

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ROGÉRIO GRANDO

**“*PTERODON PUBESCENS* BENTH.: AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA
DO EXTRATO AQUOSO E ATIVIDADE ANTI-ARTRITE
REUMATOIDE DO EXTRATO DICLOROMETANO EM
MODELOS ANIMAIS”**

CAMPINAS,

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ROGÉRIO GRANDO

“*Pterodon Pubescens* Benth.: Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato aquoso e atividade anti-artrite reumatoide do extrato diclorometano em modelos animais”

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação defendida pelo candidato

Rogério Grando


e aprovada pela Comissão Examinadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de Mestre em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos na área de Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Orientadora: Dra. Mary Ann Foglio

CAMPINAS,
2013

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

G764p Grando, Rogério, 1985-
Pterodon pubescens Benth. : avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato aquoso e atividade anti-artrite reumatoide do extrato diclorometano em modelos animais / Rogério Grando. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Mary Ann Foglio.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Pterodon pubescens*. 2. Atividade antiinflamatória. 3. Atividade antinociceptiva. I. Foglio, Mary Ann. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: *Pterodon pubescens* Benth. : evaluation of antiinflammatory and antinociceptive activity crude aquos extract and antireumatic activity of crude dichloromethane extract on experimental models

Palavras-chave em inglês:

Pterodon pubescens

Anti-inflammatory activity

Antinociceptive activity

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Mestre em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Banca examinadora:

Mary Ann Foglio [Orientador]

Debora Barbosa Vendramini Costa

Maria Helena Sarragiotto

Vera Lucia Garcia Rehder

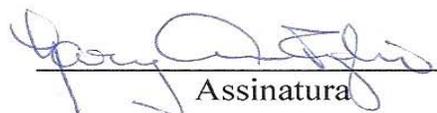
Data de defesa: 16-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

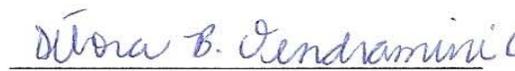
Campinas, 16 de agosto de 2013

COMISSÃO EXAMINADORA

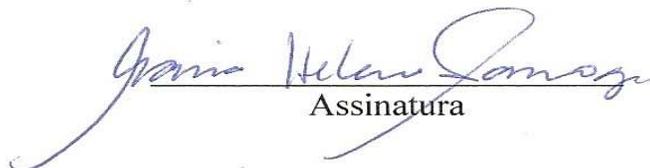
Dra. Mary Ann Foglio (orientadora)


Assinatura

Dra. Débora Barbosa Vendramini Costa


Assinatura

Profa. Dra. Maria Helena Sarragiotto


Assinatura

Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder


Assinatura

Profa. Dra. Luciane Cruz Lopes

Assinatura

RESUMO

O uso de plantas medicinais é uma prática comum na medicina popular, entretanto, seu uso indiscriminado pode trazer sérios danos à saúde. Portanto é de fundamental importância estudos que comprovem a eficácia, segurança e qualidade de uma espécie vegetal. Estudos conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa comprovaram atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antiproliferativa do extrato diclorometano de *Pterodon pubescens* Benth. e de três vouacapanos isolados e identificados a partir desta espécie. Com base nesses resultados aliados as informações do uso popular dos chás da espécie, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficácia do extrato aquoso de *P. pubescens*, avaliar a estabilidade de micropartículas produzidas com esse extrato, e a atividade anti-artrica do extrato diclorometano da espécie. Estudos fitoquímicos desses extratos demonstraram que o extrato apolar continha Geranylgeraniol, composto não detectado no extrato aquoso. Já os compostos vouacapanos foram detectados em concentrações análogas no extrato aquoso (Ppa) como no extrato diclorometano (Pp). A atividade farmacológica foi observada através dos modelos de contorções abdominais induzido por ácido acético, lambadura de pata induzido por formalina, hiperalgésia e edema de pata induzido por carragenina. O extrato diclorometano (Pp) demonstrou melhor eficácia (Contorção abdominal inibição de 53% Ppa e 71% Pp ANOVA $p < 0,05$; Formalina fase 1: Ppa Inativo; Pp 77,3% ANOVA $p < 0,05$, fase 2: Ppa 85,6% Pp 98,0% ANOVA $p < 0,05$ e Edema da pata Ppa 50% na dose de 100mg/kg Pp 50% na dose de 100mg/kg ANOVA $p < 0,05$) quando comparado ao extrato aquoso. Essa dados nos sugeriu um provável efeito sinérgico dos compostos vouacapanos e geranylgeraniol aumentando o efeito antinociceptivo do extrato de diclorometano. A atividade anti-artrite reumatoide do extrato diclorometânico foi evidenciado pela redução do índice de artrite, índice de alodínia e diminuição do número de linfócitos. Nesse último modelo também foi evidenciado que o tratamento contínuo durante 14 dias, não interferiu nas funções renais e hepáticas dos animais. Também foi observado que o processo de microencapsulação por atomização preservou as características físicas e químicas do extrato aquoso durante o teste de estabilidade, sendo uma alternativa para o prolongamento do tempo de armazenamento desse extrato.

Palavras chaves: *Pterodon pubescens* Benth.; extrato aquoso; estabilidade

ABSTRACT

Medicinal plants have been used to treat various diseases; however, the random use can cause serious damage. *Pterodon pubescens* Benth. (Sucupira) seeds have been widely used by local people for treatment of various inflammatory processes. Previous studies showed that geranylgeraniol and three voucapans isolated and identified from this species were involved with anti-inflammatory and antinociceptive activity. Brazilian folkmedicine employ teas prepared from this species seeds to treat pain. The ethno pharmacological data combined with the results previously produced by our research group promoted the present study that

proposed the efficacy evaluation of the aqueous *P. pubescense* extract on antinociceptive experimental models, stability of microparticles produced from the extract. Also since the plant species is described in folk medicine for treatment of chronic pain, arthritis experimental model induced by CFA (Compleat Freund's Adjuvants) were undertaken. Phytochemical comparison evaluation showed that the dichloromethane (Pp) extract contained geranylgeraniol, and furan diterpenes (vouacapans) whereas only vouacapans were detected in the polar aqueous extract (Ppa). The pharmacological activity was measured by writhing induced by acetic acid, paw licking induced by formalin hyperalgesia and paw edema induced by carrageenan models. The dichloromethane extract (Pp) showed better efficacy in comparison to the aqueous extract (inhibition of writhing by 53% Ppa and 71% Pp ANOVA $p < 0.05$; Formalin phase 1: Idle Ppa; inhibition of 77.3% Pp ANOVA $p < 0.05$, Phase 2: Inhibition of 98.0% in Pp and 85,6 in Ppa ANOVA $p < 0.05$. Ppa inhibited paw edema in 50% at a dose of 100mg/kg Pp and Ppa. ANOVA $p < 0.05$) therefore the nonpolar extract (Pp) was chosen to go forward with the arthritis experimental model. Furthermore this data corroborates previous studies that suggest a synergistic effect of geranylgeraniol and vouacapans on the antinociceptive activity. The dichlorometanic extract (Pp) was tested using 30, 100 and 300 mg/kg oral doses during 14 days treatment. The results indicated that Pp protected rats against CFA induced arthritis by decreasing paw volume (30% compared to control group ANOVA $p > 0,05$) and increasing nociceptive threshold (42,84% compared to control group ANOVA $p > 0,005$). The extract showed no toxic effect against liver and kidneys demonstrating immunosuppressive effect by reducing significant dose-dependent lymphocytes. The present investigation, suggest that Pp extract has an anti-arthritic activity. Moreover sub-acute treatment did not cause significant changes in biochemical parameters. However further studies are still required to assess the possible immunosuppressive action of this extract

Keywords: *Pterodon pubescens* Benth.; aqueous extract; stability

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 – Fitoterapia: Aspectos gerais	1
1.2 - Pterodon pubescens Benth. (sucupira)	3
1.3 - Artrite Reumatoide	7
1.3.1 - Dor e Artrite Reumatoide.....	10
1.4 - Estabilidade dos fitoterápicos.....	13
1.4.1 - Microencapsulação	15
2 – OBJETIVOS	21
2.1 – Objetivos Gerais	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 – MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 - Seleção do material vegetal e preparo dos extratos	22
3.2 – Avaliação da atividade farmacológica	24
3.3 – Avaliação da estabilidade do extrato aquoso livre e microencapsulado	29
3.4 - Análise Estatística	31
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5 - CONCLUSÃO	59
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
8 – ANEXOS	72
8.1 - ANEXO 1 – Autorização de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético	72
8.2 – ANEXO 2- Declaração da Comissão de Ética no uso de Animais CEUA/UNICAMP	73

Dedico esta dissertação aos meus exemplos de vida, meu pai Luiz Antônio Grando e a minha mãe Isabel Báu Grando que sempre me estimularam a dar este grande passo e seguir meus sonhos. Estas duas pessoas com muita sabedoria, discernimento, dedicação e amor estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigado por serem meus pais, profissionais corretos, competentes e pessoas adoráveis, fonte de inspiração, apoio e ensino diário. Amo vocês!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A minha esposa,

Carolina Ribeiro Camerin Grandó

Que me apoiou e incentivou desde o início dessa caminhada. Carol, obrigado por fazer parte da minha vida, por ser uma esposa fantástica, uma profissional exemplar e uma companheira pra todas as horas. Amo você!

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Biociência e Tecnologia de Produtos Bioativos do Instituto de Biologia da Unicamp

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo suporte financeiro.

Ao CNPq e CAPES

A minha orientadora e amiga Prfa Dra Mary Ann Foglio, ela ama o que faz e transmite isto aos seus alunos, está sempre preocupada em dar o melhor de sí no seu trabalho e em contribuir para o crescimento das outras pessoas. Eu sempre admirei muito seu modo de trabalhar e, principalmente, de ensinar. Agradeço pela amizade, conselhos, confiança depositada em meu trabalho, por todo empenho, sabedoria, compreensão e, acima de tudo, exigência.

Ao meu Co-orientador informal e padrinho Humberto Spindola, por toda a dedicação, transmitindo-me os melhores ensinamentos, com paciência, atenção e confiança.

Ao amigo Prof. Dr. Rodney, sempre contaminando o ambiente com sua alegria e brincadeiras, obrigado ensinamentos e ajudar durante esse estudo.

Ao Prof. Dr João Ernesto e Profa Dra *Ana Lúcia*, pela muito obrigado pelos ensinamentos e disponibilidade de seu laboratório para realização dos modelos *in vivo*.

A querida amiga Ilza, pela dedicação, amizade e paciência que em todos os momentos me ajudou com grande empenho.

As queridas amigas Leila, Núbia e Natasha pela amizade, risadas e ajuda incondicional. Com certeza vocês deixaram o trabalho muito mais fácil.

Aos queridos amigos, Michelle, Fabricio, Ademir (Juninho) e Gabriela muito obrigados pela amizade, oportunidades e ensinamentos.

As queridas amigas Karin, Vanessa que participaram diretamente desse trabalho muito obrigado por tudo.

