir maior credibilidade no uso da fitoterapia (Haraguchi e Carvalho, 2010).

O uso de fitopreparações populares é criticado amplamente pela falta de padronização. Desde a colheita da espécie vegetal até a obtenção do produto final, é frequente a falta de controle de qualidade, pois não há evidências de medidas de controle apropriadas para assegurar a repetição de obtenção destes produtos (Tavares, 2012).

A alternativa para fugir das fitopreparações durante muito tempo foi a busca pelo isolamento e purificação dos princípios ativos vegetais, que passaram a ser empregados em medicamentos industrializados. No entanto, alguns constituintes ativos em preparações perdiam a sua eficácia quando isolados, o que abriu novamente um outro campo de pesquisa sobre a sinergia das plantas medicinais, pois se notou que a utilização da planta toda e não somente o princípio ativo, torna o efeito benéfico total do medicamento herbal maior do que se poderia prever, apenas somando-se os efeitos de seus constituintes químicos individuais, inclusive neutralizando os efeitos nocivos dos produtos químicos ativos (Haraguchi e Carvalho, 2010).

Os chás foram os primeiros extratos utilizados para aproveitar o potencial terapêutico das plantas medicinais, porém com o passar do tempo, técnicas de padronização foram necessárias para a comercialização desses produtos. Os extratos são definidos como preparações concentradas de consistência líquida, viscosa ou na forma de pó, geralmente feitas a partir de partes secas de plantas (droga vegetal) por maceração ou percolação. A maioria das drogas não processadas tem um conteúdo de aproximadamente 20% de substâncias extraíveis, numa proporção planta/extrato de 5:1 (Schulz, Hansel e Tyler, 2010).

A partir de extratos torna-se mais fácil determinar a qualidade do produto fitoterápico e determinar qual grupo de metabólitos especiais da planta seja o responsável pelo efeito terapêutico, bem como prever se algum constituinte, mesmo que contaminante, pode causar efeitos tóxicos. Muitas são as formas de obtenção de extratos vegetais. A figura 2 demonstra a sequência de procedimentos para a obtenção de princípios ativos vegetais a partir de um

extrato.

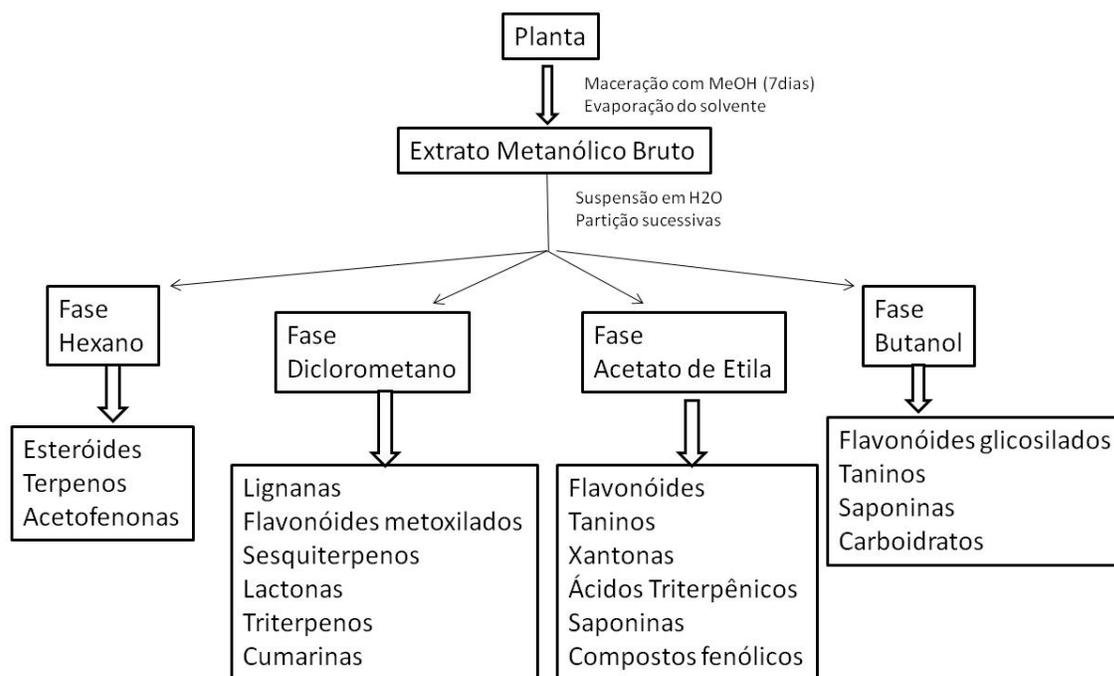


Figura 2: Esquema geral de partição e separação provável dos principais metabólitos presentes em plantas (Filho e Yunes, 1997).

A *T. diversifolia* tem seu uso medicinal na forma de chá (extrato polar) o que recai no problema de qualidade do extrato, no entanto, o isolamento de seu componente ativo principal gera outro impedimento, pois o rendimento baixo do ativo gera um custo para comercialização, que inviabiliza a utilização da planta. Na busca de elucidar qual componente está em maior concentração no chá e assim padronizar o produto, técnicas como a de molecular imprint (MIP) pode ser empregada.

1.4. Molecular Imprint

A busca de padrões de qualidade é um requisito importante para obtenção de um extrato que seja de interesse para o desenvolvimento de um medicamento competitivo e confiável no mercado. Portanto, há uma necessidade de desenvolver um método para monitorar a qualidade total dos extratos de uma forma eficiente (Ren, 2001) (Chaudhary *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010).

A obtenção de substâncias puras muitas vezes se torna inviável pelos métodos tradicionais, pois os mesmos são caros, trabalhosos e o rendimento pode ser insignificante. Extratos semi purificados que apresentam reprodutividade de constituintes fitoquímicos são uma alternativa mais simples, barata, rápida e com rendimento significativo.

Os polímeros de impressão molecular (MIP) são materiais sintéticos formados ao redor da molécula proposta como molde. Quando há a remoção da molécula o resultado é a formação de sítios com afinidade para a molécula modelo. Impressão molecular é uma técnica emergente na área de purificação dos compostos, considerando as aplicações dessa técnica.

A tecnologia de impressão molecular tem sido amplamente empregada em diversas áreas, com destaque para a química analítica, principalmente na separação e concentração de vários analitos em diferentes amostras (Figueiredo, Dias e Arruda, 2008).

A impressão molecular é uma tecnologia capaz de produzir polímeros dotados de sítios específicos de reconhecimento, estereoquimicamente moldados a partir de molécula modelo (MM – como um terpeno) (Magalhães *et al.*, 2007). Esses polímeros são rotineiramente intitulados de polímeros impressos molecularmente (molecularly imprinted polymers-MIP). A etapa de síntese (**Figura 3**) ocorre após a formação de um complexo entre os monômeros funcionais (MF) e a MM (Allender *et al.*, 2000).

A polimerização em bulk é uma metodologia de síntese, na qual a MM e o MF são dissolvidos em solvente apropriado e se ligam estrategicamente em posições específicas e complementares do polímero (**Figura 3**). Posteriormente adiciona-se o agente de ligação cruzada (ALC) responsável pela interligação entre as moléculas de MF, o que resulta na formação de uma rede polimérica e o iniciador radicalar (IR), com a função de gerar radicais reativos para iniciar e sustentar a reação de polimerização.

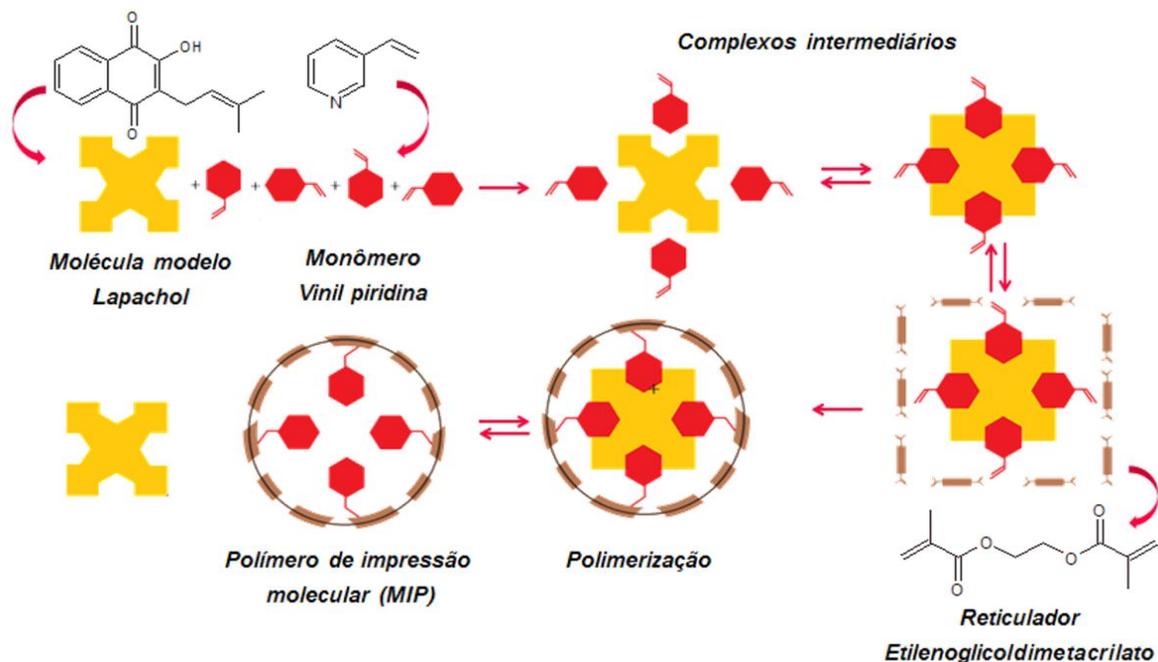


Figura 3: Esquema de obtenção de molecular imprint.

O conhecimento sobre os componentes ativos da planta medicinal que constituem a base do fitomedicamento e o extrato deve ser padronizado por meio da quantificação destes componentes, determinando os marcadores farmacológicos. A qualidade e segurança do extrato são garantidos por meio da padronização, e nisso a técnica de molecular imprint pode auxiliar. Quando a natureza exata dos componentes fitoquímicos responsáveis pela ação não é conhecida, como no caso da *T. diversifolia*, deve-se estabelecer o grupo de princípios ativos que pode ser responsável e determinar a sua concentração na planta ou parte desta, e deve servir de marcador da qualidade para a padronização e na obtenção dos extratos. Este grupo passa a ser o determinante da qualidade farmacêutica (Tavares, 2012).

Condições econômicas propícias, um mercado ávido por novos produtos, técnicas para controle de qualidade adequadas, esses fatores aliados a uma ampla biodiversidade constituem um panorama favorável para a realização de ensaios em plantas medicinais que possam gerar novos fármacos. Utilizando-se dessa técnica molecular imprint e sabendo que as folhas de *T. diversifolia* apresentam metabólitos responsáveis pela atividade terapêutica do extrato, busca-se determinar uma padronização do chá de *T. diversifolia*, para sua comercialização.

O fato dos chás serem sistemas com componentes múltiplos e uma composição

complexa, explica o motivo pelo qual os mesmos podem ser utilizados com diferentes tipos de ação, mesmo partindo da mesma droga vegetal, dependendo da parte da planta que é usada, do solvente e do processo de extração (Schulz, Hansel e Tyler, 2010). Ensaios com *T. diversifolia* sempre buscam atividades anti-infecciosa, mas no contexto das patologias as inflamações continuam a ser alvo de estudos, pois os medicamentos hoje existentes apresentam efeitos colaterais indesejáveis, principalmente aos pacientes que necessitam do uso contínuo desses agentes. Tal fato leva a investigação de chá de *T. diversifolia* de para o tratamento inflamações.

1.5. Inflamação

Existem registros sobre o processo inflamatório desde os primórdios da história. As mudanças fisiológicas que caracterizam esta resposta aos irritantes foram descritas por Cornelius Celsus em cerca de 30 d.C, mas houve referências muito anteriores relacionadas à inflamação em papiros egípcios por volta de 1650 a.C. Desde aqueles tempos, existem mudanças conceituais em curso, com o objetivo de elucidar os mecanismos subjacentes da inflamação e que refletem uma crescente consciência de que a mesma, apesar de ter sido induzida principalmente por agentes externos prejudiciais, é proporcional às características do anfitrião, no caso o indivíduo atacado. Esse pensamento é semelhante à mudança de opinião dos mecanismos de fisiopatologia em geral. Assim, embora a inflamação tenha sido pensada inicialmente como uma consequência patológica passiva da lesão, gradualmente reconheceu-se que consiste de um mecanismo imunitário de defesa com finalidade de reparação (David Wallach, Tae-Bong Kang and Andrew Kovalenko, 2014).

A inflamação ou flogose (do latim *inflamare* e do grego *phlogos*, que significam pegar fogo) é definida como uma reação dos tecidos vascularizados a um agente agressor caracterizada morfológicamente pela saída de líquidos e de células do sangue para o interstício. Embora em geral constitua um mecanismo defensivo muito importante contra inúmeras agressões, em muitos casos a reação inflamatória pode também causar danos ao organismo (Pereira, 2003).

A lesão do tecido na inflamação pode ser atribuída aos efeitos de proteínas presentes no soro, sintetizadas por leucócitos. Algumas destas proteínas, bem como vários

componentes de agentes patogênicos que provocam a inflamação, não são intrinsecamente prejudiciais, mas apresentam a função de ligação a receptores de superfície celular, que induzem a célula a caminhos que conduzem por sua vez a autodestruição (David Wallach, Tae-Bong Kang and Andrew Kovalenko, 2014).

Entre essas proteínas de papel central na inflamação destacam-se as enzimas fosfolipases (PLAs), de importância central para o início do processo inflamatório.

1.6. Fosfolipases (PLAs) e inflamação

O sítio de atuação da PLA2 é a fosfatidilcolina da membrana de células que foram danificadas ou sinalizadas por marcadores inflamatórios e origina o ácido araquidônico (AA, metabolizado por duas vias: a da cicloxigenase, que origina as prostaglandinas (PGs); e trombaxanos (TBX) e lipoxigenase que origina os leucotrienos. A liberação desses mediadores ocorre em poucos minutos e a predominância de um destes depende do local onde a reação de hipersensibilidade está ocorrendo (Balestieri, 2006).

As PLA2 podem ser basicamente divididas em dois tipos: as citossólicas (PLA2c) e as secretórias (PLA2s), sendo essas últimas características de venenos de animais peçonhentos. As PLA2c atuam sobre a bicamada lipídica (também conhecida como glicerofosfolipídeos) que compõe a membrana plasmática principalmente de células excitáveis. Os glicerofosfolipídeos (fosfatidiletanolamina-PE, fosfatidilcolina-PC e fosfatidilserina-OS e outros), juntamente com o colesterol, são os principais componentes da bicamada da membrana neural e formam a matriz lipídica na qual receptores, canais iônicos e outras proteínas envolvidas em transdução de sinais estão alojados (Agranoff et al., 1999). Esses compostos contêm uma molécula de glicerol como componente básico, ao qual um grupo fosfato (PO_4) é esterificado no carbono α (sn-3) e dois ácidos graxos esterificados nos dois átomos de carbono remanescentes (posição sn-1 e sn-2). O fosfato que é ligado a uma base (etanolamina, colina, serina, inositol) ou a um átomo de hidrogênio (ácido fosfatídico), formam a cabeça polar (hidrofílica), e os ácidos graxos esterificados formam a cauda apolar (hidrofóbica) dos glicerofosfolipídeos (**Figura 5**).

Existem diversos tipos de proteínas que são denominadas de fosfolipases (PLA), no entanto essas enzimas diferem quanto ao tipo de sítio de clivagem e produto final gerado e a

principal delas, envolvida no processo inflamatório, é a PLA2 (**Figura 4**).