Aos amigos da divisão de Fitoquímica, Dra Camen, Patrícia, Felipe, Verônica, Leilane, Leila, Fernando, Ícaro e Arthur, pelos dias que compartilhamos juntos e pela amizade.

Aos amigos da divisão de Farmacologia, Sica, Ana P, Giovana F, Giovana L, Paula M, Paula, Adriana, Larissa, Débora, Fabiana, Rafael pelos dias que compartilhamos juntos e pela amizade

A todos os funcionários do CPQBA em especial ao Ricardo e ao Célio

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

Aos meus irmãos Kleber e Junior. Exemplos de dedicação, conselheiros de todas as horas. Muito obrigado pelas risadas, apoio e orientações. Meus melhores amigos, sei que sempre vou poder contar com eles, assim como eles sabem que podem contar comigo, Amo vocês.

Aos meus sobrinhos Ana Paula, Luiz Fernando e Maria Laura, os amados do tio coruja. As brincadeiras, sorrisos, abraços deixaram essa caminhada muito mais tranquila.

As minhas cunhadas Adriana, Roberta e Gabriela, elas são as irmãs que eu não tive, amigas queridas. Muito obrigado pelo apoio durante esse período.

Aos meus sogros Alvimar e Ana meus “pais postiços” muito obrigados pelo carinho e apoio.

Aos meus queridos avós paternos (*in memoriam*) vô Aléssio, Vó Florinda & Dona Kita e avós maternos (*in memoriam*) Vô Avelino (Vô Lino) e Vó Palmira. Eu sei que aonde ser que estejam sempre estarão me guiando pelo melhor caminho. Saudades!

A Luciane Cruz Lopes, Patrícia, Marcos e Rafael: meu primeiro grupo de pesquisa. Com esse grupo tive muitas lições que aplico em minha vida até hoje. Profa Luciane, você tinha razão, uma vez na pesquisa, sempre na pesquisa, muito obrigado por me apresentar esse mundo!. Patrícia, Marcos e Rafael muito obrigado meus amigos parte dessa conquista começou ai com vocês.

Aos amigos de todos os momentos Stênio, André, Cristiano, Bruno, Denis, Weliton, Luiz Rodrigo, Luiz Murilo, Daniela Santos, Otávio, João Carlos, Joao Paulo pela amizade e apoio incondicional.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, tornaram esse trabalho agradável e ajudaram com a minha formação pessoal e profissional.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Fotografia da árvore e frutos da espécie <i>Pterodon pubescens</i> Benth.	3
Figura 2-	Estrutura química do composto ácido $6\alpha,7\beta$ -dihidroxivouacapano- 17β -óico.	4
Figura 3	Estrutura química do composto vouacapano- 6α , 7β , 14β , 19 -tetraol.	5
Figura 4	Estrutura química do composto 6α -hidroxivouacapano- $7\beta,17\beta$ -lactona.	6
Figura 5	Estrutura química do composto geranilgeraniol	6
Figura 6:	Desencadeamento da lesão articular causada na artrite reumatoide	10
Figura 7:	Estrutura química dos Compostos marcadores: geranilgeraniol (m/z 288), éster $6\alpha,7\beta$ -dihidroxivouacapano- 17β oato de metila (m/z 362) éster 6α -hidroxi- 7β -acetoxi-vouacapano- 17β -oato de metila (m/z 404 – A) e acetoxi- 7β -hidroxi-vouacapano- 17β -oato de metila (m/z 404 – B),	33
Figura 8	Cromatogramas normalizados, obtidos por CG/EM, do óleo das frutos oriundas dos acessos de São Carlos-SP (A), Sorriso-MT (B) e Ponto Chique – MG (C).	33
Figura 9:	Variação do teor dos compostos marcadores presentes no óleo dos frutos de <i>Pterodon pubescens</i> Benth oriundas de diferentes acessos	34
Figura 10:	Cromatogramas normalizados, obtidos por CG/EM (HP6890/HP5975), do extrato aquoso (A) e diclorometano (B).	35
Figura 11:	Influência do tratamento agudo oral com extrato diclorometano (Pp) e aquoso PPa de <i>P. pubescens</i> na locomoção de camundongos Swiss	37
Figura 12:	Gráfico demonstrando os resultados do modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos previamente tratados com o extrato aquoso (Ppa) ou diclorometano (Pp) dos frutos de <i>P. pubescens</i> .	38
Figura 13:	Gráfico demonstrando os resultados da Fase I no modelo de lambadura de pata induzido por formalina em camundongos previamente tratados com o extrato aquoso (Ppa - A) ou diclorometano (Pp - B) dos frutos de <i>P. pubescens</i> .	39
Figura 14:	Gráfico demonstrando os resultados da Fase II no modelo de lambadura de pata induzido por formalina em camundongos previamente tratados com o extrato aquoso (Ppa - A) ou diclorometano (Pp - B) dos frutos de <i>P. pubescens</i> .	40
Figura 15:	Efeito do pré-tratamento com o extrato diclorometano (A - Pp) extrato aquoso (B - Ppa) de <i>P. pubescens</i> no modelo de edema de pata induzido por carragenina.	42
Figura 16:	Efeito do pré-tratamento com o extrato diclorometano (Pp) extrato aquoso (Ppa) de <i>P. pubescens</i> Benth no modelo de hiperalgesia de pata induzido por carragenina.	43

Figura 17:	Diterpenóides cíclicos isolados das espécies <i>Acanthopanax koreanum</i> (Acido acantoíco) da <i>Tripterygium wilfordii</i> (Triptolideo) e <i>Pterodon pubescens</i> (Vouacapano)	44
Figura 18:	Efeito do tratamento com o extrato diclorometano (Pp) de <i>P. pubescens</i> no índice de artrite induzido pela injeção de CFA em ratas.	46
Figura 19:	Efeito do tratamento com o extrato diclorometano (Pp) de <i>P. pubescens</i> Benth no índice de alodinia induzida pela injeção de CFA em ratos.	46
Figura 20:	Peso relativo do rim (A) e fígado (B) de ratos com artrite reumatoide após tratamento de 14 dias com o extrato diclorometano de <i>P. pubescens</i> .	47
Figura 21:	Comparação do extrato bruto aquoso de <i>Pterodon pubescens</i> Benth livre após estudo de estabilidade acelerada	50
Figura 22:	Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do extrato aquoso de <i>Pterodon pubescens</i> Benth submetido a estudo de estabilidade acelerada.	50
Figura 23:	Comparação do teor do composto vouacapanos m/z 362 – A e a mistura dos isômeros m/z 404. presentes no extrato aquoso de <i>Pterodon pubescens</i> após o estudo de estabilidade acelerada	51
Figura 24:	Cromatogramas normalizados, obtidos por CG/EM, do extrato aquoso submetido ao estudo de estabilidade.	52
Figura 25:	Gráfico demonstrando os resultados da avaliação da atividade antinociceptiva do extrato aquoso após estudo de estabilidade.	53
Figura 26:	Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das micropartículas oriundas do extrato aquoso de <i>Pterodon pubescens</i> Benth.	54
Figura 27:	Cromatogramas, obtidos por CG/EM, da fase interna (recheio - A) e externa (B) de microcápsulas oriundas do extrato aquoso de <i>P. pubescens</i> .	54
Figura 28:	Comparação do aspecto das microcapsulas oriundas o extrato bruto aquoso de <i>Benth. pubescens</i> Benth. após estudo de estabilidade acelerada.	55
Figura 29:	Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das micropartículas oriundas do extrato aquoso de <i>Pterodon pubescens</i> Benth.	56
Figura 30:	Comparação do teor do composto vouacapanos m/z 362 – A e a mistura dos isômeros m/z 404. presentes nas micropartículas do extrato aquoso de <i>Pterodon pubescens</i> após o estudo de estabilidade acelerada.	57
Figura 31:	Gráfico demonstrando os resultados da avaliação da atividade antinociceptiva das micropartículas do extrato aquoso após submetido ao estudo de estabilidade.	58

INDICE DE TABELA

Tabela 1:	Rendimento (m/m) dos processos de extração por Refluxo, Soxhlet e Decocção para produção do extrato aquoso de frutos de <i>Pterodon pubescens</i> Benth originadas de Minas Gerais	35
Tabela 2:	Teor dos compostos marcadores, geranilgeraniol (m/z 288), éster $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapano- 17β oato de metila (m/z 362) e os isômeros éster 6α -hidroxi- 7β -acetoxi-vouacapano- 17β -oato de metila (m/z 404 A) e éster 6α -acetoxi- 7β -hidroxi-vouacapano- 17β -oato de metila (m/z 404 B), no extrato aquoso e diclorometânico da espécie <i>Pterodon pubescens</i> Benth.	36
Tabela 3:	Influencia de 14 dias de tratamento com o Pp nos níveis sanguíneos de ureia, creatinina, ácido úrico. em ratos com artrite reumatoide.	48
Tabela 4:	Influencia de 14 dias de tratamento com o Pp nos níveis sanguíneos TGO, TGP e ALP em ratos com artrite reumatoide.	48
Tabela 5:	Avaliação do pH e umidade do extrato aquoso de <i>P. pubescens</i> após estudo de estabilidade acelerada (armazenamento 40°C e 75% de UR) T0: tempo inicial; T90: 90dias de armazenamento; T180: 180 dias de armazenamento	50
Tabela 6:	Avaliação do pH e umidade das micropartículas oriundas do extrato aquoso de <i>P. pubescens</i> após estudo de estabilidade acelerada.	55

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – Fitoterapia: Aspectos gerais

O uso de plantas medicinais é uma prática comum na medicina popular, correspondendo a mais antiga ferramenta empregada pelo homem no tratamento de enfermidades de todos os tipos. O homem primitivo sempre buscou na natureza as soluções para diversos males, fossem esses de ordem espiritual ou física. Aos feiticeiros da idade média, considerados intermediários entre os homens e os deuses, cabiam a tarefa de curar os doentes, unindo-se, desse modo, magia e religião ao saber empírico das práticas de saúde, a exemplo do emprego de plantas medicinais (Oliveira & Araújo, 2007; Souza, Mello & Lopes 2012).

O uso das plantas medicinais baseia-se, principalmente, na sabedoria popular e esse conhecimento vem sendo transferido de geração para geração tendo sido uma fonte de agentes medicinais por milhares de anos. Um número impressionante de substâncias ativas tem sido isolado a partir de fontes naturais. Segundo a última revisão publicada por Newman & Cragg (2013) estima-se que aproximadamente 75% de todos os fármacos comercializados são, diretamente ou indiretamente, derivados de produtos naturais.