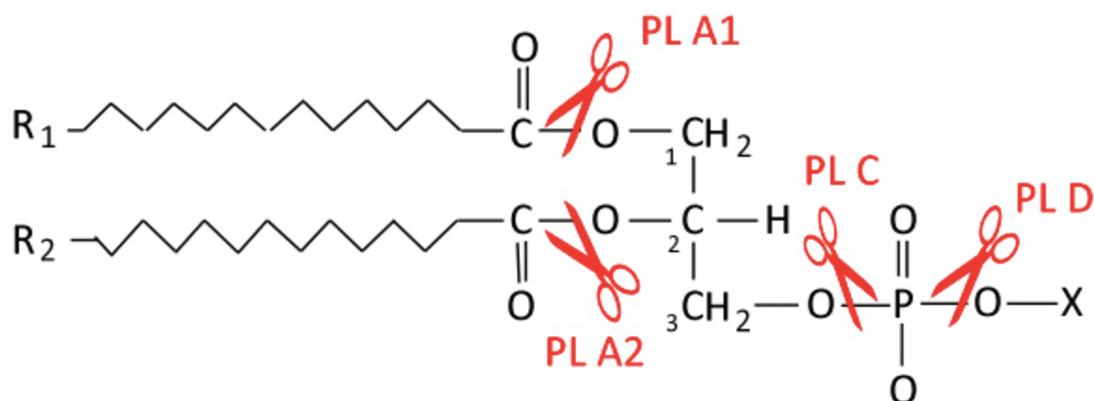


Figura 4: Sítios de clivagem das diferentes PLAs (Fonte: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phospholipase.jpg?uselang=pt-br> - Acesso maio, 2013).

Abrangendo cerca de 10 diferentes isoenzimas as PLA2s de mamíferos possuem uma alça de ligação ao cálcio e um sítio catalítico. Evidências mostraram que várias destas sPLA2s possuem um papel crucial na regulação do metabolismo do ácido araquidônico (AA), e que a liberação de AA por estas sPLA2s são influenciadas pela capacidade destas proteínas em interagir com membranas ricas em receptores específicos (Murakami et al., 2002).

As sPLA2 são capazes de interagir de forma altamente específica com determinados receptores proteicos e estas interações geram uma série de eventos moleculares que induzem atividades farmacológicas importantes, tais como: os processos inflamatórios agudos, agregação plaquetária, coagulação sanguínea, entre outros (Wang e Teng, 1990; Gutierrez et al., 1995; Arni e Ward, 1996). Muitos destes eventos farmacológicos ou mesmo patológicos, iniciam-se pela interação destas toxinas com receptores das membranas das células alvo, causando não somente a destruição da membrana celular como a ativação da cascata do ácido araquidônico e, em alguns casos, apoptose. Portanto, através da inibição da ação de sPLA2, é possível interromper o início de um processo inflamatório (Wang e Teng, 1990; Gutierrez et al, 1995; Arni e Ward, 1996; Lindahl et al., 1993 e 1997; Gambero et al., 2002).

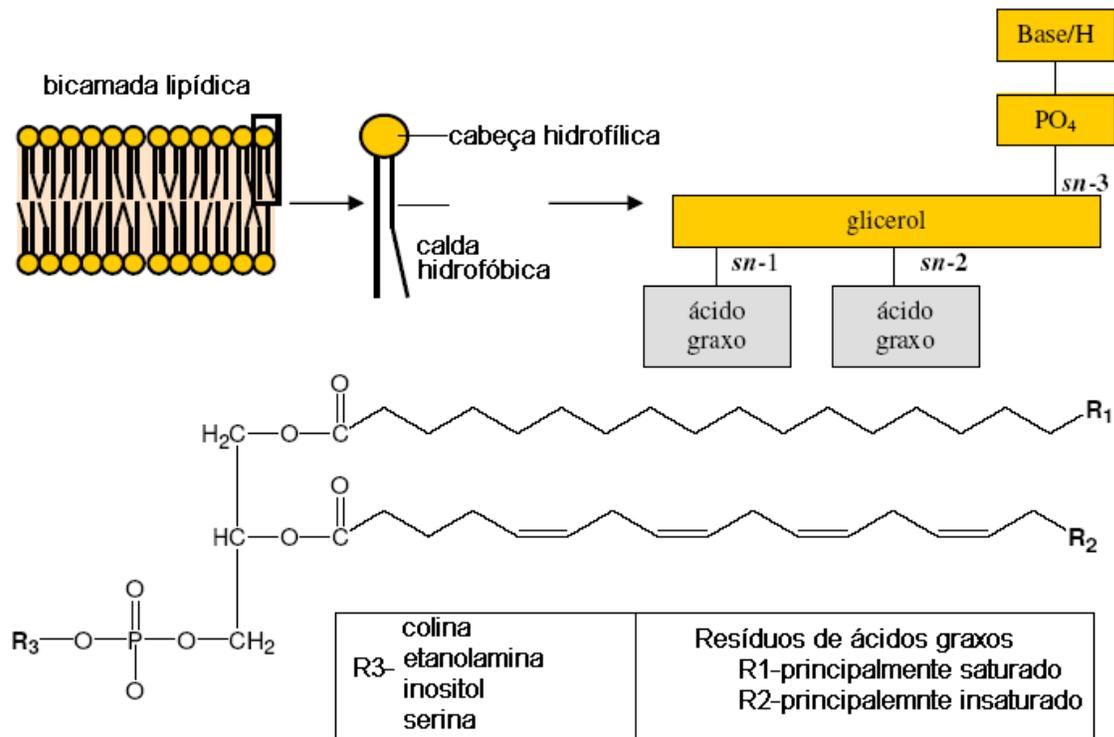


Figura 5: Estrutura química dos glicerofosfolípidios de membranas celulares (modificada por Diz, 2012).

A PLA_{2c} catalisa a clivagem da ligação éster da posição *sn*-2 dos fosfolípidios, liberando ácidos graxos essenciais (AGE) que atuam como um segundo mensageiro, sendo também precursor, através da ação de lipoxigenases e cicloxigenases, de eicosanoides, importantes na estimulação do processo inflamatório em si, que vão desde asma até artrite; e nas transduções de sinal, que podem desencadear efeitos farmacológicos como a inflamação, agregação plaquetária, por exemplo, além de ativar a proteína quinase C (PKC), estimular à liberação de Ca²⁺, modular a atividade de várias enzimas importantes, e regular a transcrição gênica (Dennis, 1994, Six e Dennis, 2000, Farooqui e Horrocks, 2004, Schaloske e Dennis, 2006) (**Figura 6**).

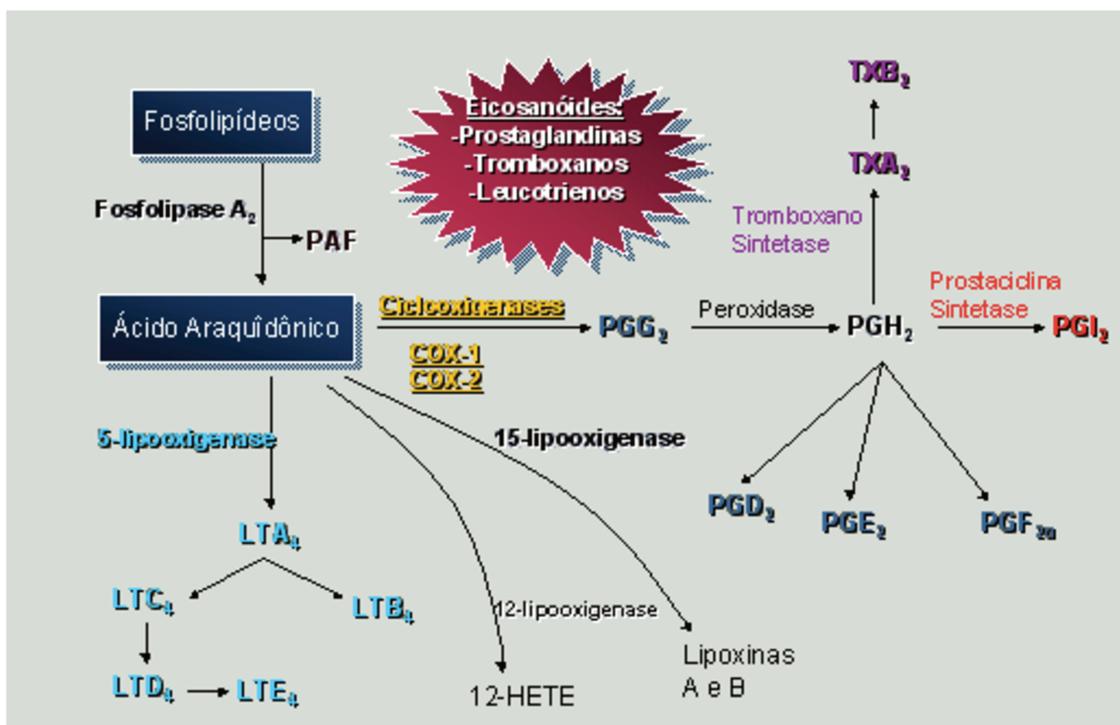


Figura 6: Metabolismo do ácido araquidônico (Fonte: http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=8&materia_id=131&materiaver=1 - Acesso maio 2013).

Algumas citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-1 β regulam a expressão de sPLA2, in vitro, e elas estão ligadas a ativação de genes relacionados à inflamação como o fator nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) (Kramer et al., 1989; Chen et al., 1994). O NF- $\kappa\beta$ é um fator de transcrição que tem um importante papel nas respostas imunes e inflamatórias que é ativado, além de outros estímulos, por citocinas (Chen et al., 1999; May e Gosh, 1998).

Quando ocorre a ativação celular, inclusive em resposta à citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e a IL-1 β , o NF- $\kappa\beta$ é fosforilado, passando para sua forma ativa, este por sua vez, no núcleo, ativa a transcrição de vários genes envolvidos no processo inflamatório (Chen et al., 1995).

Técnicas moleculares como o Real Time - PCR (qPCR) que possibilitam a avaliação da expressão de genes relacionados com a inflamação têm sido amplamente utilizadas para avaliar o mecanismo de ação de substâncias que apresentam potencial como anti-inflamatórios.

Uma ligação funcional entre sPLA2 e receptores inflamatórios é importante para mediar a modulação do NF- κ B em resposta ao TNF- α e a IL-1 β e assim determinar o mecanismo molecular de ação de drogas anti-inflamatórias (Anthosen et al., 2001).

1.7. Fosfolipases (PLA) e inibição por extratos vegetais

Vários dados sobre a atividade inflamatória das enzimas inflamatórias estão baseados em estudos experimentais utilizando PLA2 purificadas de pâncreas e de venenos ofídicos (Nevalainen et al., 2000). A relação da atividade das sPLA2 com a indução do processo inflamatório foi primeiramente descrita quando se observou que as sPLA2 ofídicas, também denominadas de secretórias, provocam edema de pata em rato (Brain et al., 1977) e a degranulação de mastócitos *in vitro* (Damerou et al., 1975).

No caso do envenenamento por picada de serpentes, antes do uso da soroterapia como método efetivo, os registros escritos ou documentados da história de nosso país descrevem o uso principalmente de métodos fitoterápicos, conhecido como fase pré-soroterapia. No Brasil existem referências de vários tratamentos utilizados contra esse tipo de envenenamento que foram incorporados da cultura indígena. Uma das plantas mais conhecida é a *Aristolochia sp.*, cujo extrato, experimentalmente, foi capaz de neutralizar a ação do veneno botrópico (Martz, 1992).

Outra espécie vegetal, a *Peschiera fuchsiaefolia*, planta nativa do interior do Estado de São Paulo, neutralizou *in vitro* os efeitos neurotóxicos do veneno total de *Crotalus durissus terrificus*. Ferreira et al., (1992 e 1993) demonstraram que extratos de *Curcuma longa* são capazes de neutralizar a ação letal induzida pelo veneno de *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus terrificus*.

Iglesias et al., (2005), mostraram que o flavonoide morina, quando incubado com sPLA2 de *Crotalus durissus cascavella*, induz modificações em nível de estrutura secundária e aminoácidos aromáticos, gerando uma inibição da atividade enzimática induzida por um desenovelamento parcial da sPLA2. Entretanto, essas mudanças não foram capazes de diminuir o edema agudo, miotoxicidade ou mesmo a agregação plaquetária induzida pela sPLA2, mas por outro lado, a sPLA2 incubada com morina comportou-se como um antibacteriano.

Estudos mostram que alguns compostos obtidos de plantas podem alterar significativamente a estrutura secundária das sPLA2. No caso da morina, contudo, estudos

realizados com quercetina e rutina, revelaram que esses flavonoides não produzem modificações significativas em nível de estrutura secundária das sPLA2 de *Crotalus durissus cascavella*, bem como, de sPLA2 isoladas de *Bothrops jararacussu* (Oliveira et al., 2008). A naringina, um flavonoide comumente encontrado em citrus, foi capaz de induzir alterações significativas sobre a estrutura secundárias das sPLA2, porém não afetou a capacidade das sPLA2 de *Crotalus durissus cascavella* de formar dímeros, como observado em experimentos com SAXs. Caso a inibição de formação de dímero tivesse ocorrido teria contribuído fortemente para a manutenção parcial das atividades farmacológicas das sPLA2 em estudo. As mudanças induzidas pela naringina foram parecidas com os efeitos induzidos pela umbelliferona (7-hidroxycumarina), em nível de: atividade enzimática, estrutura secundária e modificações na própria fluorescência das proteínas, em outras palavras, ambas tiveram a mesma capacidade de induzir um desenovelamento parcial da proteína sPLA2. Porém somente a umbelliferona reagiu com determinados aminoácidos do sítio catalítico e das hélices das sPLA2, desta forma, a umbelliferona conseguiu abolir o efeito farmacológica das sPLA2 (Braga et al., 2007; Oliveira et al., 2009).

A umbelliferona além de inibir a atividade enzimática de sPLA2 de *Crotalus durissus cascavella*, apresenta efeito muito similar ao da dexametasona, nas mesmas condições de ensaio, inibindo provavelmente as cPLA2 citoplasmáticas dos mastócitos (Brain, 1977). Esse fato, também foi observado no lisado plaquetário que teve sua atividade enzimática fosfolipásica A2 fortemente inibida pela umbelliferona, o que explica, em parte, a inibição da agregação plaquetária após incubação prévia com a umbelliferona, mesmo sobre estímulo de ADP ou colágeno. Isso demonstra o potencial não somente antiveneno, mas também, terapêutico desses compostos para algumas promissoras e futuras aplicações terapêuticas (Oliveira et al., 2009).

As sPLA2 são capazes de interagir de forma altamente específica com determinados receptores proteicos e essas interações são responsáveis por uma série de eventos moleculares geradores de várias atividades biológicas ou farmacológicas importantes, tais como: processos inflamatórios agudos, agregação plaquetária, coagulação sanguínea e neurotoxicidade (Arni; Nard, 1996; Fuentes et al., 2002; Amora et al., 2006; Fonseca et al., 2006).

Muitos dos eventos farmacológicos ou mesmo patológicos, iniciam-se pela interação das toxinas com receptores das membranas das células alvo, causando não somente a destruição da membrana celular, como a ativação da cascata do ácido araquidônico e em alguns casos apoptose. Portanto, ao inibir a ação da fosfolipase A2, ocorrerá a interrupção do início do processo

inflamatório (Gutierrez; Lomonte, 1995; Ward; Arni, 1996; Lindahl et al., 1997; Gambero et al., 2002).

A atividade enzimática no caso das sPLA2 não é o único vetor responsável pela atividade farmacológica, contudo estudos com esta molécula têm mostrado que outras regiões das PLA2 de serpentes são extremamente importantes para o desencadeamento das atividades farmacológicas (Cintra et al., 1993). Estudos realizados por Oliveira et al., 2008, confirmaram que o sítio de ligação do cálcio além de sua importância para a atividade enzimática, também tem uma grande importância para o desenvolvimento da atividade farmacológica das sPLA2, principalmente relacionada à inflamação.