A literatura descreve benefícios de medicamentos fitoterápicos que não são observados nos compostos isolados da própria espécie vegetal ou nos produtos sintéticos (Wagner, 2006; Heinrich *et al.*, 2007; Wagner, 2011). Acredita-se que essas vantagens terapêuticas encontradas em medicamentos fitoterápicos sejam decorrentes de interações sinérgicas que potencializam os seus efeitos farmacológicos, muitas vezes com a redução de seus efeitos colaterais (Calixto, 2001; Hildebert, 2011). Estudo realizado por Netteranon *et al.*, (2011), sugeriu que a combinação dos compostos escopoletina e quercetina isolados do extrato de acetato de etila dos frutos de *Morinda citrifolia* aumentava a eficiência anti-inflamatória e anti-carcinogênica *in vitro* dessa espécie, devido a redução da expressão do gene da hinos e COX-2. No estudo realizado por Oliveira *et al.*, (2011) demonstraram que a possível atividade anti-inflamatória do extrato etanólico da espécie *Lychnophora passerina* poderia ser atribuída a inibição

simultânea de citocinas, TNF- α , NO e IL-10. Outro trabalho descrito por Ferreira *et al.*, (2010) relatou que flavonoides presentes no extrato alcoólico de *Artemisia annua* L. poderiam interagir com as enzimas do citocromo P450 (CYP450), alterando a metabolização da artemisinina e conseqüentemente prolongando seu tempo de meia vida.

As plantas medicinais podem desencadear reações adversas pelos seus próprios constituintes, devido a interações com outros medicamentos ou alimentos, ou ainda relacionados a características do usuário como idade, sexo e condições fisiológicas. Como exemplo podemos citar o estudo realizado por Vieira & Huang (2012), que demonstraram que o uso de extrato de *Ginkgo biloba* alterou a concentração plasmática máxima (C_{max}) e a curva de biodisponibilidade do anti-hipertensivo talinolol. Estudos realizados por Simões *et al.* (2008) demonstraram que o extrato de Ginkgo pode potencializar o efeito do anticoagulante oral warfarina aumentando o risco de hemorragias. Considerando que fármacos anti-hipertensivos e anticoagulantes são amplamente utilizados por pessoas idosas, essas interações com medicamentos fitoterápicos poderão produzir efeitos maléficos aos pacientes.

Existe uma predisposição cultural para o uso de plantas medicinais ou medicamentos fitoterápicos que é associada ao fácil acesso, falta de conhecimento de interações medicamentosas, risco de contaminação e/ou adulteração do material, uso diferente da forma tradicional, falta de regulamentação e controle na sua comercialização, são fatores de risco que podem ocasionar reações adversas decorrentes ao seu uso (Silveira, Barreira & Arrais 2008; Simões *et al.*, 2008; Balbino & Dias, 2010; Vieira & Huang 2012; Toccafondo & Huand, 2012).

A fim de minimizar problemas referentes a utilização indiscriminada de produtos naturais a ANVISA através da Resolução RDC nº 14, 2010 estabeleceu critérios, baseados em evidências científicas consistentes, para o registros de medicamentos fitoterápicos com o intuito de assegurar a eficácia, segurança e qualidade dos mesmos (Brasil, 2010).

Desde o ano 2000, observa-se um grande avanço científico envolvendo estudos químicos e farmacológicos que visam comprovar a eficácia, segurança e qualidade de preparações a base de plantas medicinais, observado pelo crescimento exponencial de periódicos nacionais e internacionais sobre esse tema. Um exemplo disso são os estudos da atividade farmacológica da espécie *Pterodon pubescens* Benth. que, segundo relatos populares, é utilizada no tratamento de artrite reumatoide, dores de garganta, problemas da coluna, como tônico e depurativo (Denny, 2002; Carvalho, 2004, Spindola, 2006; Spindola *et al.*, 2009, Spindola, 2010, Spindola *et al.*, 2011, Servat *et al.*, 2012).

1.2 - *Pterodon pubescens* Benth. (sucupira)

O gênero *Pterodon* compreende quatro espécies nativas do Brasil: *P. abruptus* Benth., *P. apparucuri* Pedersoli, *P. pubescens* Benth, (sinonímia botânica – *P. emarginatus* Vog,) e *P. polygalaeiflorus* Benth. A espécie *Pterodon pubescens* Benth., é uma árvore da família das Leguminosae-Papillonoideae, conhecida popularmente como faveiro, sucupira-branca, fava-de-sucupira, sucupira ou sucupira-lisa, e pode ser encontrada principalmente no cerrado dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Mato Grosso do Sul. Esta espécie atinge de 8-16 metros, com tronco de 30-40 centímetros de diâmetro; possui folhas pinadas, com 20-36 folíolos de 3-4 centímetros de diâmetro. Floresce entre os meses de abril e maio, apresentando frutos entre o período de maio e junho (Figura 1). Segundo dados etnofarmacológicos, o decocto dessa espécie é indicado para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas (Carvalho *et al*, 2004)

Figura 1: Fotografia da árvore e frutos da espécie *Pterodon pubescens* Benth.

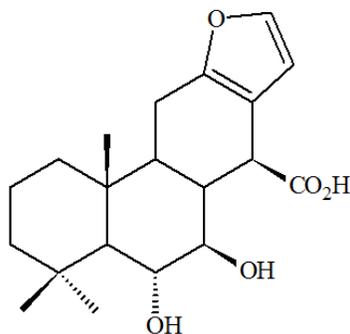


Fonte: Servat, 2010

Estudos não-clínicos demonstraram atividade do extrato hidroalcoólico dos frutos de *P. pubescens* em modelo de artrite experimental e a ausência de toxicidade subaguda (Coelho *et al.* 2001). Alguns autores têm sugerido que compostos que tenham em sua estrutura básica o esqueleto vouacapânico estejam envolvidos com as propriedades anti-inflamatórias do óleo fixo dos frutos de *P. pubescens* (Nunan *et al.*, 1982; Carvalho *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004, Spindola *et.al*, 2011).

Silva *et al.* (2004) identificaram o composto ácido 6 α ,7 β -dihidroxiyouacapano-17 β -óico (Figura 2) na fração que exibiu atividade anti-edematogênica nos modelos de edema de pata induzido por carragenina em ratos e edema de orelha induzido por óleo de cróton, em camundongos, sugerindo o envolvimento desse composto na atividade anti-inflamatória das frações obtidas do óleo das sementes de *P. pubescens*.

Figura 2- Estrutura química do composto ácido 6 α ,7 β -dihidroxiyouacapano-17 β -óico.



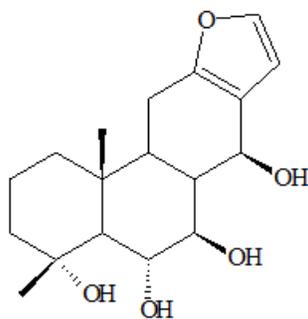
Duarte *et al.* (1996) demonstraram o efeito antinociceptivo de vouacapanos extraídos de *P. polygalaeflorus*, sugerindo que a atividade farmacológica era desencadeada pelo sistema catecolaminérgico. O envolvimento de mecanismos inibitórios tanto centrais como periféricos na atividade antinociceptiva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

Ainda com relação a atividade antinociceptiva, Dutra *et al.* (2008) relataram que o óleo essencial, frações hexânicas e butanólicas dos frutos de *P. emarginatus* foram ativas no modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético. As amostras de óleo essencial e fração metanólica mostraram-se

efetivos em ambas as fases do modelo da formalina, enquanto a fração hexânica apresentou efeito no teste da placa quente.

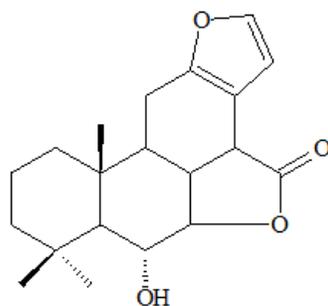
A atividade anti-proliferativa do extrato bruto etanólico das sementes de *P. pubescens* contra uma linhagem de melanoma humano, foi demonstrada por Vieira *et al.* (2008). O diterpeno vouacapano-6 α , 7 β , 14 β , 19-tetraol (Figura 3), isolado do extrato bruto, demonstrou acentuada atividade citotóxica, sugerindo ser um promissor agente anti-proliferativo por induzir apoptose.

Figura 3 - Estrutura química do composto vouacapano-6 α , 7 β , 14 β , 19-tetraol.



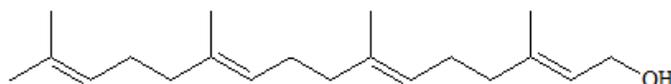
Spindola *et al.* (2009) relataram a atividade anti-proliferativa de vouacapanos isolados do extrato diclorometano dos frutos de *P. pubescens*, indicando a seletividade desses compostos para linhagem de próstata testada. Paralelamente, Euzébio *et al.* (2009) demonstraram a atividade anti-proliferativa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

Figura 4- Estrutura química do composto 6 α -hidroxivouacapano-7 β ,17 β -lactona.



Calixto *et al.* (2007) demonstraram a atividade antiplaquetária do composto geranilgeraniol (Figura 5) isolado do óleo dos frutos de *P. pubescens*, ação essa atribuída a inibição da enzima ciclooxigenase.

Figura 5- Estrutura química do composto geranilgeraniol.



Menna-Barreto *et al.* (2008) relataram a atividade contra *Trypanosoma cruzi* de frações e do composto geranilgeraniol obtidos do extrato etanólico de *P. pubescens*. No mesmo ano, Cardoso *et al.* (2008), demonstraram a atividade supressora, *in vitro*, de linfócitos T e B, relacionada à atividade anti-inflamatória do extrato etanólico dessa espécie. Essa atividade também foi observada no estudo realizado por Velozo *et al.* (2013) que verificaram que o óleo essencial da espécie *P. Polygalaeflorus* também modulou a inflamação aguda e a ativação dos linfócitos B e T.

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

O efeito antimicrobiano do óleo essencial obtido das sementes de *P. emarginatus* frente a *Staphylococcus aureus* e a atividade das frações hexânica e

butanólica contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foi relatada por Dutra *et al.* (2009b).

Pereira *et al.* (2011) determinou que a fração terpênica da espécie *P. pubescens* induziu a apoptose de linhagens de leucemia K562. Pereira *et al.* (2012) sugeriram que a ação antileucêmica da fração terpênica de *Pterodon pubescens* Benth estaria ligada a inibição da ERKS, NF-Kappa B e vias de sinalização c-myc reduzindo a expressão do RNAm interrompendo o ciclo celular na fase G1. Moraes *et al.* (2012) confirmou que os triterpenos estavam envolvidos no efeito anti-inflamatório do extrato etanólico das sementes da espécie *Pterodon emarginatus* Vogel.

Alves *et al.*, 2013, verificaram que frutos de *P. pubescens* coletados em cinco cidades do cerrado brasileiro apresentaram varialidade química no óleo essencial dessa espécie, as análises de agrupamento (*cluster analysis*) dividiram os acessos em dois grupos sendo que um grupo apresentava-se rico em β -cariofileno e δ -elemeno enquanto o outro apresentava-se rico em α -copaeno, β -cubebeno, allo-aromadendrene, α -cubebeno and γ -muuruleno.

Vista a variabilidade química da espécie *P. pubescens* Cabral *et al.* (2013) verificaram que a análise de *Fingerprinting* vias espectrometria de massas mostrou-se útil para o controle de qualidade do óleo de fixo dessa espécie sendo possível identificar 12 vouacapanos característicos da espécie.