Embora a atividade antimalárica e antidiabética sejam as mais estudadas atualmente para os extratos de *T. diversifolia*, a indústria farmacêutica, após a retirada dos anti-inflamatórios inibidores seletivos de COX-2, não desenvolveu nenhum produto anti-inflamatório que pudesse substituí-los no mercado. A inibição de PLA2 é uma alternativa para o tratamento das inflamações, porém os medicamentos existentes apresentam muitos efeitos colaterais. A aplicação clínica de extratos obtidos de *T. diversifolia* como anti-inflamatórios necessita de novos testes que indiquem a sua atividade em inflamações induzidas via fosfolipase A2. Testes utilizando sPLA2 como indutores de inflamação serão de vital importância para aplicação dessa planta como fitoterápico.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse estudo foi avaliar a modulação das atividades farmacológicas, bioquímicas e enzimáticas das sPLA2s básicas de *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus ssp* por extratos semi purificados obtidos a partir de folhas de *Tithonia diversifolia*.

2.1. Objetivos Específicos

1. Coletar e preparar extratos polares de folhas *T. diversifolia*;
2. Identificar os principais constituintes dos extratos de *T. diversifolia* por cromatografia;
3. Determinar a eficácia da técnica de molecular imprint para purificação de extratos de *T. diversifolia*;
4. Avaliar a atividade de extratos de *T. diversifolia* sobre a agregação plaquetária;
5. Purificar as sPLA2 de *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus ssp* por técnicas de cromatografia;
6. Realizar técnicas *in vitro* e *in vivo* para avaliar as atividades anti-inflamatórias de extratos de *T. diversifolia*;
 - 6.1. Avaliar a influência de extratos de *T. diversifolia* sobre atividade enzimática de sPLA2, utilizando substrato sintético;
 - 6.2. Verificar a ação protetora de extrato de *T. diversifolia* sobre o edema de pata induzido por veneno total e sPLA2, em camundongos;
 - 6.3. Identificar a influência do extrato de *T. diversifolia* sobre a atividade miotóxica (liberação de creatina quinase - CK) induzida por sPLA2, em camundongos;
7. Determinar o mecanismo molecular pelo qual os extratos de *T. diversifolia* podem modular os genes envolvidos na inflamação, quando essa é induzida por sPLA2;
 - 7.1. Isolar RNA de tecido de camundongos (músculo)
 - 7.2. Realizar a reação de PCR (polymerase chain reaction) e eletroforese para quantificação relativa do cDNA amplificado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e Consumíveis

Os reagentes foram adquiridos das seguintes empresas: Promega, Sigma-Aldrich, Fisher, Across, BioRad, GE Health care Life Science, Synapses-Brazil e Neobio.

3.2. Obtenção dos extratos de *Tithonia diversifolia*

3.2.1. Obtenção de partes aéreas de *Tithonia diversifolia*

Partes aéreas de *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray foram coletadas no da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Rio Claro - SP, no período de fevereiro de 2011. A identificação das partes aéreas utilizadas foi realizada segundo a literatura (Baruah et al., 1979). A exsicata do material vegetal foi depositada no Herbário do Centro Universitário Padre Anchieta, na cidade de Jundiá – SP, com número de identificação N56.

3.2.2. Preparação dos extratos brutos de partes aéreas de *Tithonia diversifolia*

Partes aéreas frescas no montante de ± 8 kg foram utilizadas para preparação de extratos brutos polares de *T. diversifolia*. As amostras foram lavadas e divididas em partes iguais de 4kg cada e a partir da divisão foram realizadas infusão ou decocção, segundo Leite (2009).

A infusão foi preparada adicionando-se água fervente sobre as partes selecionadas das folhas, que foram rasuradas. Esse é o modo tradicional de preparação de chá. As folhas foram deixadas dentro da água quente por 10 minutos e depois filtrou-se a infusão. A quantidade de planta varia segundo a espécie, sendo normalmente de 5g para cada 100mL de água.

Para a decocção, a planta fresca foi colocada em contato com água fria, com posterior aquecimento até a ebulição em recipiente fechado, com a mesma relação droga vegetal/água que a utilizada na infusão, deixando ferver por 3 minutos. Dessa forma ocorreu a evaporação

constante do solvente depois de iniciado o processo de ebulição, com posteriores condensações e recirculação do solvente, gerando assim o decocto.

Os extratos foram secos em estufa de circulação de ar, por 8 dias, na temperatura de 25°C e armazenados após secagem em frasco âmbar, a temperatura de 4°C.

3.2.3. Avaliação dos principais constituintes de *Tithonia diversifolia* por HPLC.

Para avaliação dos principais constituintes dos extratos obtidos por infusão e decocção foi realizada cromatografia em coluna semi-preparativa, seguindo a metodologia descrita por Conkerton e Chapital (1983), em que a amostra, de extrato seco, foi ressuspensa em metanol e os solventes de eluição da cromatografia dispostos da seguinte maneira: bomba A: ácido acético-água (ml); bomba B: metanol. Programa inicial de 90% de A, 10% de B, em seguida, linear até 80% de A, 20% B (7,5 min), em seguida, côncavos a 60% A, 40% B (7,5 - 25 minutos), final de 2 ml/min, detecção em UV a 320 nm. Esse ensaio foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Mackenzie, com a colaboração do Prof. Dr. Marcelo Pena.

Foram obtidas 6 frações de infusão e decocção. Essas amostras foram enviadas a Central Analítica do Instituto de Química da USP, SP para realização de LC-MS/MS.

3.2.4. Preparação da polimerização in bulk (molecular imprint) para extrato de *Tithonia diversifolia*

A preparação de MIP foi realizada em atmosfera inerte de argônio, sendo misturados: molécula modelo (mentol - terpeno), monômero (vinilpiridina) e agente reticulador (etilenoglicoldimetacrilato) na razão de 1:4:10 e em seguida 50 mg de iniciador AIBN (azobisisobutironitrila) na mesma solução. A mistura foi aquecida a 60°C por 3 horas para ocorrer a polimerização. Esse material foi usado como sorvente em cartucho de extração em fase sólido (SPE). Separadamente misturaram-se 500 mg de MIP com acetonitrila. Foi preparada uma coluna de MIP.

O polímero não impresso (NIP) foi preparado seguindo o mesmo procedimento em ausência da molécula modelo.

Esses materiais foram usados como sorventes em cartuchos de extração em fase sólida (SPE). Separadamente, misturaram-se 500 mg de MIP e 500 mg de NIP com acetonitrila para a confecção de 2 colunas: tipo MIP e NIP, ambas foram carregadas com 2 mL da solução de substância padrão, no caso a vitamina A, por semelhança estrutural. Metanol e acetonitrila foram testados como solventes de eluição. Cartuchos de SPE preparados com sorventes MIP e NIP foram avaliados por cromatografia após eluição.

Os eluatos obtidos foram analisados por HPLC comparando-se com o produto bruto da infusão, seguindo as condições abaixo:

Tampões: A- Água + Ácido trifluoroacético (TFA) a 0,1%

B - 66,6% de Acetonitrila (ACN) em tampão A

Gradiente: 0 - 10 min: 0% B

40 - 40 min: 30% B

45 - 45 min: 70% B

45 - 46 min: 100% B

46 - 56 min: 100 % B

56 - 57 min: 0 % B

Coluna: C18 (18cm x 10mm, 10 μ m Supelco)

Fluxo: 1,0 mL/min.

Comprimento de Onda: 300 nm.

3.3. Ensaio de Agregação Plaquetária

3.3.1. Voluntários para o ensaio de agregação plaquetária

Foi coletado sangue venoso com o consentimento informado de voluntários saudáveis que negavam tomar qualquer medicação nos últimos 14 dias, nº Comitê de Ética Humano: 1501-1.

3.3.2. Agregação plaquetária

O sangue total foi transferido para tubos de polipropileno contendo 1/10 do volume final de dextrose ácida – citrato (ACD-C; ácido cítrico a 3%, citrato trissódico 4%, glicose a

2%; 1:9 v/v) e centrifugado a 200 g durante 15 min. O plasma rico em plaquetas foi adicionado de uma solução de tampão de lavagem (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, citrato de sódio, glicose 12 mM a 10 mM e sacarose 12 mM, pH 6, 05:07 v / v) e centrifugado a 800 g durante 12 min a 20°C. O pelete de plaquetas foi suavemente ressuspensão em solução de Krebs-Ringer e as contagens foram realizadas numa câmara de Neubauer. O ensaio de agregação foi realizado com 400 uL de suspensão de plaquetas (1.2x10⁸ plaquetas / ml) numa cubeta a 37°C com agitação constante. A suspensão de plaquetas foi incubada durante 3 minutos com o extrato aquoso (0.6-20µg/mL) antes da adição de trombina (100 mU/mL). Porcentagem de agregação de plaquetas foi avaliada em agregômetro (Chrono-log modelo Lumi-Agregômetro 560-Ca, EUA).

3.3.3. Análise estatística para o ensaio de Agregação Plaquetária

Todos os dados são apresentados como médias ± Desvio Padrão (DP) - teste de Normalidade. Análise pelo teste Fisher (não paramétrico), o programa GraphPad Prism 5.03 foi utilizado para a análise de dados considerados significativamente diferente para as amostras.

3.4. Ensaio in vitro e in vivo da modulação de PLA2s.

3.4.1. Purificação das sPLA2 de *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus ssp* por técnicas de cromatografia.

As Fosfolipases A2 secretórias (sPLA2) do veneno de serpentes foram purificadas através da combinação de um ou mais procedimentos cromatográficos. As sPLA2 de *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus* foram obtidas por dois protocolos diferentes usando uma combinação de troca iônica e fase reversa.

3.4.2. HPLC de troca iônica (SP 5PW)

Neste protocolo as amostras foram dissolvidas em tampão A1 (composto de uma solução aquosa de 0.05M de Bicarbonato de Amônia) ou em um tampão A2 (Tampão Tris-HCl 0.05M, pH 8.0). As amostras, de 1g de veneno, uma vez dissolvidas, foram

centrifugadas a 4500xg por 5 minutos, filtradas em Millipore 0.22 μ m e posteriormente aplicadas à coluna cromatográfica. A coluna TSK SP 5PW, (Supelco) ou BioSuite (Wates), analítica, foi previamente equilibrada com o tampão A1 ou tampão A2. Após o tempo de equilíbrio 200 μ l de amostra previamente preparada foi aplicada à coluna cromatográfica montada em sistema cromatográfico HPLC, PDA 991 (Waters), equipado com duas bombas Waters modelo 510/B. Foi usado um injetor manual com “loop” de 200 μ L. A eluição das amostras foi realizada em gradiente linear com bicarbonato de Amônia 1,0M, pH 7,9 (Tampão B1) ou Tris-HCl 0.05M: NaCl 1.0M (Tampão B2). As frações foram monitoradas a 280nm, coletadas, liofilizadas e estocadas a -20°C.

3.4.3. HPLC em fase reversa coluna C18

As amostras de sPLA2, obtidas por troca iônica, foram injetadas em coluna de fase reversa C18 (μ -Bondapack - 0,38 X 30 cm C18) acoplada a uma sistema HPLC Water PAD 991 (Waters), equipado com duas bombas Waters modelo 515/B, um injetor manual com “loop” de 200 μ L. A coluna cromatografia foi previamente equilibrada com o tampão A (TFA 0.1% em H2O) durante 15 minutos antes da injeção da amostra, diluída em tampão A, até sua completa homogeneização e então centrifugadas a 4500 xg por 5 minutos, filtradas em Millipore 0.22 μ m e então aplicadas à coluna. A eluição das amostras foi realizada usando-se gradiente linear de concentração de tampão B (Acetonitrila 66% em tampão A), monitorada em comprimento de onda de 280nm. As frações coletadas foram então liofilizadas e estocadas a -20°C.

3.4.4. Modulação da atividade enzimática por técnica *in vitro*

A influência do extrato de *T. diversifolia* sobre a atividade enzimática das sPLA2 foi verificada através de uma técnica *in vitro* que foi descrita por Holzer e Mackessy (1996) e adaptado para placa de ELISA com 96 poços de acordo com o método descrito por Beghini et al. (1999), utilizando-se como o substrato sintético da enzima o ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzoico (NOBA). Foram utilizadas amostras dos venenos de serpente com uma concentração de 1,0 mg/ml, no caso do veneno total e sPLA2 isoladas. As amostras foram incubadas a 37° C junto com o substrato, tampão de reação (Tris-HCl 0,1M Ca²⁺

0,01M pH 8) e lidas a 425 nm após 20 minutos de incubação com o extrato de *T. diversifolia*. A incubação e leitura foram feitas em leitor de placa de multicanal (Spectramax 340).

Grupos de experimentação:

Grupo 1: Atividade enzimática somente do sPLA2 *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus*;

Grupo 2: Atividade enzimática da sPLA2 + extrato de *T. diversifolia* os dois colocados ao mesmo tempo em presença do substrato;

Grupo 3: Atividade enzimática da sPLA2 + extrato de *T. diversifolia* que foram incubados por 30min antes do teste.

3.4.5. Animais de experimentação

Foram utilizadas fêmeas de camundongos Swiss (20-35g) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB). Os animais foram mantidos a temperatura ambiente 22-24°C com ciclos de claro/escuro de 12 em 12 h, com comida e água ad libitum. A experimentação com animais foi certificada pela comissão de ética animal da UNICAMP Protocolo n° 2355-1.

3.4.6. Ensaio de edema de pata

Fêmeas de camundongos Swiss (20-35g) foram divididas em grupos que receberam os seguintes tratamentos:

Grupo 1: Injeção intraperitoneal de 25µL contendo 25µg de: salina (controle negativo), extrato de *T. diversifolia* e após 30 minutos uma injeção subplantar de composto pró-inflamatório: veneno total de BJ, CDc, sPLA2 BJ ou sPLA2 CDc (25µg) em volume final de 25µL.

Grupo 2: Injeção subplantar de composto pró-inflamatório: veneno total de BJ, CDc, sPLA2 BJ ou sPLA2 CDc (25µg) em volume final de 25µL e após 30 minutos uma injeção intraperitoneal de 25µL contendo 25µg de: salina (controle negativo), ou extrato de *T. diversifolia*.

Grupo 3: Injeção subplantar de extrato de *T. diversifolia* incubado 30 minutos com veneno total ou sPLA2 (v/v) contendo 25 µg de cada substância; ou de extrato de *T.*

diversifolia incubado 30 minutos com veneno total ou sPLA2 (v/v) contendo 25 µg de cada substância, no volume final de 25µL.

Grupo 4: Injeção subplantar de 25µL contendo 25µg de compostos pró-inflamatórios: veneno total ou sPLA2, sem tratamento anterior ou posterior (controle positivo).

O volume das patas foi medido imediatamente antes da injeção do estímulo e após 30, 60 e 120min dos agentes pró-inflamatórios usando um plestimômetro de pata (modelo EFF 304, Insight, Brasil). Os resultados foram expressos como aumento do volume da pata (mL) calculado pela subtração do volume basal.

3.4.7. Ensaio de miotoxicidade (Liberação de creatina quinase – CK)

O ensaio de miotoxicidade foi realizado utilizando-se os mesmos grupos descritos no item (3.4.5), no entanto, os agentes pró-inflamatórios foram injetados no músculo gastrocnemius direito dos animais, após 1 hora o sangue dos animais foi colhido da cauda e colocado em tubo capilar heparinizado e submetidos à centrifugação e dosagem segundo kit Granustest 2,5 da Merck. Após a adição dos reagentes ao soro, as amostras foram colocadas em banho Maria a 37°C por 5 minutos. As leituras (a 340nm) foram realizadas em intervalos de 1 minuto. A atividade foi expressa como unidade por litro (U/L).

3.4.8. Análise dos dados da atividade enzimática in vitro, miotoxicidade e edema de pata

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) para n animais. Os resultados foram analisados por análise da variância (ANOVA) seguida pelo teste modificado de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3.4.9. Isolamento do RNA

A extração do RNA foi feita seguindo o protocolo do kit 17200 Total RNA Purification Kit NORGEN, Lote: 38220090, BIOTEK, para 50 reações. Foram utilizadas 10mg de tecido (músculo, tratado como no item 3.4.7) congelado em nitrogênio líquido sem permitir que a amostra descongelasse. O material congelado foi triturado em gral e pistilo de porcelana. Em seguida foram adicionados 600µL da solução de lise fornecida pelo

fabricante. O conteúdo foi homogeneizado e centrifugado (13000xg) durante 2 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi separado e adicionado de igual volume de etanol 70%.

Na próxima etapa, o lisado com etanol foi adicionado à coluna de separação do kit e centrifugado até que todo o conteúdo passasse através da mesma; o conteúdo que passou foi descartado. Em seguida foi feita a lavagem da coluna com 400 µL da solução de lavagem, a solução foi adicionada à coluna e centrifugada durante um minuto. O procedimento de lavagem foi repetido três vezes, seguido de dois minutos finais de centrifugação para a secagem da resina.

A eluição do RNA foi feita utilizando-se 50 µL da solução de eluição, após adição da solução foi feita a centrifugação até que todo o conteúdo atravessasse a coluna, o mesmo foi então recolhido e armazenado a -20°C para posterior utilização.

3.4.10. Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

O RNA extraído da amostra de músculo foi então utilizado para a produção de cDNA, o protocolo utilizado foi o do kit Revert Aid™ HMinus, First Strand cDNA synthesis kit, K1631, Lote: 00082738, Biomol. O ciclo utilizado para a produção de cDNA foi: Aquecimento até 65°C durante 5 minutos seguido de resfriamento até 6°C durante 2 minutos, aquecimento até 25°C durante 5 minutos, aumento da temperatura para 45°C durante 60 minutos e um último aquecimento até 70°C durante 5 minutos.

O processo de PCR foi então realizado com o cDNA produzido na etapa anterior. A solução para amplificação foi feita seguindo o protocolo do kit PCR Master Mix, K0171, Lote: 00075343, Biomol, adicionado de primers específicos, Invitrogen, para amplificação. O ciclo de amplificação foi de aquecimento até 94°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 94°C durante 30 segundos, anelamento a 58°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 45 segundos.

Sequência de Primers:

COX-1SENSE: 5'-GCCTTCTTTGCACAACAC-3'

COX-1ANTISENSE: 5'-GCAGGAAATAGCCACTCA-3'

COX-2SENSE: 5-AAGCGAGGACCTGGGTTTAC-3

COX-2ANTISENSE:5-ACACCTCTCCACCAATGACCTG-3

nf-kB SENSE: 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'

nf-kB ANTISENSE 5' - G CCT GGG AAA GTC CCC TCA ACT - 3'

Após a amplificação foi feita a eletroforese com o conteúdo obtido e brometo de etídio e visualizada a amplificação por meio de luz UV para confirmação da ocorrência da mesma.

A amplificação também ocorreu por Cyber Green e foram realizados ensaios preliminares de qPCR (PCR em tempo real)

3.4.11. Análise dos resultados de biologia molecular

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) para n animais. Os resultados foram analisados por análise da variância (ANOVA) seguida pelo teste modificado de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Coleta, preparação dos extratos polares de *T. diversifolia* e identificação dos constituintes químicos

Dois fatores básicos determinam a composição de um extrato: a qualidade da matéria-prima vegetal e o processo de produção.

As plantas medicinais são produtos naturais e a natureza não fornece seus produtos com uma composição definida e padronizada. A experiência cotidiana aponta que existem diferentes safras de vinho e diferentes qualidades de chás pretos, há cafés mais ácidos e menos ácidos e há tipos amargos e doces de funcho. Da mesma forma, os constituintes das plantas medicinais podem variar grandemente em razão de fatores genéticos, clima, qualidade do solo e outros fatores externos (Schulz, Hansel e Tyler, 2010). As irregularidades da qualidade causadas pelas condições variáveis de crescimento podem ser controladas em parte pela escolha da coleta em apenas uma determinada época e eliminação de materiais que não satisfaçam padrões estritos de qualidade.

Para realização dos ensaios foram coletadas partes aéreas (somente folhas) de *T. diversifolia* em fevereiro de 2011, época em que a mesma não apresenta suas fluorescências. Foram coletados 8kg de folhas, acondicionados em sacos preto e transportados até o laboratório de Química de Proteínas (LAQUIP) da Universidade de Campinas, UNICAMP. Esse material vegetal foi lavado e dividido em porções de 4kg para preparação de dois tipos de extratos. Uma unidade de folha foi levada a estufa elétrica com circulação de ar, a 25°C por 48h, entre folhas de papel pardo, para confecção da exsicata, segundo manual da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e ficou armazenada no Centro Universitário Padre Anchieta de Jundiaí-SP.

Extratos de *T. diversifolia* têm sido utilizados para o tratamento de algumas enfermidades, como: diabetes, hepatites, malária, inflamações. As propriedades terapêuticas dessa planta têm sido atribuídas pela presença de metabólitos especiais: flavonoides, terpenos, sesquiterpenos (Kuroda *et al.*, 2007.). Esses compostos são identificados a partir de fases de partição hidroalcólicas ou apolares da planta, porém a infusão ou a decocção (chás) são as formas tradicionais de uso dessa planta. A partir dessa forma de uso, optou-se para

realizar os ensaios com os extratos polares de *T. diversifolia*, a infusão e decocção foram preparadas segundo descrito no item 3.2.2 dos materiais e métodos e o rendimento apresentado na **Tabela 2** abaixo:

Tabela 2: Rendimento das frações dos extratos de *Thitonia diversifolia* obtidos por infusão e decocção, após 6 coletas.

| Frações | Infusão | Decocção |
|----------------|----------------|-----------------|
| 1 | 2,4 mg | 14,9 mg |
| 2 | 0,8 mg | 13,1 mg |
| 3 | 14,7 mg | 7,8 mg |
| 4 | 9,3 mg | 1,2 mg |
| 5 | 8,6 mg | 1,3 mg |
| 6 | 0,6 mg | 2,3 mg |
| Total | 36,1 mg | 40,6 mg |

O rendimento dos dois extratos, infusão e decocção, foi muito semelhante e os cromatogramas indicaram que, embora com rendimentos diferentes para alguns picos, os mesmos ativos estavam presentes nos dois extratos, principalmente nos picos, 3 e 1, 4 e 2, 5 e 3, para infusão e decocção, respectivamente (**Figura 7**). No entanto, esses picos de maior rendimento, portanto de maior interesse, foram melhores isolados e caracterizados no decocto. Portanto para a determinação por LC/MS-MS, na Central Analítica do IQ-USP, foram enviadas as amostras de decocção e ficaram caracterizados 6 diferentes ativos, presentes na **Tabela 3**.

A

B

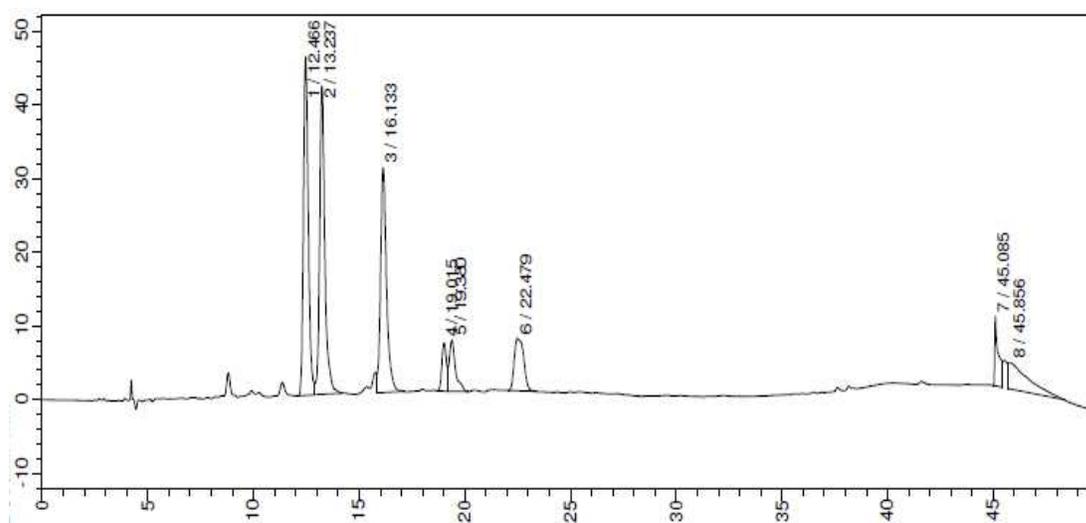


Figura 7: Cromatogramas da aplicação de extratos de *T. diversifolia*, obtidos por infusão A e decocção B, em coluna semi-preparativa, para separação dos principais constituintes dos extratos.

Tabela 3: Dados de CLAE-DAD-EM do decocto das partes aéreas de *Tithonia diversifolia*

| Pico | t_R (min) | Substância | Íons de massa (m/z) ^a | UVmáx (nm) |
|------|----------------|--|----------------------------------|---------------|
| 1 | 4,20 | Cafeoil-glucosídeo | 341→179(pb), 113 | 295, 325 |
| 2 | 8,80 | Tagitinina C | 347, 173→155(pb), 137, 111 | |
| 3 | 10,26 | Ácido quínico | 191→149 | |
| 4 | 12,47 | Ácido 3-O-(<i>E</i>)-cafeoil- quínico | 353→191(pb), 179, 135 | 298, 330 |
| 5 | 13,24 | Ácido 5-O-(<i>E</i>)-cafeoil- quínico | 353→191(pb), 179 | 295, 325 |
| 6 | 16,13 | Ácido 4-O-(<i>E</i>)-cafeoil- quínico | 353→191, 179, 173(pb) | 298, 330 |

^aIonização realizada em modo negativo.

4.2. Determinação da eficácia da técnica de molecular imprint para purificação de extratos de *T. diversifolia*

Para o desenvolvimento da técnica de MIP deve-se escolher um padrão que será utilizado como MM. O mentol é um monoterpeneo, que foi escolhido como padrão pelo custo baixo e facilidade de obtenção, bem como por ser solúvel no monômero (vinilpiridina). Portanto foi possível a realização da técnica de polimerização em bulk, no entanto esse padrão não foi eficiente sendo substituído por vitamina A, cujo tamanho molecular se aproxima dos ácidos clorogênicos que são alvo desse gênero de planta.

Em teoria seria formado um molde que aprisionaria os ácidos clorogênicos, ou estruturas semelhantes, no cartucho de extração em fase sólido (SPE) composto pelo MIP. Após preparação da infusão o cartucho de SPE preparado com sorvente MIP foi avaliado por cromatografia antes e após a eluição no sistema. Os cromatogramas das soluções sugerem que há diferença de perfil entre a infusão e o produto eluído, com a eliminação de compostos que não se fixaram ao sistema (**Figura 8 e 9**). Esse resultado sugere que o MIP realiza mais interações com a molécula modelo, o que resultou na formação de um complexo estável entre monômero e molécula modelo formando o polímero com sítios ativos seletivos, no entanto, ainda não satisfatório para extração de ativo de *Tithonia diversifolia*.

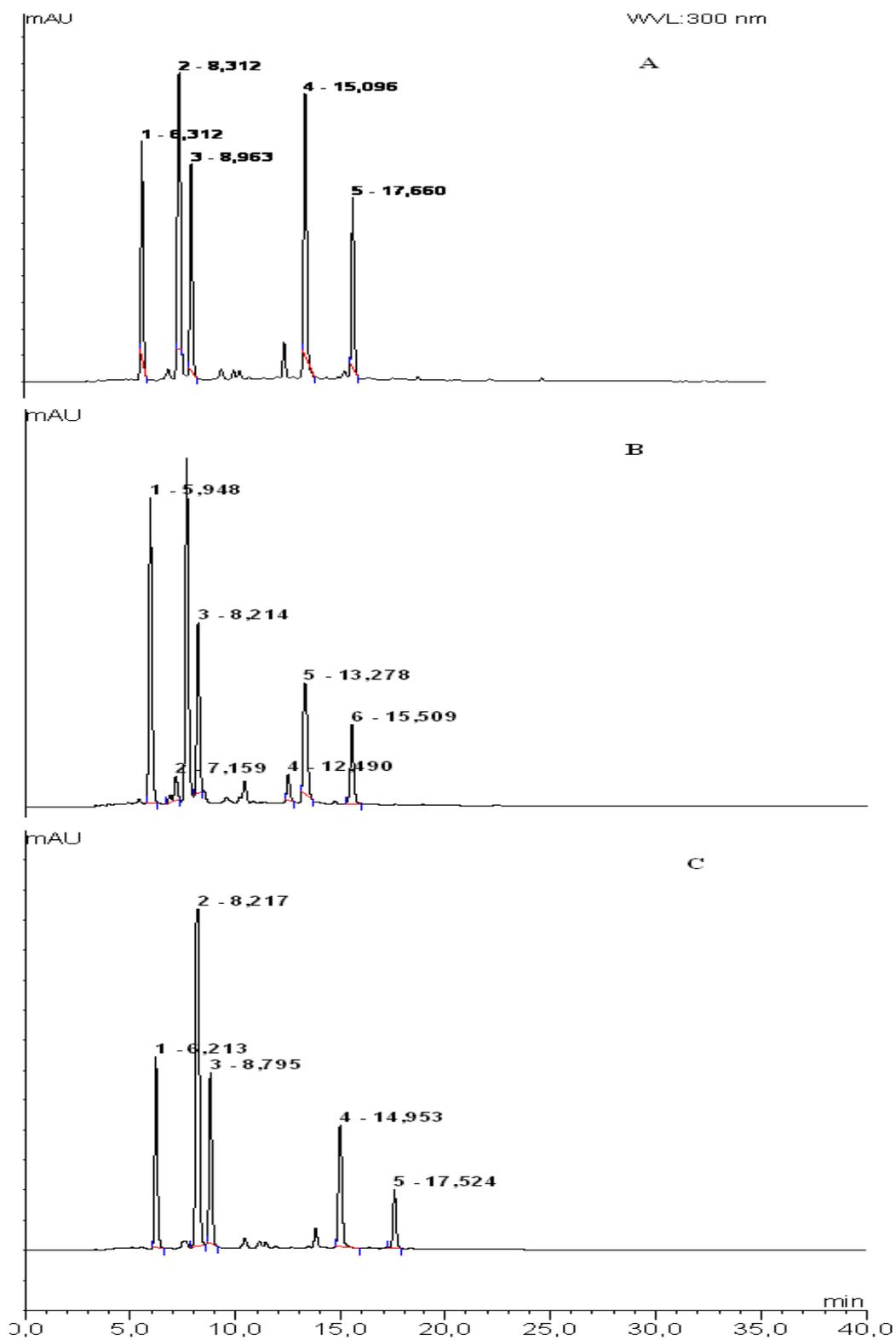


Figura 8: Cromatogramas comparando o perfil de HPLC da infusão (A) e após eluição com metanol em NIP (B) e MIP (C).