1.3 - Artrite Reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune inflamatória sistêmica caracterizada pelo comprometimento da membrana sinovial das articulações periféricas. A prevalência da AR é estimada em 0,5 % -1,0 % da população, com predomínio em mulheres e maior incidência na faixa etária de 30-50 anos (Mota *et al.*, 2010; Usnayo *et al.*, 2011; Barnabe *et al.*, 2012).

A característica principal da AR é o acometimento simétrico das pequenas e das grandes articulações, com maior frequência de envolvimento das mãos e dos pés. O caráter crônico e destrutivo da doença pode levar a importante limitação

funcional, com perda de capacidade laboral e de qualidade de vida (Mota *et al.*, 2012).

O desenvolvimento da AR é influenciado por fatores hormonais, ambientais e imunológicos, que atuam em conjunto sobre indivíduos geneticamente suscetíveis. O fator genético contribui com cerca de 60% da suscetibilidade para AR. Embora o papel da hereditariedade não esteja completamente compreendido, o fator de risco predominante, responsável por 30% a 50% do componente genético, parece estar ligado aos antígenos leucocitários humanos (HLA, do inglês, *human leukocyte antigen*). Estudos indicam a presença dos alelos HLA-DRB1 (alelos que contem em comum o aminoácido QKRAA modificado) como a principal associação genética relacionada ao desenvolvimento das formas mais graves da doença (Scott *et al.*, 2010; Goeldner *et al.*, 2011; Usnayo *et al.*, 2011; McInnes & Scheet 2011). Dentre as causas etiológicas dessa doença é demonstrado que fumar ou outras formas de estresse pulmonar (por exemplo, exposição a sílica) aumenta o risco do desenvolvimento da artrite reumatoide em pessoas que possuam esses alelos. Acredita-se que o estresse pulmonar pode promover modificações pós-transcricionais que alteram o mecanismo de tolerância para a produção de auto-anticorpos e leucócitos (linfócitos B e T, células dendríticas. - McInnes & Scheet 2011).

O HLA localiza-se no complexo principal de histocompatibilidade (MHC), presentes nas células apresentadoras de antígeno (APC - exemplo células dendríticas). Acredita-se ele esteja envolvido na patogênese da AR, por servir de local de ligação no processo de apresentação de peptídeos artritogênicos para os linfócitos T CD4+ envolvidos na resposta imunoinflamatória dessa doença (Usnayo *et al.*, 2011).

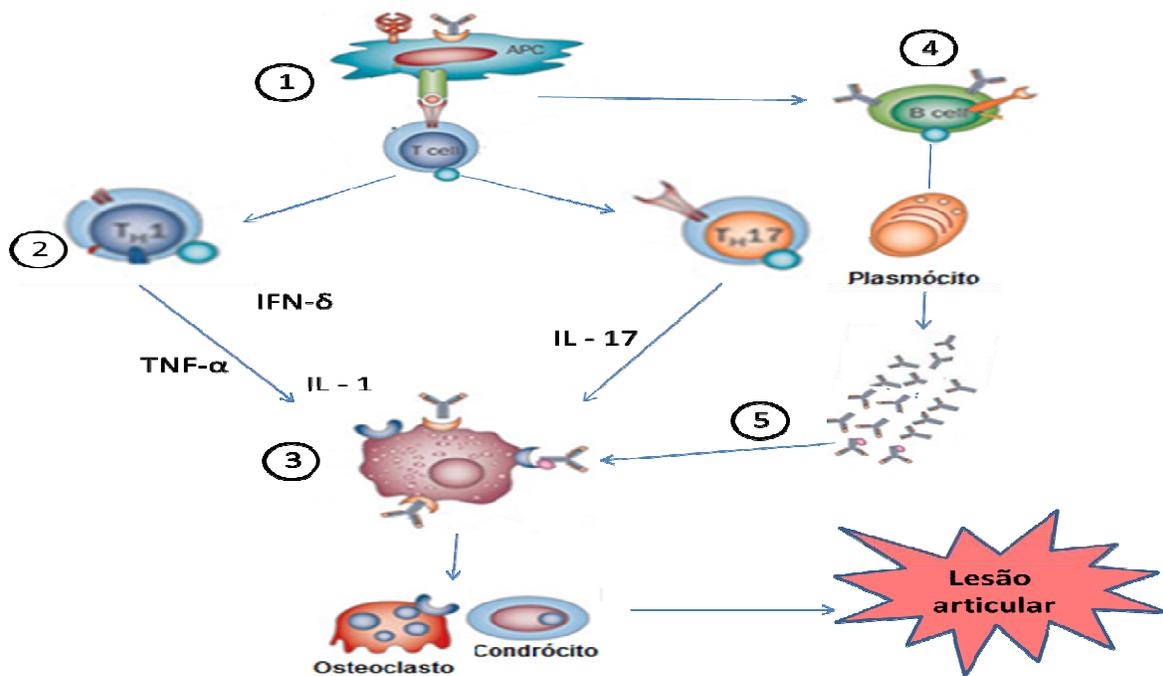
A resposta do linfócito T auxiliar, tipo Th1, gera a produção de interferon-gama (IFN-gama) que estimula a liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina 1 e metaloproteinases pelos macrófagos e fibroblastos sinoviais. Estudos demonstram a participação de linfócitos T auxiliares, tipo Th17, produtores de IL-17 no desenvolvimento da artrite. Essa interleucina age

sinergicamente com o $TNF\alpha$ promovendo a ativação de fibroblastos e condrócitos (McInnes & Schett, 2011; Nanjundaiah *et al.*, 2013 – Figura 6).

O evento inicial da doença é o processo inflamatório iniciado na membrana sinovial com infiltrado de linfócitos e macrófagos. A hiperplasia das células sinoviais, o infiltrado linfocítico e a neoangiogênese levam a formação de um tecido proliferativo e localmente invasivo conhecido como *pannus*, que atinge o osso subcondral e, em seguida, a cartilagem articular com destruição progressiva. A produção de citocinas, com balanço predominante para as citocinas pró-inflamatórias, tem papel fundamental na iniciação e perpetuação da inflamação crônica na membrana sinovial (Oliveira, 2011; Meeus *et al.*, 2012).

O estímulo do antígeno pode levar ao aparecimento imunoglobulina G (IgG) anormal, resultando na produção de auto-anticorpos, por sua vez a IgG anormal estimulará o sistema imune adaptativo a produzir imunoglobulinas anti-IgG (fatores reumatoides). Este ao se complexar com o IgG pode ativar o sistema complemento e resultar na liberação de mediadores inflamatórios e fatores quimiotáticos. A interação imunológica dessas células resulta no direcionamento de células do processo inflamatório na articulação, essas vão produzir proteinases e colagenases que lesarão a cartilagem e estruturas de sustentação articulares (Sack & Fye, 2000; Willians, 2000 ; Olsen & Stein, 2004).

Figura 6: Desencadeamento da lesão articular causada na artrite reumatoide



Legenda: 1: Apresentação do antígeno pelas células apresentadoras de antígeno (APC) para os linfócitos T (T cell); 2: Diferenciação dos linfócitos T para linfócitos T auxiliares tipo 1 e tipo 17 que liberam IFN-δ, TNF-α, IL-1 e IL-17; 3: Os mediadores inflamatórios liberados vão recrutar macrófagos que por sua vez recrutará osteoclastos e condrócitos que levaram a lesão articular; 4: Estimulação da produção de fatores reumatóides decorrente a produção anormal de anticorpos; 5: Os imunocomplexos (anticorpo anormal complexado com o fator reumatóide) recrutará macrófagos levando a lesão articular.

Fonte: Adaptado de McInnes & Schett, 2011

1.3.1 - Dor e Artrite Reumatoide

De acordo com Rang *et al.* (2004) a dor é uma experiência subjetiva de difícil definição. Tipicamente é dita como uma resposta direta a um evento desfavorável, associado a um dano tecidual como lesão, inflamação ou câncer. Ela normalmente serve como um artifício de aviso, ou seja, um sistema de alarme responsável pela manutenção da integridade do organismo.

Esse sistema de alarme pode ser dividido em quatro amplas etapas: a nocicepção, a percepção da dor, o sofrimento e o comportamento da dor, que podem existir independentemente da existência de um dano tecidual. A *nocicepção* é a detecção do dano tecidual pelas fibras Aδ e C. A *percepção* da dor é frequentemente disparada por um estímulo nocivo, como um ferimento ou doença. O *sofrimento* é a resposta negativa induzida pela dor, mas também pode

ser desencadeado por outros fatores como medo, ansiedade e estresse. Já o *comportamento da dor* é um resultado da nocicepção e do sofrimento; são as atitudes que o indivíduo têm ou deixa de ter e que pode ser atribuída à presença do tecido danificado. Testes em animais não avaliam a dor do animal e sim a nocicepção e o comportamento doloroso que o animal possa vir a ter. (Loeser & Melzack, 1999).

O sistema nociceptivo, por sua vez, pode ser dividido em quatro etapas, transdução, transmissão, modulação e percepção da dor. A *transdução* é decorrente da despolarização de nociceptores presentes nas Fibras Aferentes Primárias (FAPs) C e A δ . A destruição do tecido pode ativar os nociceptores, através da liberação de diversos mediadores, como por exemplo, o glutamato e outros aminoácidos excitatórios (AAEs), neuropeptídeos, como a substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), o trifosfato de adenosina (ATP), o óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGs) e neurofinas (fatores de crescimento. - Millan, 2002). A Transmissão é caracterizada pelo trajeto ascendente que retransmite a informação nociceptiva para estruturas talâmicas, límbicas e corticais, responsáveis pelas respostas afetivas e sensorial-discriminativas da dor (Carr & Goudas, 1999). Seguindo a transmissão do impulso da pele até o Sistema Nervoso Central através das FAPs, observa-se a importante participação da medula espinhal. No corno dorsal, o estímulo nociceptivo estimula diretamente os neurônios de projeção (NPs), ou indiretamente via interneurônios excitatórios (INEs). Além disso, as FAPs também podem ser moduladas por interneurônios inibitórios (INIs), que irão interagir com os NPs, INEs ou nos próprios terminais das FAPs, modulando de excitatória ou inibitória o estímulo nociceptivo (Castro, 2000; Millan, 2002).

Já a etapa de modulação tem um importante papel no controle da transmissão nociceptiva, entre as áreas centrais já estudadas e bem caracterizadas encontra-se o hipotálamo, o núcleo parabraquial, o núcleo do trato solitário, a medula rostroventromedial, o núcleo dorso reticular da medula, substância cinzenta periaquedutal (PAG) e o córtex cerebral (Millan, 2002). Os neurônios projetados destas áreas (Via Descendente Inibitória – VDI ou Via

Descendente Facilitatória – VDF) contêm os transmissores responsáveis pelo controle descendente da dor e entre eles estão a noradrenalina (NOR), serotonina (5-HT), acetilcolina (Ach), ácido gama amino butírico (GABA), dopamina (DA), encefalina (ENC), dinorfina (DIN), endomorfina (EM), adenosina. Neste contexto, é importante salientar que a NOR e a 5-HT são os transmissores das VDIs mais amplamente estudados, e são considerados os seus principais neurotransmissores inibitórios (Millan, 2002). Estas substâncias moduladoras da resposta nociceptiva poderão, por vezes, atuar como pró-nociceptivas (controle descendente facilitatório) ou antinociceptivas (controle descendente inibitório), dependendo de diversos fatores, tais como o tipo e intensidade do estímulo, região central ativada pelo estímulo, tipo de receptor ativado, entre outros (Millan, 2002).