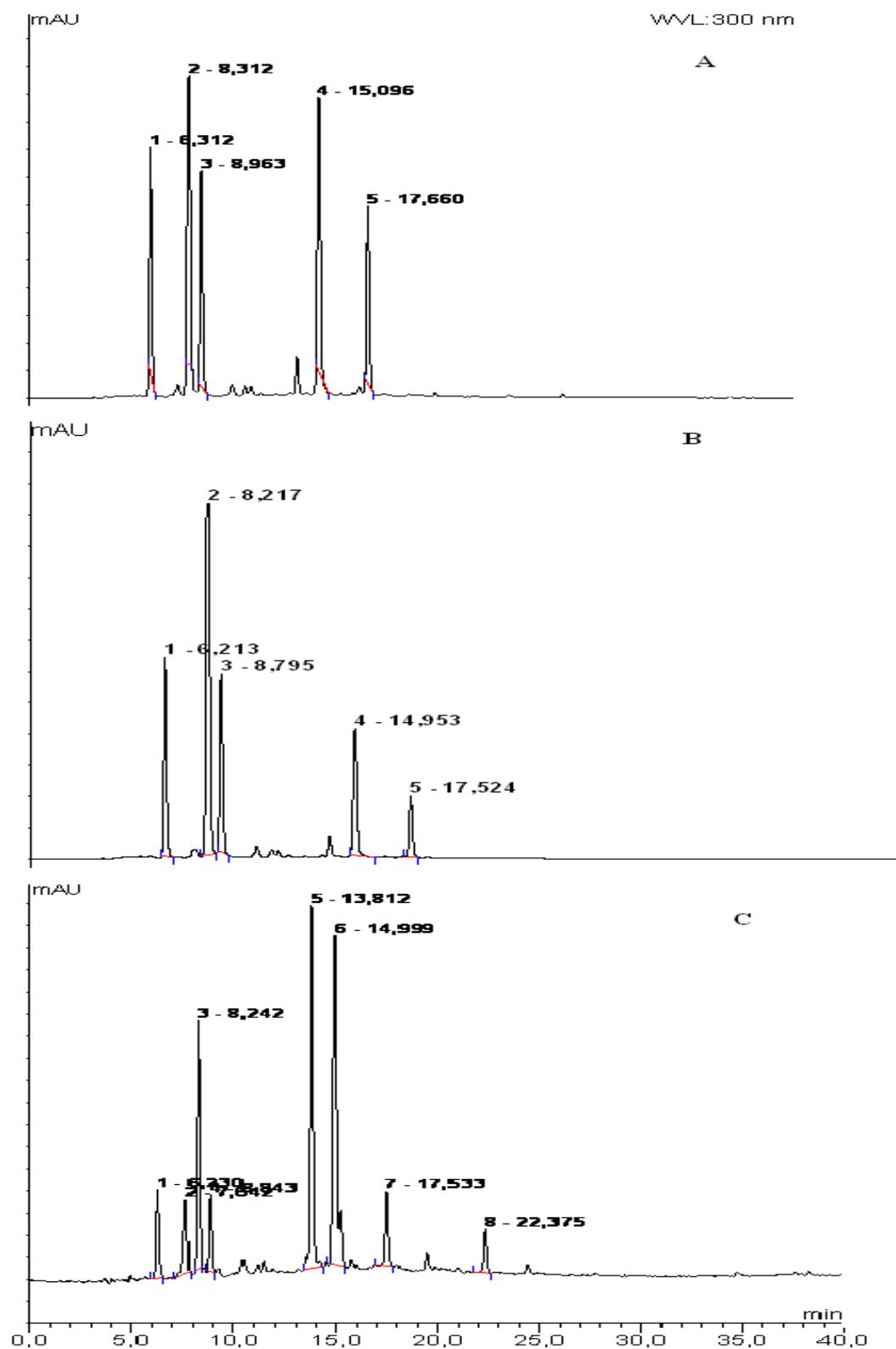


Figura 9: Cromatogramas comparando o perfil de HPLC da infusão (A) e após eluição com acetonitrila em NIP (B) e MIP (C).

4.3. Avaliação da atividade de extratos de *T. diversifolia* sobre a agregação plaquetária

Tithonia diversifolia, também conhecida como "arnica mexicana", tem sido utilizada na medicina tradicional para o tratamento de processos inflamatórios refratários, no entanto, são poucos os estudos associados aos riscos, para a saúde, associados com o consumo aleatório de infusões de plantas (chá), portanto, faz-se necessário identificar a atividade farmacológica, bem como o potencial tóxico das plantas medicinais. Considerando o número limitado de estudos farmacológicos sobre a *T. diversifolia*, o objetivo desta parte do estudo foi avaliar os efeitos da infusão dessa planta sobre a agregação plaquetária, explicando o fato pelos seus principais constituintes.

O resultado da inibição da agregação de plaquetas induzida por trombina, na presença da infusão de *T. diversifolia* afirma que são necessários de 0,6-20 ug/mL desse extrato para causar inibição de plaquetas (**Figura 10**).

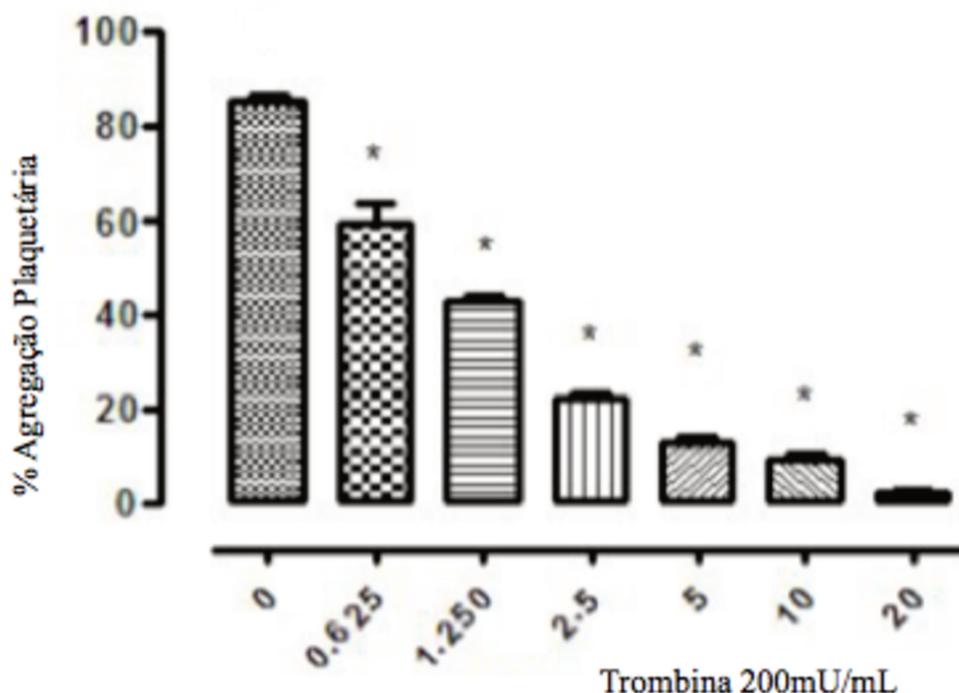


Figura 10: Curva de dose-resposta para a inibição da agregação de plaquetas para diferentes concentrações de infusão de *T. diversifolia* (Teste de Fisher, * p < 0,05).

4.4. Purificação das sPLA2 de *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus ssp.*

As técnicas de cromatografia de troca iônica e fase reversa foram utilizadas para obtenção das sPLA2 de venenos das serpentes de *Bothrops jararacussu* (Bj) e de *Crotalus durissus* (Cd). Os resultados de purificação são apresentados pelas figuras abaixo.

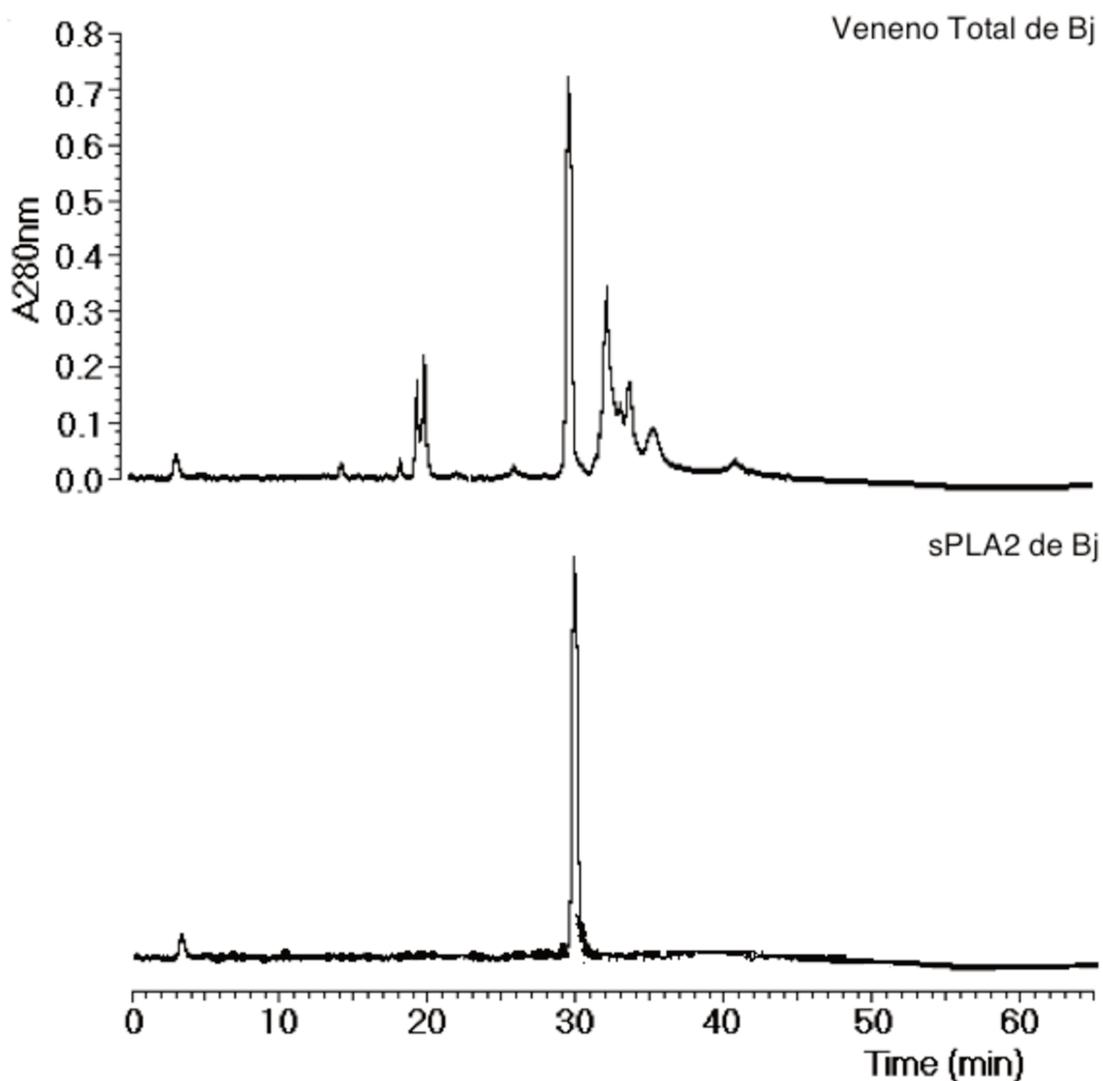


Figura 11: Perfil cromatográfico de veneno total de *Bothrops jararacussu* (Bj) em cromatografia de troca iônica e após a purificação e obtenção de sPLA2 por cromatografia de fase reversa.

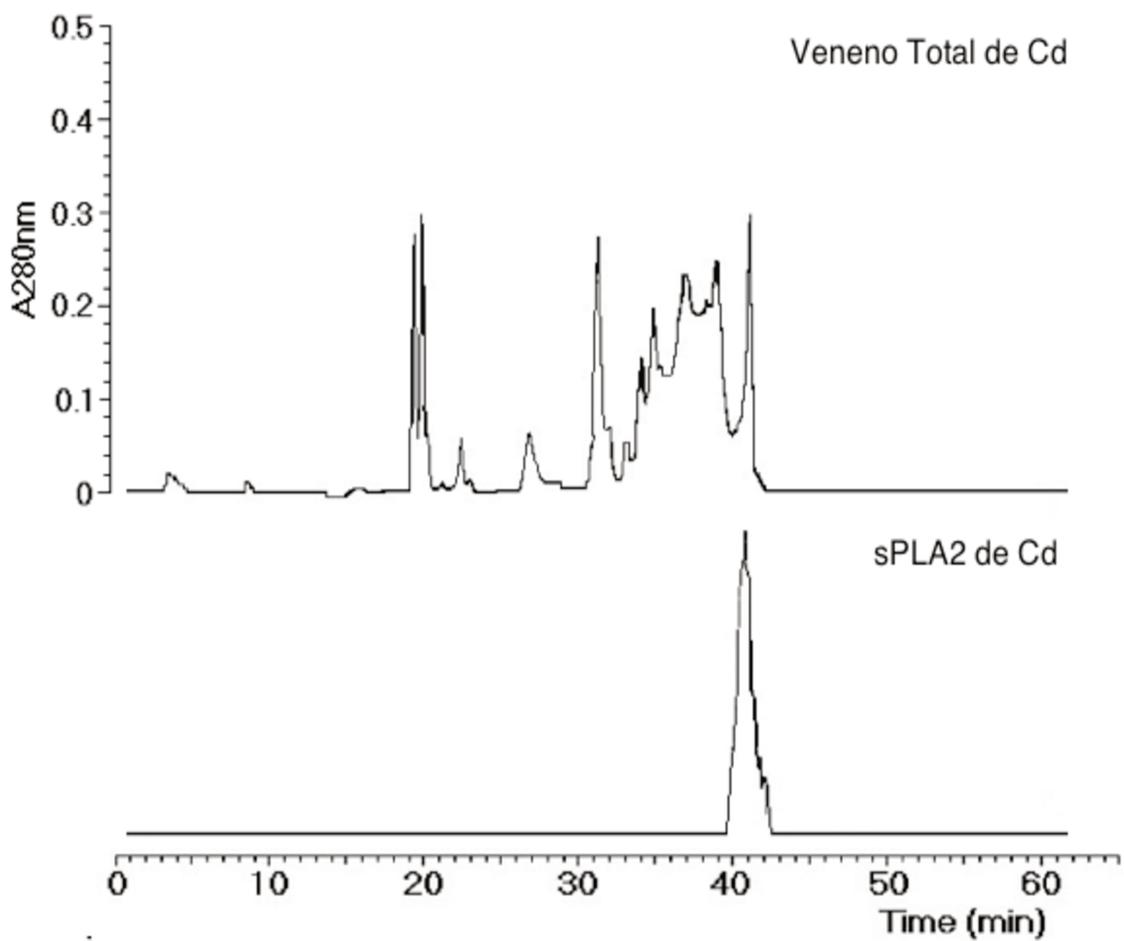


Figura 12: Perfil cromatográfico de veneno total de *Crotalus durissus* (Cd) em cromatografia de troca iônica e após a purificação e obtenção de sPLA2 por cromatografia de fase reversa.

4.5. Avaliar a influência de extrato de *T. diversifolia* sobre atividade enzimática de sPLA2, utilizando substrato sintético

Os resultados da atividade enzimática realizada com o sPLA2 de Bj, como agente indutor do processo inflamatório, seguindo os grupos nomeados no item 3.4.4 foram sumarizados na **Figura 13** e **Tabela 4**. A atividade enzimática foi determinada como incremento da absorbância do produto ao longo do tempo de ensaio e os dados apresentados em intervalos regulares de 10 minutos. Em ambos os casos observa-se uma linearidade da reação e que tanto o extrato nativo previamente incubado com a sPLA2 por 30 minutos ou coadministrados durante o início da atividade enzimática inibiram de forma igual a atividade da sPLA2 de Bj.