A dor é um dos principais sintomas que comprometem a qualidade de vida de indivíduos que desenvolvem artrite reumatoide, sendo uma importante ferramenta para avaliação da eficácia da terapêutica aplicada. A artrite é caracterizada por acarretar dor espontânea, hiperalgesia ou alodinia (Meeus *et al.*, 2012). O desencadeamento de uma resposta inflamatória local será sustentado por múltiplos mediadores que sensibilizam os nociceptores funcionais ou ativam aqueles que estão latentes (“nociceptores silenciosos”). No local da lesão, os mediadores inflamatórios (monoaminas, citocinas, prostanóides, peptídeos), neurotransmissores e fatores de crescimento estimulam os nociceptores sensibilizados. Este conjunto de fatores resulta em mudanças nos limiares de ativação dos nociceptores e mecanocceptores, facilitando então, o desencadeamento de uma resposta nociceptiva (Appleton, 1997; Carr & Goudas, 1999). Os nociceptores da articulação estão localizados na capsula articular, ligamento e próximo aos vasos. Em articulações normais esses nociceptores somente são excitados após movimentos articulares extremos. Já em artrites induzidas experimentalmente, os nociceptores são excitados no limite de amplitude de movimento articular (Oliveira, 2011; Meeus *et al.*, 2012).

1.3.2 - Tratamento da artrite reumatoide

Segundo o Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia o tratamento da artrite reumatoide é dividido na terapia medicamentosa, fisioterapia, apoio psicossocial, terapia ocupacional e abordagens cirúrgicas (Mota *et al.*, 2012).

As terapias medicamentosas incluem uso de fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e/ou corticoides, a fim de minimizar a inflamação e a dor, associados com fármacos modificadores do curso da doença (DMCD), que agem inibindo mediadores inflamatórios, como as interleucinas e TNF α , reduzindo assim a quimiotaxia das células inflamatórias para as articulações. O principal objetivo do tratamento medicamentoso é reduzir a inflamação, evitar ou reduzir os danos nas articulações com intuito de melhorar a qualidade de vida do paciente.

Entretanto, os efeitos adversos e o alto custo da terapia convencional tem estimulado pacientes portadores da artrite reumatoide a buscar terapias alternativas para substituir esses medicamentos. Uma pesquisa realizada por Venkatesha *et al.* em 2011, relatou que mais de 36% da população norte americana utilizou algum tipo de tratamento alternativo para algum tipo de dano. No entanto, apesar da crescente popularidade do tratamento com plantas medicinais, há pouca informação sobre toxicidade, eficácia e qualidade são as grandes limitações para sua aplicação na terapia, sendo necessários estudos que comprovem esses parâmetros. Isso motivou nosso grupo de pesquisas a iniciar estudos com a espécie *Pterodon pubescens* Benth.

1.4 - Estabilidade dos fitoterápicos

Os estudos e a crescente utilização dos fitoterápicos despertaram em todo o mundo uma preocupação com a sua eficácia, pois além da influência do cultivo, o processamento inadequado das plantas pode ocasionar destruição das moléculas, implicando na perda da atividade farmacológica. Como exemplo, pode-se citar o uso do aquecimento excessivo na secagem da planta ou no processo de evaporação do solvente empregado na extração dos princípios ativos. A vida útil do extrato também fica limitada pela exposição ao oxigênio, umidade e

luminosidade (Gil,2010). Estudos recentes com o extrato bruto diclorometano de *P. pubescens* demonstraram que a exposição prolongada a temperatura e umidade alteraram suas características físicas, impossibilitando sua manipulação (Servat *et al.*, 2012). Entre as alternativas que podem ser utilizadas para preservar as características do material vegetal, destaca-se a encapsulação em lipossomas, microemulsões, micro e nano partículas poliméricas que, além de prolongarem o tempo de estocagem de produtos alimentícios e farmacêuticos, são capazes de compartimentalizar o fármaco em ambientes restritos, de forma a direcioná-lo para regiões específicas, favorecendo sua interação com diferentes sistemas biológicos (Rodrigues, 2004; Oliveira & Petrovick, 2010; Tomaro_Duchesneau *et al.*, 2012).

A utilização de micro e nano partículas encapsulando compostos bioativos, cuja ação biológica na forma livre já é bem conhecida, tem trazido grandes benefícios para a terapêutica. A incorporação de fármacos em sistemas de liberação modifica a sua apresentação ao sistema biológico, muitas vezes aumentando a sua eficácia (Vasir *et al.*, 2003; Granada *et al.*, 2007). A encapsulação permite a preservação da atividade do bioativo, através da sua proteção contra as agressões do meio externo como luz, oxigênio e o próprio meio biológico, dependendo de sua constituição pode promover a liberação gradativa ou sustentada do composto ativo, ou ainda, ter uma afinidade elevada para um sítio específico de ação (Fang & Bhandari, 2011; Tomaro_Duchesneau *et al.*, 2012; Krishnaiah, *et al.*, 2012). Como exemplo podemos citar o estudo desenvolvido por Sousa (2013), que demonstrou que a técnica de microencapsulação diminuiu a degradação das antocianidinas presentes no extrato das folhas de *Arrabidaea chica*. Os avanços no desenvolvimento da tecnologia de encapsulação têm permitido o preparo de nano e micro partículas com propriedades físico-químicas e biológicas requeridas para uma determinada aplicação específica. Uma cápsula ou invólucro eficiente deve carrear e proteger o componente bioativo além de facilitar a sua absorção (Mehnert & Mäder, 2001; Granada *et al.*, 2007).

A seleção do método de produção das partículas deverá considerar a estabilidade e atividade biológica dos extratos padronizados, a eficiência de

encapsulação do mesmo no polímero, que deve ser a mais elevada possível, os perfis de liberação do princípio ativo deverão estar de acordo com o pretendido e o método deverá ser exequível industrialmente. Embora tenham sido desenvolvidos diversos métodos de produção de micropartículas, não há nenhum que seja totalmente eficiente, havendo sempre alguma limitação (Benita, 2006). Para alcançar um encapsulamento eficiente deve-se considerar o material formador da parede da partícula para assegurar que não ocorram perdas significativas do extrato a ser encapsulado como também impedir a entrada de materiais estranhos (impurezas) (Zhongxiang & Bhesh , 2010)

1.4.1 - Microencapsulação

Microcápsulas são pequenas partículas formadas por uma camada polimérica, podendo ser aplicáveis a sólidos, líquidos ou gases (Obeidat, 2009). Nas microcápsulas, o polímero atua como um filme protetor, isolando a substância ativa, podendo formar membranas contínuas ou porosas de diferentes tamanhos e formatos, dependendo do processo e do polímero utilizado. O encapsulado é designado como: recheio, núcleo, ingrediente ativo, fase interna ou ingrediente interno (Ré, 2000, Oliveira & Petrovick, 2010).

As cápsulas podem ser classificadas em nano (0,2 μm), micro (0,2 a 500 μm) ou macrocápsulas (500 μm), podendo ser do tipo reservatório, onde o núcleo fica concentrado próximo ao centro, rodeado por um filme contínuo, ou do tipo matriz, onde o núcleo é disperso uniformemente pela matriz (Ré, 1998).

A tecnologia de microencapsulação envolve, basicamente, o controle da difusão, a identificação de materiais de coberturas adequados e o processo de fabricação. Os diferentes tipos de polímero aplicáveis a esta técnica podem levar à produção de microcápsulas com variabilidade em suas propriedades como porosidade e tamanho, permitindo uma extensa e variada aplicação, o que é importante, tendo em vista que muitos são os tipos de recheios disponíveis (Oliveira & Petrovick, 2010).

As técnicas de microencapsulação e seus respectivos tamanhos podem ser divididas em três grupos: 1) Métodos físicos: atomização (*spray drying*-partículas

entre 5 e 500 μm), pulverização em banho térmico, leite fluidizado (100 μm), extrusão centrífuga com múltiplos orifícios (50 μm), co-cristalização e liofilização (*freeze drying*), 2) Métodos químicos: inclusão molecular e polimerização interfacial (1-500 μm) e 3) Métodos físico-químicos: coacervação (20-1000 μm), separação por fase orgânica, pulverização em agente formador de reticulação e envolvimento lipossômico (Ré, 2000; Tomaro_Duchesneau *et al.*, 2012). Dessas técnicas, a atomização será investigada no presente projeto

1.4.1.1 - Atomização

A secagem por nebulização, mais conhecida por *spray drying*, teve seus primeiros passos na metade do século 19, quando foi patenteada a primeira operação de secagem de ovos em 1865. Porém, o início de sua utilização como processo industrial data o século de 20, quando foram obtidos os primeiros produtos produzidos (leite em pó e sabão em pó) em escala industrial utilizando a técnica de secagem por nebulização. A partir de então, seu uso disseminou-se pela indústria de processos em geral, sendo hoje, especialmente aplicado para a secagem em larga escala de produtos das linhas alimentícia e farmacêutica (Moreira, 2007; Oliveira & Petrovick, 2010).

O processo de secagem e produção das micropartículas por *spray drying* consiste de três etapas fundamentais. Na primeira fase, o material a ser encapsulado fluído é disperso como gotículas, produzindo uma grande área superficial, em uma câmara de secagem a alta temperatura, devido uma corrente de ar aquecido. Na segunda, ocorre contato destas gotículas com o ar aquecido, havendo transferência de calor. Por fim, na terceira etapa acontece a evaporação do solvente e a formação das partículas sólidas (Oliveira & Petrovick, 2010).

Ao contrário do que se imagina a respeito de uma técnica que utiliza altas temperaturas, a rápida evaporação do solvente mantém a temperatura das gotículas relativamente baixa. Por isso, essa técnica pode ser aplicada sem afetar o produto final, possibilitando a secagem de produtos sensíveis ao calor, inclusive produtos biológicos e farmacêuticos como extratos e produtos oriundos de plantas, corantes, micro-organismos, produtos com leveduras, enzimas e proteínas

(Filková & Mujumdar, 1995; Ré, 2000; Rodrigues, 2004; Tomaro_Duchesneau et al., 2012).

Dentre os métodos físicos de microencapsulação, a técnica de atomização é certamente a técnica mais antiga empregada na indústria de alimentos. Segundo alguns autores, embora a técnica de *spray drying* envolva um elevado custo inicial, a mesma é amplamente utilizada por suas diversas vantagens, dentre elas, a obtenção de partículas de alta qualidade (uniformes e esféricas), a possibilidade de secar produtos à pressão atmosférica, a facilidade em relação à produção de grandes volumes em operação contínua utilizando-se equipamentos de fácil operação, com boa eficiência, a ampla aplicabilidade e flexibilidade da técnica por permitir o processamento de várias matérias primas e a rapidez. Esses fatores somados possibilitam a comercialização de um produto de excelente qualidade a um custo relativamente baixo (Wendel & Çelik 1998; Filková & Mujumdar 1995, Oliveira & Petrovick, 2010).