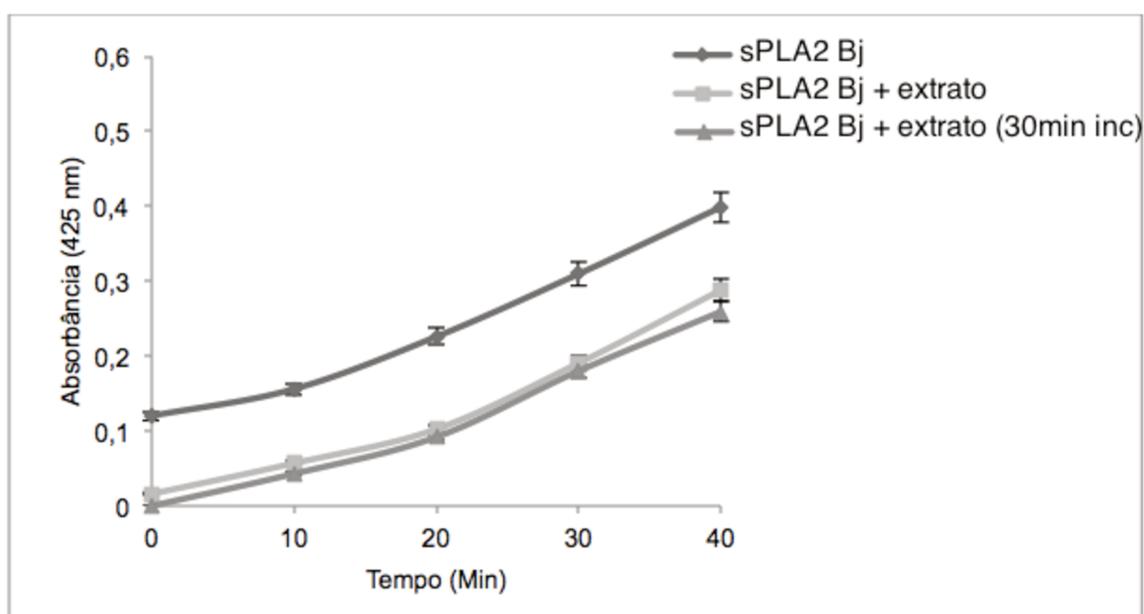


Figura 13: Atividade enzimática *in vitro* da sPLA2 de *Bothrops jararacussu* sobre o substrato sintético NOBA e após tratamento com extrato de *T. diversifolia*, avaliação pela formação de substrato colorido por tempo de reação. Cada ponto representa a média de n=5 (ANOVA).

Tabela 4: Valores da atividade enzimática por tempo expressos em porcentagens para a sPLA2 de *Bothrops jararacussu* e tratamento com extrato de *T. diversifolia* * p<0,05.

| Tempo (min) | sPLA2 Bj | sPLA2 Bj+ Extrato | SD | sPLA2Bj+ Extrato incubados | SD |
|--------------------|-----------------|--------------------------|-----------|-----------------------------------|-----------|
| 10 | 100% | 39,52%* | ±0,003 | 28,52%* | ±0,02 |
| 20 | 100% | 44,37%* | ±0,02 | 39,65%* | ±0,04 |
| 30 | 100% | 60,54%* | ±0,02 | 56,12%* | ±0,05 |
| 40 | 100% | 71,21%* | ±0,009 | 64,01%* | ±0,05 |

Os experimentos de atividade enzimática *in vitro* com sPLA2 de Cd foram executados nas mesmas condições do ensaio com sPLA2 de Bj. A **Figura 14 e Tabela 5** mostram os resultados com extrato. Observa-se que o mesmo foi efetivo em reduzir a atividade enzimática da sPLA2 de Cd sendo que a incubação das substâncias produziu uma redução maior do que a coadministração.

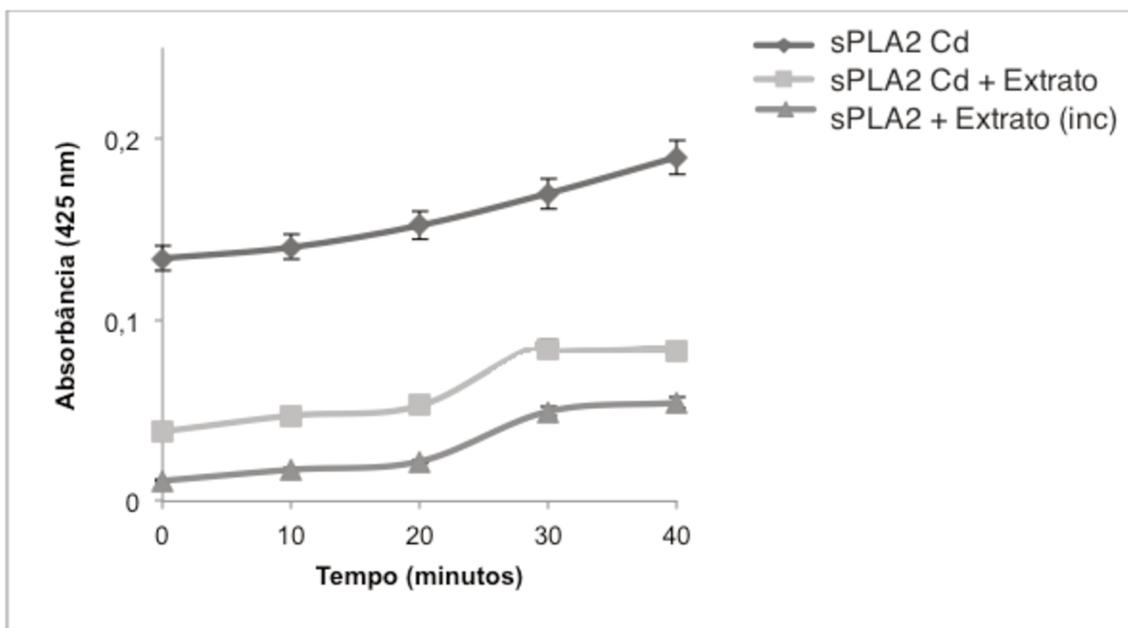


Figura 14: Atividade enzimática *in vitro* da sPLA2 de *Crotalus durissis* sobre o substrato sintético NOBA e após tratamento com extrato de *T. diversifolia*. Avaliação pela formação de substrato colorido por tempo de reação. Cada ponto representa a média de n=5 (ANOVA).

Tabela 4: Valores da atividade enzimática por tempo expressos em porcentagens para sPLA2 de *Crotalus durissis* e tratamento com extrato de *T. diversifolia*. *p<0,05

| Tempo (min) | sPLA2 Cd | Cd+ Extrato | SD | Cd+ Extrato incubados | SD |
|-------------|----------|-------------|--------|-----------------------|---------|
| 10 | 100% | 32,75%* | ±0,002 | 11,44%* | ±0,0009 |
| 20 | 100% | 35,09%* | ±0,002 | 13,47%* | ±0,001 |
| 30 | 100% | 52,57%* | ±0,004 | 30,16%* | ±0,002 |
| 40 | 100% | 43,64%* | ±0,004 | 29,62%* | ±0,003 |

4.6. Influência de extrato de *T. diversifolia* sobre o edema de pata induzido por sPLA2 de *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus ssp.*

O efeito do extrato de *T. diversifolia* sobre o edema de pata foi realizado utilizando sPLA2 purificadas dos venenos de Bj e Cd. O extrato foi injetado 30 minutos após a injeção das sPLA2, 30 minutos antes da injeção de sPLA2 ou com o extrato previamente incubado com as sPLA2 durante 30 minutos.

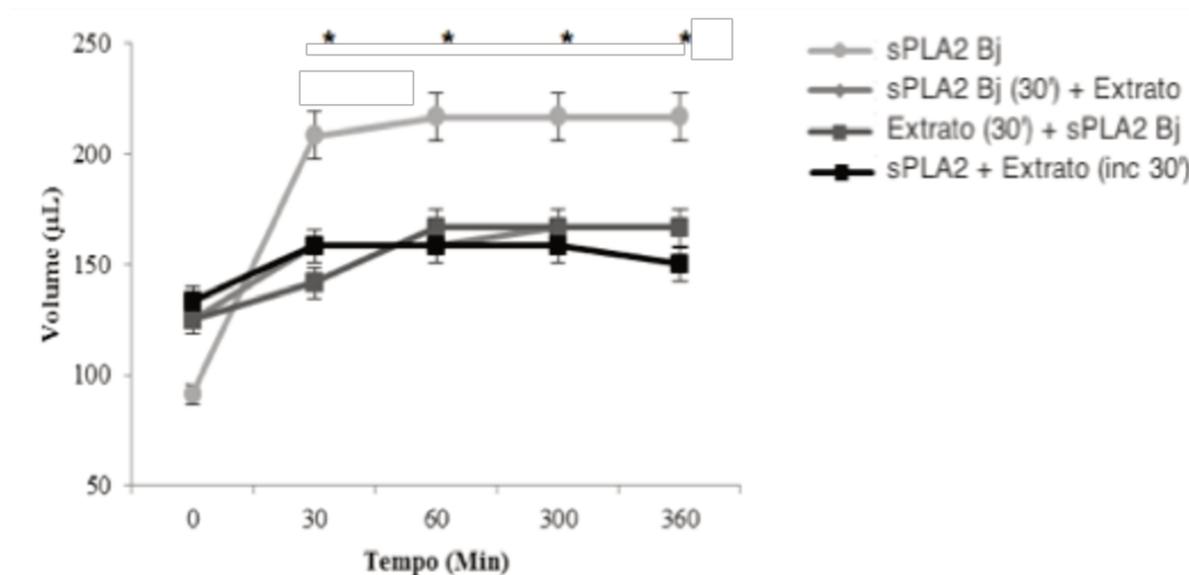


Figura 15: Edema de pata em camundongos com fração de sPLA2 de *Bothrops jararacussu* em presença de extrato de *T. diversifolia*. Cada ponto representa o valor de n=5. * significativo para todos os tratamentos quando comparados com o controle (ANOVA).

Seguindo o mesmo padrão foi realizado o tratamento com sPLA2 de veneno de Cd. A análise dos resultados permitiu observar que o extrato de *T. diversifolia* foi capaz de reduzir significativamente a ação edematogênica da sPLA2 a partir do tempo 60 minutos em todos os tratamentos realizados.

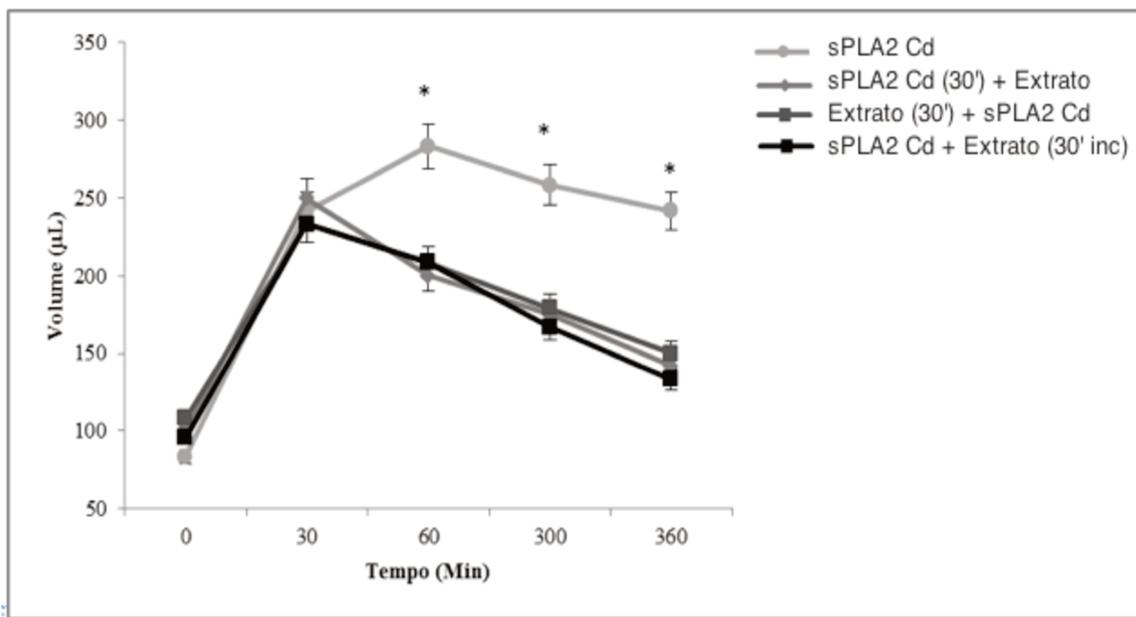


Figura 16: Edema de pata em camundongos com fração de sPLA2 do veneno de *Crotalus durissus* tratado com extrato de *T. diversifolia*. Cada ponto representa o valor de n=5. * Significativo para todos os tratamentos quando comparados com o grupo controle (ANOVA).

4.7. Avaliação do efeito de extrato de *T. diversifolia* sobre o miotoxicidade induzido por sPLA2 de *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus ssp.*

A ação do extrato de *T. diversifolia* sobre a atividade miotóxica da sPLA2 de veneno de Bj foi avaliada por meio de quatro protocolos experimentais: 1) o extrato injetado intraperitonealmente 30 minutos antes da injeção de sPLA2 de BJ; 2) injeção intraperitoneal do extrato 30 minutos após a injeção da sPLA2 de Bj; 3) Injeção do extrato com a sPLA2 que foram previamente incubados por 30 minutos antes da injeção (1:1, v:v); 4) Somente a sPLA2 de Bj (controle positivo).

Os ensaios de quantificação de CK mostram que o efeito miotóxico da sPLA2 de Bj foi reduzido pela injeção de extrato 30 minutos após a injeção intramuscular de sPLA2. A **Figura 17** mostra que a injeção do extrato, 30 minutos antes da injeção da fração, inibiu a atividade miotóxica em aproximadamente duas vezes menos do que a injeção do extrato 30 minutos após. A incubação do extrato com a sPLA2, 30 minutos antes das administrações reduziu os níveis séricos de CK três vezes mais do que o grupo que recebeu posteriormente o extrato.

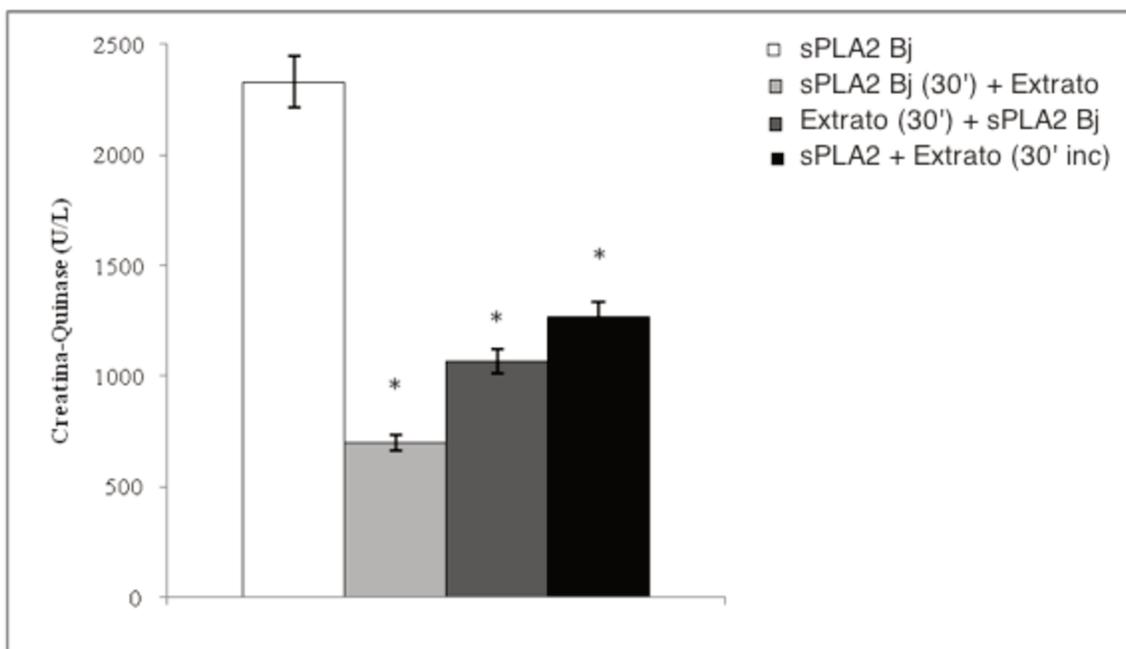


Figura 17: Avaliação do efeito do extrato de *T. diversifolia* sobre atividade miotóxica da fração de sPLA2 obtida a partir do veneno *Bothrops jararacussu*. Cada ponto representa o valor de n=5 (ANOVA, *p<0,05).