1.5 Justificativa

As propriedades farmacológicas da espécie vegetal *Pterodon pubescens* Benth. (sucupira) vem sendo estudada por nosso grupo de pesquisas desde 1998.

O primeiro resultado foi publicado por Denny (2002) que descreveu as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva do óleo fixo extraído por prensagem dos frutos de *P. pubescens*. Nesse trabalho observou-se que o efeito anti-inflamatório foi mantido no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos adrenalectomizados, sugerindo que a ação do óleo devia ser independente da liberação de corticoides endógenos. A atividade antiedematogênica foi confirmada ainda pela avaliação em modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton.

O óleo fixo dos frutos também demonstrou atividade antinociceptiva, quando avaliado nos modelos de contorção abdominal induzida por ácido acético e no teste da placa-quente. No estudo de Denny (2002) foi observado ainda que o tratamento com o óleo, por via intraperitoneal, durante 14 dias nas doses consideradas efetivas (30, 100 e 300 mg/kg), acarretou o surgimento de sinais de

toxicidade, evidenciados por hipoglicemia e diminuição do peso corporal nas doses de 100 e 300 mg/kg além de esplenomegalia, gastrite, nefrite e degeneração hepática nos animais tratados com a dose mais alta.

O óleo de *P. pubescens* e uma fração ativa contendo majoritariamente o composto 6α -acetoxi 7β -hidroxi-vouacapano apresentaram atividade antiproliferativa *in vitro* dose dependente quando avaliado em células tumorais humanas. A fração ativa apresentou uma curva de proliferação celular em função da concentração semelhante à do meloxicam, corroborando com a hipótese de que a atividade antiproliferativa pode estar relacionada à inibição das prostaglandinas.

Os resultados do primeiro estudo motivaram a continuação dos trabalhos para determinação das propriedades analgésica, anti-inflamatória e antitumoral da espécie. Spindola (2006) descreveu a atividade antinociceptiva do extrato bruto diclorometano dos frutos de *P. pubescens* e suas frações utilizando diferentes modelos experimentais. Nesse trabalho, ainda foi possível determinar os componentes geranilgeraniol e 6α -hidroxi, 7β -acetoxivouacapano como os componentes majoritários envolvidos na atividade antinociceptiva. Por fim, foi sugerido a não participação de receptores opióides na atividade antinociceptiva da fração ativa purificada.

Na sequência, Spindola (2010) deu continuidade aos estudos avaliando as atividades antinociceptiva e antitumoral de compostos isolados do extrato bruto diclorometano de frutos de *P. pubescens*. Os resultados permitiram determinar importantes aspectos relacionados à farmacodinâmica destes compostos, demonstrando potencial quimioterápico em estudos de atividade antiproliferativa *in vitro* em células tumorais humanas dos compostos 6α acetoxi- 7β -hidroxivouacapano, éster $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapano- 17β oato de metila e $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapano- 17β -metilenol contra diversas linhagens tumorais, com ênfase na atividade antitumoral específica para a linhagem de próstata (PC-3). Mais ainda, os compostos geranilgeraniol e éster $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapano- 17β oato de metila também foram avaliados no modelo de tumor Sólido de Ehrlich na pata de camundongos. Os mecanismos da modulação antinociceptiva dos compostos

geranilgeraniol e éster $6\alpha,7\beta$ -dihidroxivouacapano- 17β oato de metila foram avaliados através de diferentes modelos experimentais *in vivo*, como o de contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da capsaicina, teste do glutamato e teste da placa quente, além dos estudos de mecanismos da ação antinociceptiva receptor-específica através dos modelos experimentais *in vivo* de alodinia induzida por *complete Freund's adjuvant* (CFA), hiperalgesia induzida por carragenina, bloqueio de receptores específicos no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, revelando principalmente atividade relacionada a receptores imidazólicos e serotoninérgicos. Spindola *et al.*, (2011) sugeriram o efeito sinérgico existente entre os compostos ativos geranilgeraniol e $6\alpha,7\beta$ - dihidroxivouacapano- 17β -oato de metila, evidenciado pela similaridade nas doses efetivas apresentadas para os compostos isolados e o extrato bruto.

Paralelamente, Servat (2010) desenvolveu estudos de estabilidade do extrato bruto diclorometano de *P. pubescens* e da mistura dos isômeros éster 6α -hidroxi- 7β -acetoxi-vouacapano- 17β -oato de metila e éster 6α -acetoxi- 7β -hidroxivouacapano- 17β -oato de metila, tanto livres quanto microencapsulado com goma arábica : maltodextrina na proporção 1:1. Nesse trabalho foi demonstrado que a atividade antinociceptiva destes compostos estava relacionada à dor de origem neurogênica sem envolvimento do componente inflamatório. Essa mistura de isômeros também apresentou especificidade para as linhagens de ovário (NCI-ADR/RES) e mama MCF-7 (hormônio-dependentes) na atividade antiproliferativa *in vitro*.

Após o estudo de estabilidade prolongada (180 dias), tanto o extrato bruto quanto a mistura de isômeros microencapsulados (atomização) preservaram a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva demonstrada inicialmente. Já o extrato bruto livre apresentou um enrijecimento logo no primeiro mês o que impossibilitou a manipulação do mesmo. Os isômeros livres mantiveram a atividade antiproliferativa constante durante todo o teste de estabilidade. Por outro lado após 180 dias houve um aumento da dose efetiva no modelo de contorção abdominal induzido por ácido acético (Servat *et al.*, 2012).

Em continuidade aos trabalhos já realizados por nosso grupo de pesquisa associado a ampla utilização popular do decocto dos frutos de *Pterodon pubescens*, o presente estudo avaliou a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato aquoso dos frutos dessa espécie com o intuito de corroborar a indicação popular. Também foi avaliado os benefícios do processo de microencapsulação por *spray drying*, para preservação das características físico-químicas e ações biológicas *in vivo* desse extrato.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivos Gerais

Avaliar a atividade antinociceptiva, anti-inflamatória, antiartrítica e estabilidade de extratos brutos de frutos da *P. pubescens* visando corroborar o uso popular.

2.2 Objetivos específicos

- Produção de extratos padronizados de *P. pubescens* nos diterpênos furânicos e geranilgeraniol
- Avaliar da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória em modelo experimental *in vivo* dos extratos gerados de *P. pubescens*, nos modelos de contorção abdominal, formalina, hiperalgesia e edema de pata;
- Avaliar da atividade antiartrítica do extrato diclorometano no modelo de artrite reumatoide induzida por CFA (*Complete Freund's Adjuvant*);
- Avaliar da estabilidade do extrato aquoso livre e microencapsulado, em câmara climática, através de análises físico-químicas e avaliação da atividade antinociceptiva *in vivo*.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Seleção do material vegetal e preparo dos extratos

3.1.1 - Coleta do material vegetal

Os frutos de *Pterodon pubescens* Benth. foram coletadas, por nosso grupo de pesquisa, nas cidades de São Carlos (SP), Sorriso (MT) e Ponto Chique (MG) no mês de setembro de 2011 e identificadas pelo Prof. Dr. Jorge Yoshio Tamashiro do departamento de Botânica do IB-UNICAMP. As exsiccatas (1398 e 1402) foram depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC) do IB-UNICAMP. O acesso ao patrimônio genético (CGEN) foi autorizado conforme processo 010495/2012-6 (ANEXO 1)

3.1.2- Padronização dos Extratos:

a) Seleção do Material vegetal:

Para a seleção do material vegetal, foram produzidas soluções em acetado de etila a 10 mg/mL com o óleo fixo dos frutos, coletadas nos diferentes acessos, obtido pelo método de prensagem, e foram avaliados os teores de geranilgeraniol (m/z 288) e dos vouacapanos $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapano- 17β oato de metila (m/z 362) e os isômeros 6α -hidroxi- 7β -acetoxi-vouacapano- 17β -oato de metila (m/z 404 A) e éster 6α -acetoxi- 7β -hidroxi-vouacapano- 17β -oato de metila (m/z 404 B) por cromatografia gasosa acoplada ao detector de massas.

b) Produção dos extratos

Extrato Aquoso por Soxhlet

Os frutos foram triturados juntamente com gelo seco e extraídas em sistema soxhlet utilizando a proporção de um grama de frutos de sucupira triturados, em moinho de facas, para três gramas de líquido extrator (água). O ciclo de extração foi por um período de 8 horas. Posteriormente o extrato foi concentrado, sob vácuo, em rotaevaporador (Buchi RE 120) e liofilizado (Virtis, modelo 8L) obtendo o extrato aquoso por soxhlet .

Extrato Diclorometano por Soxhlet

Os frutos (50 g) foram triturados juntamente com gelo seco e extraídas em sistema soxhlet utilizando a proporção de um grama de frutos de sucupira triturados para três mililitros de solvente (150 mL de diclorometano). O ciclo de extração foi de 8 horas. Todo o extrato foi concentrado, sob vácuo em rotaevaporador (Buchi RE 120) obtendo o extrato diclorometano (Pp).

Extrato Aquoso por Refluxo

O extrato aquoso foi produzido através de extração em sistema de refluxo utilizando a proporção de um grama de frutos de sucupira triturados, para 25 gramas de solvente (água). A extração foi realizada por um período de 1 hora de água em ebulição e posterior resfriamento até temperatura ambiente, o extrato foi concentrado em rotaevaporador (Buchi RE 120) e liofilizado (Virtis, modelo 8L). Obtendo o extrato aquoso por refluxo (Ppa).

3.1.3- Identificação dos Princípios Ativos:

Análise Quantitativa Por Cromatografia Gasosa-Espectrometria De Massas

Os extratos aquoso e diclorometano foram diluídos em acetato de etila ou metanol, obtendo uma solução a 10 mg/mL, e analisados por cromatografia gasosa capilar acoplada a um detector de massas (CG Hewlett Packard 5890, série II, diretamente acoplado a um detector seletivo de massa Hewlett Packard 5970, equipado com uma coluna de sílica fundida WCOT, 30m x 0,25mm, DB-1 ou DB-5, ou similares). As condições de análise foram: temperatura de injeção: 250°C, temperatura do detector: 300°C, programa de temperatura: 40(2min)-240°C, 5°C/min, 240-300°C, 10°C/min, com ou sem razão de split 1:100 (dependendo da concentração da amostra), gás de arraste He 0,7 bar, 1mL/min. A quantificação dos compostos foi realizada pelo método de normalização de área utilizando padrões autênticos isolados em trabalhos anteriores (Servat, 2010).

3.2 – Avaliação da atividade farmacológica

3.2.1 - Animais:

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos (25-35g) e ratos Wistar machos ou fêmeas (150-250g) obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório da UNICAMP (CEMIB - UNICAMP) mantidos a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ em ciclos claro-escuro de 12 h (fase clara iniciando as 7:00h) e mantidos em biotério de experimentação (10 e 5 animais por gaiola, respectivamente) com água e ração *ad libitum*, por pelo menos 7 dias antes dos experimentos. Os estudos foram realizados em conformidade com as boas práticas de experimentação animal preconizadas pelo Guia de cuidados veterinários de animais de laboratório (Voipio, 2008). O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de ética para uso de animais da UNICAMP, sob protocolo nº 2367-1 (ANEXO II).

3.2.2- Extratos, fármacos e reagentes:

Todas os extratos ou fármacos foram diluídas em solução salina (NaCl 0,9% em água destilada), e quando necessário, adição de 1% Polissorbato 80 (Tween 80[®] - Sigma-Aldrich, U.S.A). Para os testes realizados foram utilizadas as seguintes substâncias: formaldeído (Chemco-Brasil), adjuvante de freund completo (*complete freund adjuvant* - CFA), cloreto de sódio (Labsynth-Brasil), ácido acético glacial (Chemco-Brasil), carragenina e dexametasona (Sigma[®]).

3.2.3 – Modelos experimentais *in vivo*

a) Avaliação da atividade locomotora (campo- aberto)

O Teste do Campo aberto foi utilizado visando determinar possível ação central sedativa ou periférica ao nível da junção neuromuscular, o que poderia levar a resultados falso-positivos para modelos de analgesia que são fundamentalmente comportamentais. O método utilizado foi o campo aberto (*open-field*) como descrito na literatura (Lappa, 2008). O aparato consistiu em uma caixa plástica medindo 45 x 45 x 20 cm, com o fundo dividido em 9 áreas iguais (15 x 15 cm). O número de áreas cruzadas pelas 4 patas dos camundongos

Swiss, machos (n = 6 por grupo) foi contado em sessões de 5 minutos e tomadas como índice comportamental. Os animais foram tratados, por via oral (v.o.), com extrato aquoso (Ppa) e diclorometano (Pp) de *Pterodon pubescens* nas doses de 30,100 e 300 mg/Kg, utilizando como controle negativo grupo tratado com veículo (solução salina 0,9%, 10 mL/kg v.o.) e como positivo grupo tratado, por via intra peritoneal, com pentobarbital (35 mg/kg).

b) Contorções abdominais induzidas por ácido acético:

Foram utilizados grupos de 6 camundongos *Swiss*, machos, (25-35g). Os animais foram tratados, por via oral, com Ppa e Pp nas doses 10, 30 e 100 mg/Kg, utilizando como controle negativo grupo tratado com solução salina contendo 0,9% (10 mL/kg v.o.). Após 60 minutos, os animais receberam injeção intraperitoneal de ácido acético 0,8% (10 mL/Kg), e as contrações da parede abdominal seguida de torções do tronco e extensão dos membros posteriores foram contadas durante 15 minutos (Koster *et al.*, 1959, Vacher *et al.*, 1964). Esse modelo foi utilizado para biomonitoramento das amostras de extrato microencapsulado submetido ao teste de estabilidade.

c) Lamedura de pata induzido por formalina

O teste da formalina foi realizado como descrito por Dubuisson & Dennis (1977) e Abbott (1997). Grupos de camundongos *Swiss*, machos, (n = 6) foram tratados, pela via oral, com veículo (solução salina 0,9% 10 mL/kg), e amostras de Ppa e Pp nas doses de 30,100 e 300 mg/Kg. Após 60 minutos do tratamento, os animais receberam injeção sub-plantar (pata posterior direita) de 20 µL de solução de formalina a 2% (formaldeído 1,2% em salina). O tempo que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata lesionada, durante um período de 45 minutos, foi indicativo de nocicepção. Os primeiros cinco minutos determinaram a resposta à dor de origem neurogênica; e entre os tempos 25-45 minutos subsequentes determinaram resposta a dor de origem inflamatória.

d) Hiperalgisia induzida por carragenina (Randal Sellito):

Esse modelo foi utilizado para a avaliação de ação hiperalgésica, visando determinar a potencial ação analgésica em estados patológicos que provocam dores de alto limiar como dores crônicas ou infecciosas. O procedimento utilizado foi uma adaptação daquele preconizado por Randall e Sellitto (1957). Grupos de ratos Wistar, machos, (n = 5) foram submetidos a estímulo mecânico (pressão de 0 a 500 g) sobre a pata posterior direita utilizando um Analgesímetro (Ugo Basile, mod 37215/372116, Itália) antes da injeção do agente inflamatório, para determinar valor basal. Após esta primeira aferição, animais receberam injeção intraplantar de 100 µL de carragenina (3,0 % em salina) na parte ventral da pata direita posterior. Após 2 h e 30 min, foram submetidos à pressão novamente para avaliar se o estado hipernociceptivo foi alcançado. Os animais foram então tratados, por via oral, com veículo (solução salina 0,9 % 10 mL/kg), Ppa e Pp nas doses de 30,100 e 300 mg/Kg, e a hiperalgisia mecânica foi avaliada nos subseqüentes 120 e 180 minutos após o tratamento. Os valores da hiperalgisia mecânica foram obtidos por única medição/tempo, e os resultados foram demonstrados como porcentagem de decréscimo da pressão suportada em comparação com o grupo controle negativo (considerado 100%- pressão máxima suportada).

e) Edema de pata induzido por carragenina

O edema foi induzido mediante a injeção intraplantar de 40 µL carragenina (3,0 % em salina) na pata posterior direita de camundongos Swiss, machos. (Winter *et al.*, 1962). Os animais foram tratados, por via oral, com veículo (solução salina 0,9% 10 mL/kg), Ppa e Pp nas doses de 30,100 e 300 mg/Kg 1h antes da administração do agente inflamatório. A inflamação foi avaliada medindo-se o volume basal da pata (antes da indução) e 2, 4, 6, 24, 48 e 72h após a injeção de da carragenina empregando um pletismômetro digital (UGO-Basile). Os valores de volume deslocado foram registrados, e os resultados foram demonstrados como porcentagem de aumento, obtidos pela seguinte formula:

$$\% \text{ de aumento} = \frac{(\text{vol. pata inflamada(mL)} - \text{vol pata não inflamada (mL)}) \times 100}{(\text{vol. da pata não inflamada})}$$

f) Artrite reumatoide induzida por CFA (Omura *et al.*, 1998)

Para a indução da artrite foram utilizadas ratos Wistar fêmeas, subdivididos em 6 grupos distintos (n=6). O grupo 1 foi tratado com veículo (solução salina 0,9% 10 mL/kg), os grupos 2,3 e 4 foram tratados com o extrato diclorometano nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, o grupo 5 foi tratado com dexametasona (3 mg/kg) e o grupo 6 foi o grupo satélite. Os animais receberam tratamentos, por via oral, por 14 dias consecutivos, a partir do sétimo dia de indução da artrite. Para indução da artrite todos os grupos, exceto o grupo satélite, receberam injeção intraplantar única do CFA (100 uL) na pata posterior direita. Antes da aplicação do agente indutor da artrite, foram determinados valores basal do índice de artrite e alodínia. Após a aplicação do CFA foram realizadas medições nos dias 7, 10, 14 e 21 dias.

Determinação do índice de artrite

O índice de artrite foi determinado através do monitoramento do edema da pata com o plestimômetro digital (UGO-Basile) e calculado conforme fórmula abaixo:

$$\text{IA (\%)} = \frac{\text{Volume da pata inflamada} - \text{Volume Basal}}{\text{Volume basal}} \times 100$$

Determinação atividade antinociceptiva

Para a avaliação da atividade antinociceptiva do extrato diclorometano de *P. pubescens*, nesse modelo experimental, os animais foram submetidos ao analgesiometro empregando-se protocolo experimental baseado no descrito por Villetti (2003). A alodínia mecânica foi mensurada utilizando um anesthesiometro (*Dynamic Plantar Anaesthesiometer*- Ugo Basile, mod- 37450- Itália) que consiste em uma plataforma elevada, com perfurações que permitem o acesso a superfície ventral das patas posteriores. Uma haste de aço (diâmetro 0,5 mm) foi

pressionada contra a pata em análise com uma força crescente (de 0 a 35g, em 20 segundos). Quando o animal retirava a pata, o estímulo mecânico era automaticamente cessado, e a força que cada animal podia suportar foi registrada pelo próprio equipamento. O *índice de alodínia* foi determinado após quatro medições consecutivas nas patas esquerda (não inflamada) e direita (inflamada), em sequência, considerando a fórmula:

$$\text{Índice de alodínia} = \frac{\text{Pressão suportada pela pata não inflamada}}{\text{Pressão suportada pela pata inflamada}}$$

Influência do tratamento com doses repetidas de Pp em fatores morfológicos e bioquímicos

Para a avaliação da influência dos 14 dias de tratamento com o Pp em parâmetros morfológicos e bioquímicos nos grupos em que foi induzido a artrite reumatoide, foram analisados o crescimento dos animais a função hepática e renal e a contagem diferencial dos leucócitos conforme descrito a seguir:

Ganho de Massa

Os animais foram pesados no primeiro dia e no último dia (21º dia) do modelo experimental e foi determinada a variação de massa corpórea.

Função hepática e renal

Após o 21º dia os animais foram eutanasiados, por prolongamento de anestesia. Durante a necropsia o fígado, o rim e as adrenais dos animais, foram retirados e que posteriormente foram pesados e calculou-se o peso relativo desses órgãos, considerando a fórmula:

$$\text{Peso relativo} = \frac{\text{Peso do órgão (g)}}{\text{Massa corpórea(g)}}$$

O sangue total periférico dos animais, coletados pela veia safena, foi centrifugado e o plasma analisado e quantificado pelo aparelho Reflotron[®]. Foram quantificadas as enzimas hepáticas transaminase glutâmico oxalacética (TGO), transaminase glutâmico pirúvica (TGP) e fosfatase alcalina (ALP) e os níveis sanguíneos de uréia e creatinina.

3.3 – Avaliação da estabilidade do extrato aquoso livre e microencapsulado

3.3.1 - Produção das microcápsulas

As microcápsulas foram produzidas a partir da homogeneização do extrato aquoso (20 %), agente encapsulante (80 % de goma arábica) e tensoativo (5 % Tween 80). Essa mistura foi submetida ao dispersor IKA[®]T10Basic-Ultra Turrax[®] durante 15 min. O processo de atomização foi utilizado para a microencapsulação, empregando o aparelho *spray dryer* Buchi B-290, nas condições operacionais baseadas no trabalho desenvolvido por Servat (2010), ou seja, 180 °C ± 5 °C de ar de entrada, 90-110 °C , 5 °C de ar de saída, 30 % de sólidos totais, pressão de ar de 1 bar, fluxo de ar 10 L/min, vazão da bomba 10 mL/min, 20% de recheio (extrato) em relação aos sólidos totais.

3.3.2 - Estudo do material encapsulado

Para as análises do material encapsulado 500 mg das micropartículas produzidas foram lavadas com 10 mL n-hexano, para a extração dos compostos marcadores não encapsulados, seguido de agitação por 3 min e centrifugação, 10 minutos a 3000 rpm, para a extração do extrato não encapsulado. Finalizado essa etapa, o solvente foi evaporado, sob vácuo, em rotaevaporador Buchi até *secura* e o material seco foi novamente diluído em 5 mL de hexano, obtendo a solução da fase externa.