A ação do extrato de *T. diversifolia* sobre a atividade miotóxica da sPLA2 de veneno de Cd foi avaliada por meio dos mesmos protocolos experimentais do ensaio com Bj. Quando o tratamento foi realizado com extrato (**Figura 18**), a sPLA2 perde ação miotóxica no tratamento em que o extrato foi aplicado 30 minutos antes da indução de miotoxicidade e quando as sPLA2 foram incubadas por 30 minutos com o extrato antes da administração no músculo do cobaio.

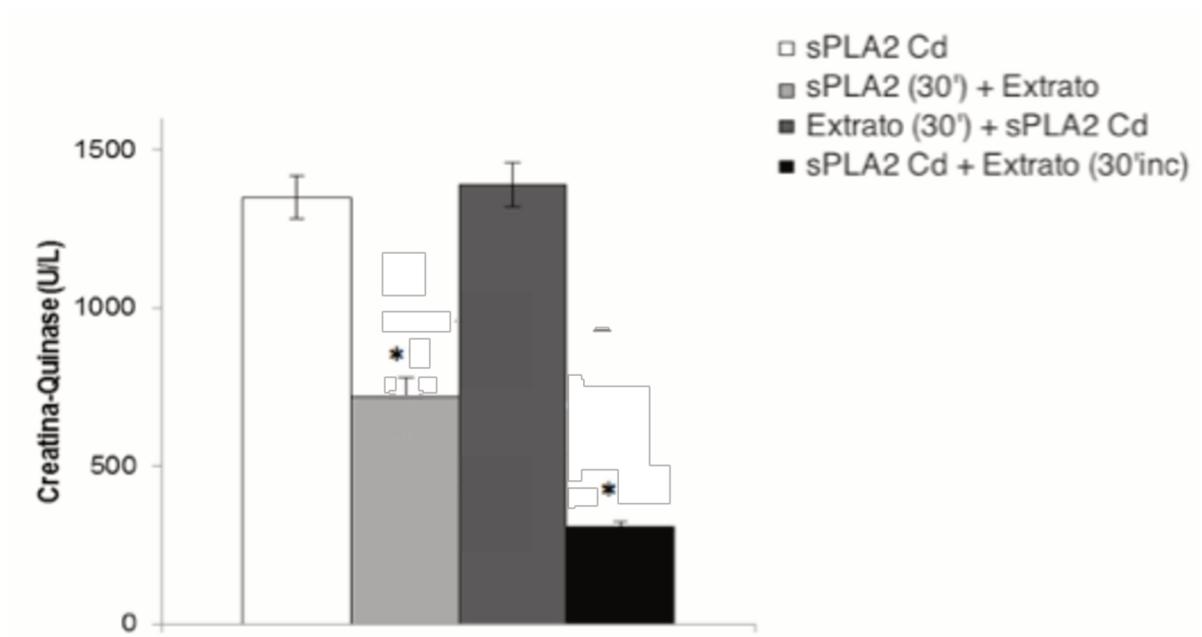


Figura 18: Avaliação do efeito do extrato de *T. diversifolia* sobre atividade miotóxica da fração de sPLA2 do veneno de *Crotalus durissus*. Cada ponto representa o valor de n=5 (ANOVA *p<0,05).

4.8. Identificação do mecanismo molecular pelo qual os extratos de *T. diversifolia* podem modular os genes envolvidos na inflamação, quando essa é induzida por sPLA2 de venenos de serpentes;

O material utilizado para a determinação da influência do tratamento com extrato de *T. diversifolia*, foi o músculo de camundongo obtido para o ensaio de liberação de CK (miototoxicidade). Como nesse experimento o sangue é retirado da cauda do camundongo que depois é sacrificado, fez-se a retirada do músculo para os ensaios de biologia molecular.

A **Figura 19** abaixo indica que existe uma expressão de genes relacionados à inflamação. Os números 1, 2 e 3, são os controles de reação, sendo eles: somente músculo, músculo tratado com sPLA2 de Bj e músculo tratado com sPLA2 de Cd, ambos expressam os genes. As amostras de números 4, 5 e 6, foram obtidas após os seguintes tratamentos: injeção de sPLA2 no músculo 30min antes do tratamento por extrato intraperitonealmente, injeção de extrato intraperitoneal 30 min antes da aplicação de sPLA2 no músculo e sPLA2 incubada com extrato por 30 min anteriormente a injeção no músculo.

| Amostras | Ct |
|--|-------|
| 1 somente músculo | 33,72 |
| 2 músculo tratado com sPLA2 de Bj | 21,65 |
| 3 músculo tratado com sPLA2 de Cd | 18,03 |
| 4 injeção de sPLA2 no músculo 30min antes do extrato intraperitonealmente | 21,71 |
| 5 injeção de extrato intraperitoneal 30 min antes da aplicação de sPLA2 no músculo | 29,24 |
| 6 sPLA2 incubada com extrato por 30 min anteriormente a injeção no músculo | 31,49 |

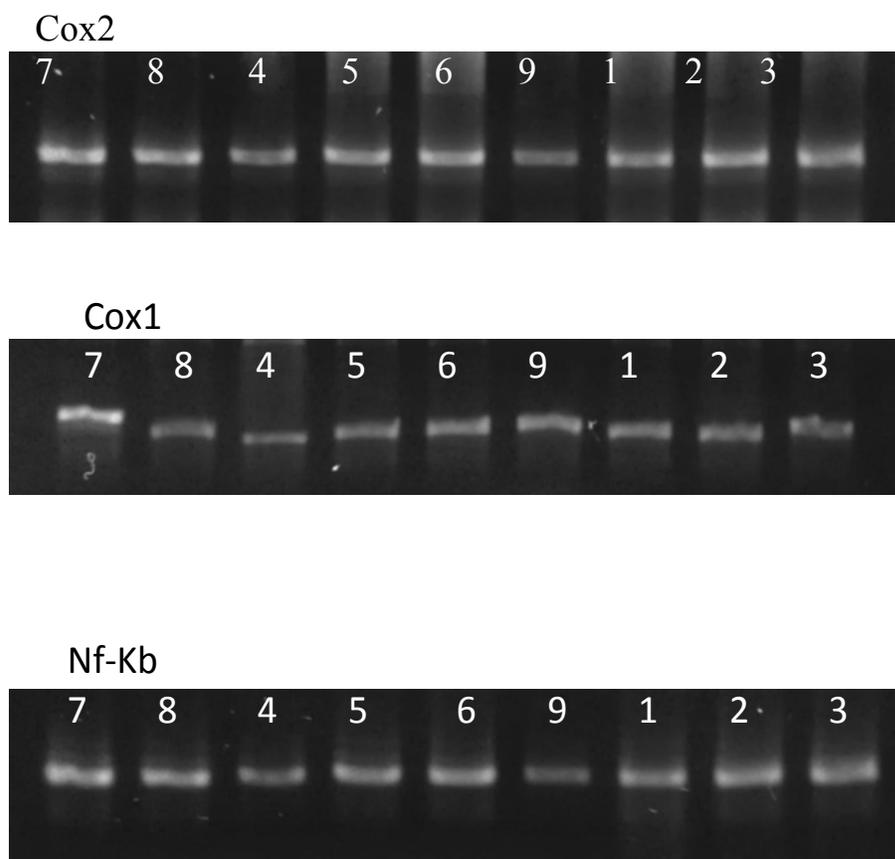


Figura 19: Gel obtido pela amplificação de genes relacionados à inflamação induzida por sPLA2 e após tratamento com extrato de *T. diversifolia*.

Após a obtenção do cDNA, foi realizado PCR em tempo real e análise dos dados através das curvas de melting, que é uma abordagem clássica para avaliar os resultados. Estas curvas representam a temperatura em função da fluorescência e dependem do tamanho e composição do produto amplificado. Frequentemente as curvas são obtidas através de aumentos sucessivos da temperatura nos poços da reação até se perder a fluorescência devido à desnaturação do DNA. Quando se atinge a temperatura de melting da sequência alvo observa-se uma quebra abrupta da fluorescência. A temperatura de melting de cada produto de amplificação depende do seu conteúdo em guanina e citosina (G+C), e comprimento e características das sequências permitem distinguir diferentes produtos da PCR (Espy et al., 2006; Mackay et al., 2007).

A **Figura 20** apresenta o resultado da análise de PCR em tempo real realizada para os músculos tratados com extrato de *T. diversifolia*, buscando identificar se há variação entre a expressão dos mesmos.

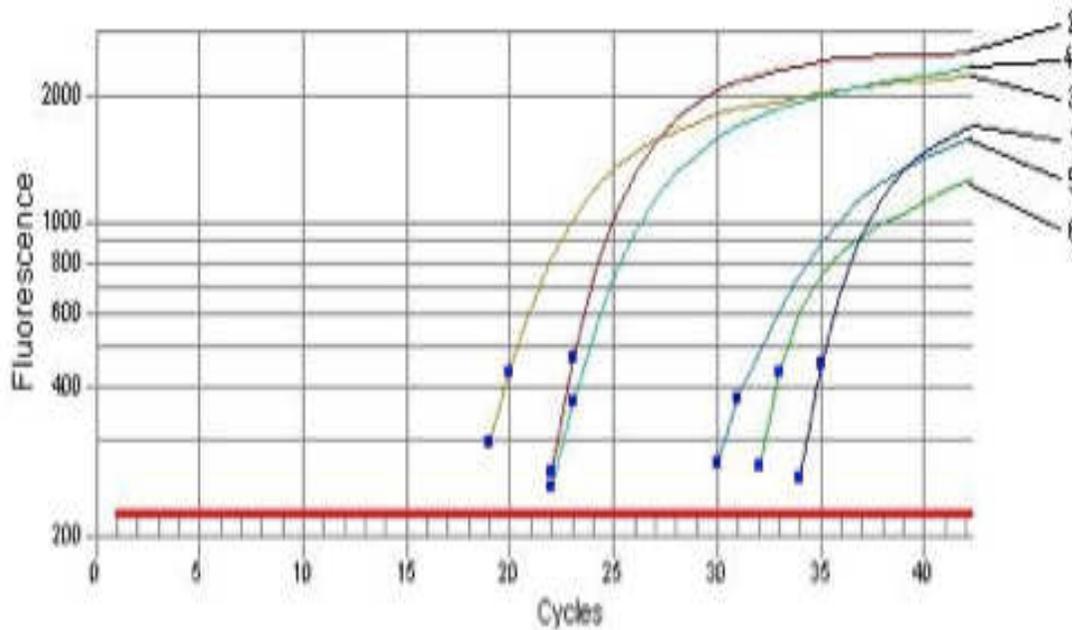


Figura 20: Curvas de qPCR para genes relacionados a inflamação induzida por sPLA2 e tratamento com extrato de *T. diversifolia*.

5. DISCUSSÃO

As infusões são destinadas a plantas ou drogas que apresentam classes de substâncias voláteis ou termolábeis, como óleos essenciais e alcaloides; mas também se aplica a partes vegetais frágeis, como pétalas ou folhas membranáceas que liberam facilmente seus ativos. A técnica de decocção é utilizada com plantas que apresentam princípios ativos de difícil extração, por estarem presentes em partes lenhosas das plantas, bem como de drogas com classes químicas termoestáveis como: taninos, flavonoides e derivados triterpênicos (Leite, 2009).

Essa técnica demonstrou ser promissora no desenvolvimento de método de preparação de um novo sorvente para a extração e purificação de forma simplificada. A técnica de MIP é de interesse uma vez que utiliza materiais de baixo custo e o SPE pode ser reutilizado várias vezes sem perda de eficiência.

Os eluídos foram enviados para a Central Analítica do Instituto de Química da USP, SP, para comprovar a massa e para garantir que a variação nos tempos de retenção em decorrência da diferença de MIP.

A técnica de molecular imprint tem sido avaliada para extração de substâncias puras a partir de extratos ou matrizes complexas. A tentativa de purificar o extrato obtido a partir de infusão de folhas de *T. diversifolia* foi produtiva uma vez que retirou alguns compostos não específicos para o SPE desenvolvido.

No entanto, a MM utilizada (mentol) não é o melhor padrão a ser utilizado, pois as moléculas ativas, da planta, são maiores, em sua maioria sesquiterpenos, portanto, novas MM serão utilizadas para melhorar a eficiência do sistema.

Os resultados promissores estimulam avaliar a técnica a partir de outras moléculas padrão. O papel das plaquetas está bem estabelecido na hemostase primária através da promoção da formação de trombos e reparação da parede do vaso. Antiplaquetários são usados na prevenção de acidentes vasculares cerebrais (AVC) e tratamento da síndrome coronária. Além disso, o aumento da ativação das plaquetas está relacionado com muitas condições patológicas, como por exemplo: na aterosclerose (Gawaz, 2003), diabetes (Ferreiro, Gómez-Hospital e Angiolillo, 2010), metástases de tumores (Nash *et al.*, 2002), a asma (Kornerup e Page, 2007) e outros tipos de inflamação. Assim, o estudo de agentes anti-

agregantes plaquetários representa novas perspectivas de uma intervenção terapêutica em doenças plaquetárias ou correlacionadas a elas.

As plaquetas são ativadas por agonistas, como a trombina, o difosfato de adenosina (ADP) e tromboxano (TXA₂). O receptor que é ativado por trombina é acoplado à proteína G na membrana plasmática levando à ativação de fosfolipase C_β (PLC_β) e resultando na formação de IP₃ e diacil glicerol, que conduzem a uma elevação de cálcio livre citoplasmática [Ca²⁺] e à ativação da proteína quinase C (PKC), respectivamente. Estes eventos induzem a geração de TXA₂, por formação de ácido araquidônico pela ação da ciclo-oxigenase 1 (COX-1), a ativação da integrina do citoesqueleto e de GPIIb / IIIa, que une as plaquetas entre si, culminando na formação de agregados de plaquetas (Fox, 2001).

No mercado farmacêutico existem poucas drogas que podem ser usadas em distúrbios plaquetários. Extratos que têm este efeito são de interesse comercial. Outro aspecto importante é o cuidado que se deve ter com as infusões que apresentam atividade antiagregante plaquetária, pois essas podem apresentar interação com outros fármacos que podem ser utilizados pelos pacientes.

O potencial anti-plaquetário foi investigado em sangue humano após indução da agregação por agonista de trombina. Este estudo explorou o extrato aquoso de *T. diversifolia*.

A trombina foi utilizada para induzir a agregação de plaquetas, uma vez que desempenha um papel importante na manutenção da homeostase (fator II ativado). Esse ativador é uma proteína serina-protease do tipo (EC 3.4.21.5) que, por conseguinte, atua quebrando proteínas em certos locais. A sua principal função é a de converter o fibrinogênio em fibrina (filamentos de proteínas) fazendo seu papel no processo de coagulação (Baykal, Schmedtje e Runge, 1995).

A trombina, além de transformar o fibrinogênio em fibrina, também retarda o processo de coagulação (provavelmente, de modo que este não ocorre descontroladamente). Fatores genéticos, como fator V de Leiden podem interferir diretamente nesse sistema de autocontrole. Nestes casos, a ineficiência da autocoagulação (via de proteína C) pode causar um estado de hipercoagulabilidade no sangue, favorecendo a formação de trombos (coágulos) nas veias, cuja condição clínica é a trombose (Poort *et al.*, 1996).