Posteriormente, as partículas limpas foram rompidas como descrito no item “**3.3.3 - Extração do recheio das microcápsulas**”. Após a evaporação da fase orgânica, sob vácuo, o material seco foi diluído em 5 mL de n-hexano, obtendo a solução da fase interna. As soluções da fase externa e interna foram então submetidas para análise em cromatografo gasoso acoplado a detector de massas.

3.3.3 - Extração do recheio das microcápsulas

O processo de extração foi realizado em um tubo de centrifuga com tampa de 50 mL (Falcon®), com 500 mg de microcápsulas, 20 mg de NaCl e 5 mL de água, para rompimento das microcápsulas. A mistura foi agitada em vórtex durante 3 minutos, e posteriormente foi adicionado 5 ml de etanol, para a precipitação da goma-arábica, e 10 mL n-hexano seguido de agitação por mais 3 min, para extração dos compostos marcadores. Essa mistura foi centrifugada por 10 minutos, a 3000 rpm, e a fase n-hexânica, contendo os compostos ativos, foi evaporada em sob vácuo até *secura*. O processo de extração com n-hexano foi realizado três vezes.

3.3.4 - Estudos de estabilidade

O extrato aquoso livre e microencapsulado foram acondicionados, em placas de petri de 10 cm de diâmetro fechadas, em câmara climática, com condições de temperatura e umidade relativa de equilíbrio (URE) mantidas constantes em 45°C e 70%, respectivamente, conforme estabelecido pela resolução da ANVISA RE nº1-2005 para o estudo de estabilidade acelerada (Brasil, 2005). Foram retiradas alíquotas para análises de morfologia, pH, umidade e atividade biológica nos tempos 0, 90 e 180 dias.

a) Avaliação de morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura

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

As amostras foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), em microscópio eletrônico de varredura (JEOL), sob aceleração de 15 kV e

suas imagens digitalizadas para observação detalhada das estruturas nas ampliações de 1500 vezes. Esta avaliação foi realizada no Laboratório de Microscopia do Instituto de Biologia- Unicamp.

b) Análise de pH

Para análise de pH as microcápsulas e o Ppa foram pesadas em balança analítica a fim de se preparar uma solução com concentração de aproximadamente 1% p/v dissolvidas em H₂O ultrapura. A medida do pH da solução resultante foi realizada em pHmetro (Micronal), calibrado em pH 4 e 7, à temperatura ambiente. Esse procedimento foi realizado em triplicata.

c) Avaliação da umidade

Para a determinação da umidade das amostras, primeiramente, pesa-filtros vazios foram acondicionados em estufa (Precision modelo 28), a 105°C por 1 hora, transferidos para um dessecador a temperatura ambiente e pesados. Esse procedimento foi repedido até observar-se peso constante. Em seguida foram adicionados nesses pesa-filtros 1,000g de extrato aquoso livre e microencapsulado, pesados em balança analítica (Mettler AB204), que foram armazenados em estufa, a 105°C por 24 horas. Após resfriamento em dessecador, até temperatura ambiente, os pesa filtros com as amostras, foram novamente pesados em balança analítica. Esse procedimento foi realizado em triplicata.

3.4 - Análise Estatística

Todos os resultados foram submetidos a análise de variância de uma única via (ANOVA), considerando-se como nível crítico $p < 0,05$ para que seja considerada diferença significativa entre os grupos controle e tratados, seguida do Teste de Duncan.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Partindo dos resultados obtidos anteriormente com o extrato bruto diclorometano de *P. pubescens*, e com base em dados etnofarmacológicos, o presente estudo propôs avaliar a atividade farmacológica do extrato aquoso dos frutos dessa espécie, como também avaliar o potencial do extrato diclorometano em modelo de artrite reumatoide induzido por CFA.

Como evidenciado nos estudos de Cabral *et al.* (2013), os frutos de *P. pubescens* podem apresentar diferenças significativas em seu perfil químico, principalmente no teor dos compostos ativos geranilgeraniol (m/z 288), éster $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapano- 17β oato de metila (m/z 362) e os isômeros éster 6α -hidroxi- 7β -acetoxi-vouacapano- 17β -oato de metila (m/z 404 A) e éster 6α -acetoxi- 7β -hidroxi-vouacapano- 17β -oato de metila (m/z 404 B). Deste modo, o óleo fixo dos frutos oriundos de São Carlos-SP, Sorriso-MT e Ponto Chique-MG, coletados no mês de setembro de 2011, foram analisados por CG/EM a fim de selecionar o acesso que seria utilizado no desenvolvimento deste trabalho (Figura 7 e Figura 8).

Observou-se uma grande variação no perfil químico dos frutos originadas de São Carlos-SP, Sorriso-MT e Ponto Chique-MG, destacando respectivamente, os compostos geranilgeraniol (m/z 288), éster $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapano- 17β oato de metila (m/z 362), éster 6α -hidroxi- 7β -acetoxi-vouacapano- 17β -oato de metila (m/z 404-A), e acetoxi- 7β -hidroxi-vouacapano- 17β -oato de metila (m/z 404-B), que já demonstraram estar relacionados com a atividade farmacológica dessa espécie (Figura 9).

Figura 7: Estrutura química dos Compostos marcadores: geranilgeraniol (m/z 288), éster 6 α ,7 β -dihidroxiyouacapano-17 β oato de metila (m/z 362) éster 6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-youacapano-17 β -oato de metila (m/z 404 – A) e acetoxi-7 β -hidroxi-youacapano-17 β -oato de metila (m/z 404 – B),

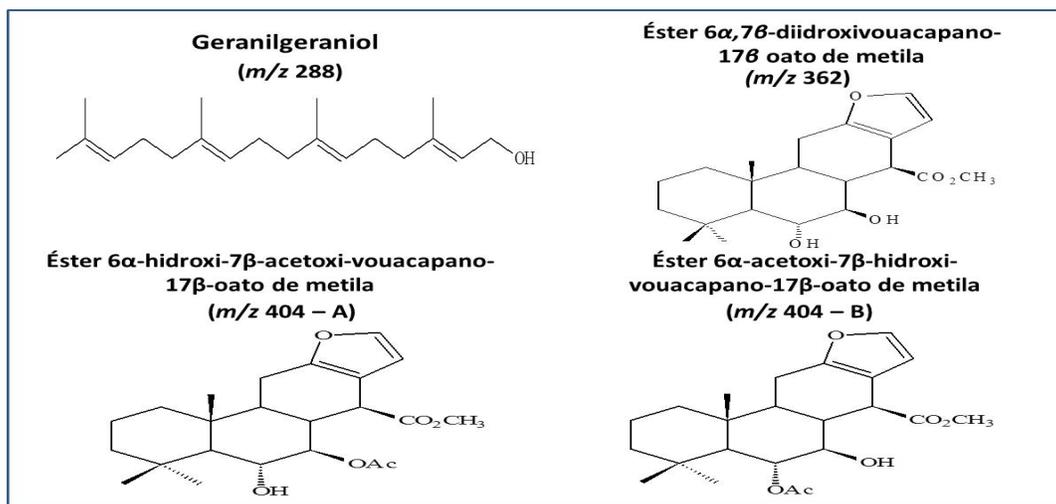
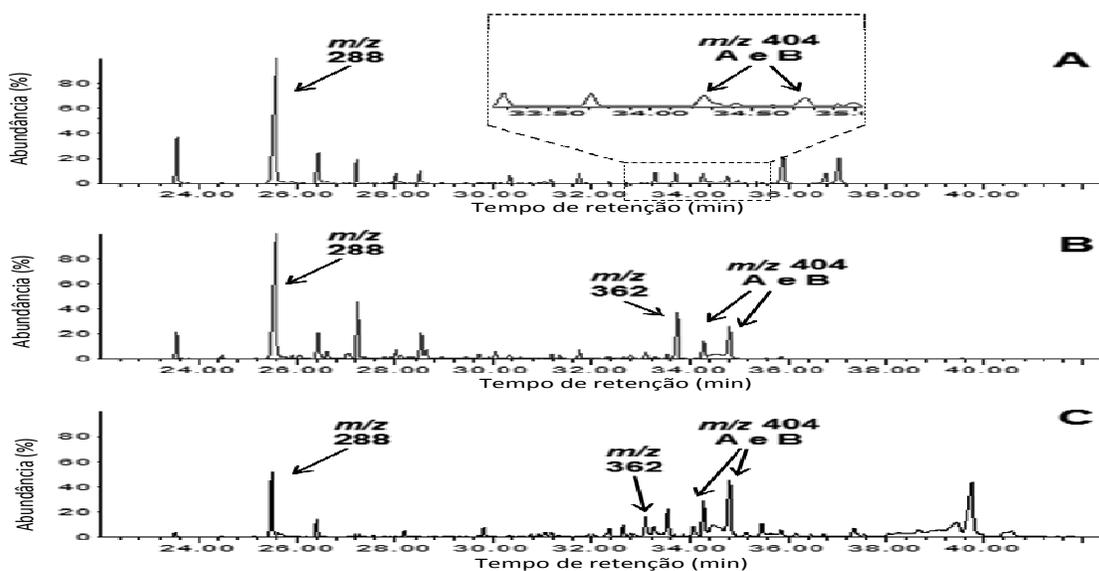
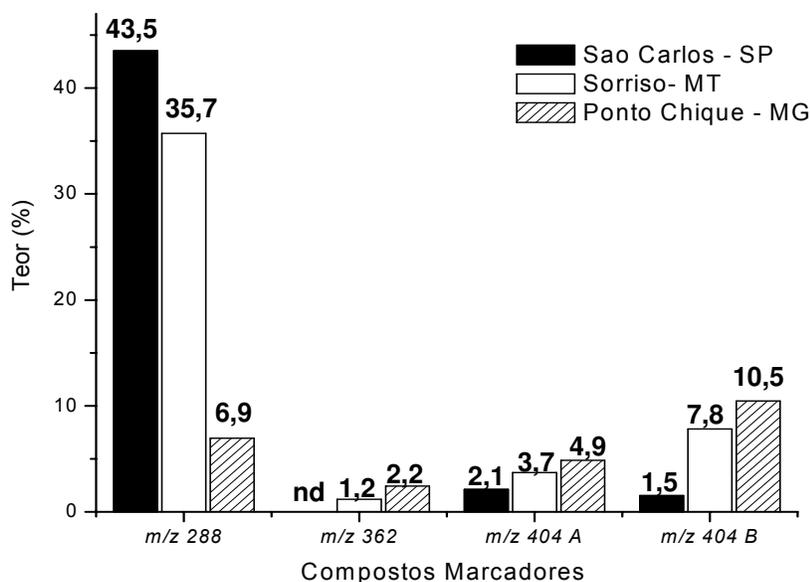


Figura 8: Cromatogramas normalizados, obtidos por CG/EM, do óleo das frutas oriundas dos acessos de São Carlos-SP (A), Sorriso-MT (B) e Ponto Chique – MG (C).



Legenda: Compostos monitorados geranilgeraniol (m/z 288), éster 6 α ,7 