Devido a trombina ser considerada o mediador central da trombogênese (hipótese de trombina), acredita-se que a inibição da sua atividade e / ou o seu receptor deva interromper

a formação de trombos e de reduzir a lesão vascular (Blaya *et al.*, 1998).

Os resultados mostraram que a infusão de *T. diversifolia* foi capaz de inibir a agregação de plaquetas em concentrações muito baixas. Os estudos fitoquímicos revelam que os extratos de *T. diversifolia* são compostos de sesquiterpenos. Tagitinina C é um dos ingredientes ativos mais isolados e identificados a partir das partes aéreas dessa planta. Um estudo realizado com sesquiterpenos obtidos a partir do óleo essencial das hastes de *L. Martiniano* mostraram que essa substância era capaz de inibir a agregação de plaquetas em 37,0%. No entanto, o mecanismo de inibição da ação permanece desconhecido (Ziémons *et al.*, 2007).

O potencial anti-agregante da infusão de *T. diversifolia* estimula mais testes para determinar o mecanismo de ação e dose efetiva para manter-se com ensaios *in vivo*.

O aumento gradual do conhecimento da complexidade da molécula de DNA e a constante exigência de meios de diagnóstico cada vez mais rápidos, fiáveis e específicos, conduziram ao desenvolvimento de diversas técnicas de quantificação do DNA ao longo dos últimos 50 anos. Destacam-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e as numerosas variantes recentemente desenvolvidas, entre as quais se evidencia a PCR em tempo real que tem como principal particularidade a monitorização em tempo real da amplificação (Mackay *et al.*, 2007; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Devido à rapidez, sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade da técnica, a PCR em tempo real é hoje em dia fundamental em investigação médica, forense ou biotecnológica. As suas aplicações estendem-se desde a genotipagem e a quantificação da expressão génica até à toxicologia forense e a biossegurança. Esta amplitude de aplicações é demonstrada pelo crescimento quase exponencial das publicações científicas baseadas nesta técnica desde a sua criação em 1993 (Mackay *et al.*, 2007; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008; Oliveira, 2009).

No presente estudo os resultados dos experimentos de PCR em *rela time* para determinar se ocorre a interferência na expressão de genes, envolvidos na inflamação, pelo tratamento do animal com o extrato, obtido por decocção de Td, determinaram que houve uma redução na expressão do gene COX, sendo esse diretamente relacionado a mediadores citoplasmáticos inflamatórios. Esse resultado é avaliado pelos valores de absorbância de fluorescência pelo número de ciclos, expressos na figura 20. Quanto menor os valores maior a expressão, sendo uma grandeza inversamente proporcional.

Os resultados mostram que ambos compostos, sPLA2 Bj e sPLA2 Cd, foram capazes de

induzir processos inflamatórios. O extrato mostra a capacidade de interagir com os compostos testados, sendo capaz de diminuir a atividade inflamatória apresentada pelos compostos, no entanto, o gene Nf-Kb, de presença nuclear foi o menos afetado pelo tratamento, o que já era esperado, uma vez que esse gene é difícil de ser modulado, visto a sua localização.

Diante do resultados é promissora a utilização de extrato polar, por decocção de *T. diversifolia* em processos inflamatórios de natureza aguda. No entanto, a forma farmacêutica tópica deve ser ainda mais indicada, já que em avaliação sistêmica, não se deve ignorar a alteração da agregação plaquetária também indicada nesse estudo.

6. CONCLUSÕES

- O extrato de melhor rendimento foi obtido por decocção;
- Principais constituintes são os derivados do ácido cinâmico: cafeoil-glicosídico, tagitinina C e ácido quínico;
- A técnica de molecular imprint (MP) permitiu uma separação dos constituintes sendo uma metodologia prática;
- O extrato polar apresentou atividade anti-agregante plaquetária na concentração de 0,6 a 20µg/mL, frente ao estímulo de indução por trombina, o que representa que o chá não é tão inerte e que pode promover complicações em indivíduos com distúrbios de coagulação;
- A purificação de Bj e Cd foi realizada por técnicas cromatográficas, com rendimento de aproximadamente 30% de sPLA2;
- Ensaio enzimático *in vitro*, com NOBA identificou que o extrato polar foi capaz de reduzir em 60% a atividade enzimática de sPLA2 de Bj, independente do tipo de tratamento aplicado;
- A redução da atividade enzimática por NOBA de sPLA2 de Cd foi reduzida em 30% quando a mesma foi incubada por 30 min em presença do extrato;
- A ação edematogênica de sPLA2 de Bj foi reduzida em 50%, quando esta estava em presença do extrato, independe de prévia incubação, já a mesma ação para sPLA2 de Cd foi reduzida drasticamente pelo extrato, no entanto, após 60 min da administração do agente indutor de inflamação;
- Quanto a liberação de CK o extrato atuou de forma distinta dependendo da fonte de sPLA2. Para sPLA2 de Bj o extrato promoveu uma atividade protetora de liberação de CK, no entanto, a sPLA2 de Cd apresentou capacidade reduzida de liberação de CK quando foi incubada com o extrato por 30min antes da aplicação;
- PCR em tempo real demonstrou que o gene Nf-Kb, embora responda a presença do extrato, é o que mais tardiamente é ativado (ou expresso), possivelmente por ser nuclear;
- Embora promissor para o tratamento de inflamação aguda, induzida por sPLA2, o cuidado com a forma sistêmica de utilização faz-se necessária, uma vez que a capacidade de inibir a agregação plaquetária foi identificada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FAPESP. **Conhecimento e uso sustentável da biodiversidade brasileira: o Programa Biota-FAPESP**. Revista da FAPESP. FAPESP. São Paulo: FAPESP 2008.

AGBEDAHUNSI, J. M. Screening of Crude Drugs for the treatment of malaria in Nigeria, Phytomedicine in malaria and sexually transmitted diseases. Challenges for the New Millennium. **Drug Research and Production Unit, Faculty of Pharmacy, Obafemi Awolowo University, Ile Ife Nigeria Publication**, v. 1, p. 13-22, 2000.

AKOBUNDU, I. O.; AGYAKWA, C. W. A Handbook of West African Weeds. **International Institute for Tropical Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 194-195, 1987.

ALLENDER, C. J. et al. Pharmaceutical application for molecularly imprinted polymers. **Int J Pharm**, v. 195, n. 1-2, p. 39-43, 2000.

BALBANI, A. P.; SILVA, D. H.; MONTOVANI, J. C. Patents of drugs extracted from Brazilian medicinal plants. **Expert Opin Ther Pat**, v. 19, n. 4, p. 461-73, Apr 2009. ISSN 1744-7674.

BAYKAL, D.; SCHMEDTJE, J. F.; RUNGE, M. S. Role of the thrombin receptor in restenosis and atherosclerosis. **Am J Cardiol**, v. 75, n. 6, p. 82B-87B, Feb 1995. ISSN 0002-9149.

BLAYA, C. et al. [Use of new thrombin inhibitors in medical practice]. **Arq Bras Cardiol**, v. 71, n. 2, p. 163-7, Aug 1998. ISSN 0066-782X.

BONTA, I. L.; ADOLFS, M. J.; PARNHAM, M. J. Distribution and further studies on the activity of prostaglandin E in chronic granulomatous inflammation. **Agents Actions Suppl**, n. 6, p. 121-32, 1979. ISSN 0379-0363.

BRASIL. **Decreto no. 10.447. Cria Grupo de Trabalho para formular proposta da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, e dá outras providências**. UNIÃO, D. O. D. Brasília: Ministério da Saúde 2005.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). **Planta Med.**, v. 69, n. 11, p. 973-983, 2003.

CHAUDHARY, M. I. et al. Clematis huchouensis Tamura: a traditional Chinese herbal medicine and its quality control using a high performance liquid chromatography technique. **Biol Pharm Bull**, v. 30, n. 1, p. 165-8, Jan 2007. ISSN 0918-6158.

DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. **J Pharm Pharmacol**, v. 24, n. 2, p. 89-102, Feb 1972. ISSN 0022-3573.

DIROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology**, v. 104, p. 15-29, 1971.

ELUFIOYE, T. O.; AGBEDAHUNSI, J. M.; ADESANYA, S. A. 8-(2-methylbutanoyl)-3,10. epoxy-, 8-dihydroxyl-4, 11(13)-germacridien-12, 6-olide, a new sesquiterpene lactone from *Tithonia diversifolia*. **Journal of Natural Products and Medicine** v. 8, p. 74-76, 2004.

FERNANDES, T. M. D. S. P. U. D. S. P. **Plantas medicinais: memória e história da constituição de sua comunidade científica no Brasil (pesquisa, indústria e inovação)**. 2001. 120 (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo.

FERREIRO, J. L.; GÓMEZ-HOSPITAL, J. A.; ANGIOLILLO, D. J. Platelet abnormalities in diabetes mellitus. **Diab Vasc Dis Res**, v. 7, n. 4, p. 251-9, Oct 2010. ISSN 1752-8984.

FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, A. C. B.; ARRUDA, M. A. Z. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 361-372, 2008.

FOX, J. E. Cytoskeletal proteins and platelet signaling. **Thromb Haemost**, v. 86, n. 1, p. 198-213, Jul 2001. ISSN 0340-6245.

GAWAZ, M. Do platelets trigger atherosclerosis? **Thromb Haemost**, v. 90, n. 6, p. 971-2, Dec 2003. ISSN 0340-6245.

GOFFIN, E. et al. In vitro antiplasmodial activity of *Tithonia diversifolia* and identification of its main active constituent: Tagitinin C. **Planta Medica**, v. 68, p. 543-545, 2002.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A.; BORIN, M. R. M. B. **Biodiversidade: um enfoque químico-biológico**. 1. Rio de Janeiro: UFRJ, 1996. 50.

GU J. Q. et al. Sesquiterpenoids from *Tithonia diversifolia* with potential cancer chemopreventive activity. **J. Nat. Prod**, p. 532—536, 2002.

HARVEY, A. L. et al. What can toxins tell us for drug discovery? **Toxicon**, v. 36, n. 11, p. 1635-40, Nov 1998. ISSN 0041-0101.

KINGHORN A. D. et al. Studies on some edible and medicinal plants of Mesoamerica. **Proc West Pharmacol Soc**, v. 41, p. 253-258, 1998.

KOKWARO, J. O. Medicinal Plants of East Africa. **General Printer**, v. 1, p. 1, 1976.

KORNERUP, K. N.; PAGE, C. P. The role of platelets in the pathophysiology of asthma. **Platelets**, v. 18, n. 5, p. 319-28, Aug 2007. ISSN 0953-7104.

KUO, V. H.; CHEN, C. H. Sesquiterpenes from the leaves of *Tithonia diversifolia*. . **Journal of Natural Products**, n. 61, p. 827-828, 1998.

KURODA, M. et al. Sesquiterpenoids and flavonoids from the aerial parts of *Tithonia diversifolia* and their cytotoxic activity. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** v. 55, p. 1240-1244, 2007.

LI, C. Y. et al. Honokiol inhibits LPS-induced maturation and inflammatory response of human monocyte-derived dendritic cells. **J Cell Physiol**, Dec 2010. ISSN 1097-4652.

MAGALHÃES, C. S. et al. **Strategies for sample preparation focusing on biomolecules determination/characterization**. 1. New York: Nova Science Publishers, 2007. 288.

MAREGESI, S. et al. Screening of Tanzanian Medicinal Plants against *Plasmodium falciparum* and Human Immunodeficiency Virus. **Planta Med**, v. 1, p. 3, 2009.

MIGUEL, D. M.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. 1. São Paulo: Biomed Books, 2000. 115.

MIURA T. et al. Antidiabetic effect of Nitobegiku, the herb *Tithonia diversifolia*, in KK-Ay diabetic mice. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, p. 2152-2154, 2005.

NASH, G. F. et al. Platelets and cancer. **Lancet Oncol**, v. 3, n. 7, p. 425-30, Jul 2002. ISSN 1470-2045.

PEREIRA PS, D. D.; VICHNEWSKI W; NASI AM, H. W. Sesquiterpene lactones from Brazilian *Tithonia diversifolia*. **Phytochemistry** v. 45, p. 1445 - 1448, 1997.

PEZZUTO, J. M. Plant-derived anticancer agents. **Biochem Pharmacol.**, v. 24, n. 53(2), p. 121-133, 1997.

POORT, S. R. et al. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. **Blood**, v. 88, n. 10, p. 3698-703, Nov 1996. ISSN 0006-4971.

REN, D. Fingerprint chromatogram analysis of extracts from the leaves of *Tripterygium wilfordii* Hook. F. by high performance liquid chromatography. **J. Chin. Medic. Mat**, v. 24, p. 235-239, 2001.

RUNGELER, P. et al. Study of three sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* on their anti-inflammatory activity using the transcription factor NF- κ B and enzymes of the arachidonic acid pathway as a target. **Planta Medica**, v. 64, p. 588 - 593, 1998.

SANITÁRIA, A. N. D. V. **Agenda Nacional de Prioridades de Pesquisa em Vigilância Sanitária**. Brasília: Ministério da Saúde do Brasil. 1: 15 p. 2011.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o

desenvolvimento de medicamentos. In: ALEGRE, P. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 1999.

SCHUSTER, B. G. A new integrated program for natural product development and the value of an ethnomedical approach. **J Altern Complement Med**, v. 7 Suppl 1, p. S61-72, 2001. ISSN 1075-5535.

SILVA, M. A. S. **Variabilidade genética e fitoquímica da população do Cerrado e Mata Atlântica da Casearia**. 2003. (Doctoral). Faculdade de Ciências Agrônomicas, UNESP, Botucatu.

TAKANASHI, M. Composition for curing diabetes mellitus, processes for the preparation of same and usage of same. **U.S. Patent**, v. 5, p. 773, 1998.

THIJSSSEN, R.; MURITHI, F. M.; NYAATA, O. Z. Existing Hedges on Farms in the Coffee-based Land-use System of Embu District, . **Kenya AFREENA Report**, n. 65, p. 5, 1993.

TONA, L. et al. Antiamoebic and spasmolytic activities of extracts from some antidiarrhoeal traditional preparations used in Kinshasa, Congo. **Phytomedicine**, v. 7, p. 31-38, 2000.

WINTER, C. A.; RUSLEY, E. A.; NUSS, C. W. Carrageenan-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. . **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine** v. 111, p. 544-547, 1962.

ZIÉMONS, E. et al. Direct determination of tagitinin C in *Tithonia diversifolia* leaves by on-line coupling of supercritical carbon dioxide extraction to FT-IR spectroscopy by means of optical fibres. **Talanta**, v. 71, n. 2, p. 911-7, Feb 2007. ISSN 1873-3573.

ANEXOS



UNICAMP



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1501-1**, sobre "Estudo das propriedades moleculares de cumarinas sintéticas e p-bromofenancil sobre a PLA₂ de *Crotalus durissus ruruima* e *Crotalus durissus cumanensis*: avaliação estrutural e biológica. Caracterização da atividade de agregação plaquetária e edematogênica", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama / Fabiana Vieira Fonseca, 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 **28 de abril de 2008**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1501-1**, entitled " _____ ", 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 **April 28, 2008**.

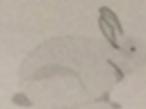
Campinas, 28 de abril de 2008.

Profa. Dra. Ana Aparecida Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva



UNICAMP



CEUA/Unicamp

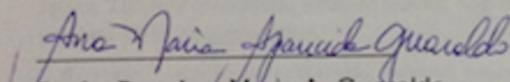
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

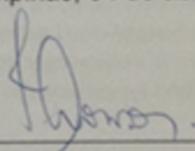
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Modulação das atividades farmacológicas, bioquímicas e enzimáticas das sPLA2 básicas de Bothrops jararacussu e Crotalus durissus ssp por extratos semi purificados obtidos a partir de Tithonia diversifolia" (protocolo nº 2354-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama / Verônica Cristina Gomes Soares, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 04 de abril de 2011.

Campinas, 04 de abril de 2011.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva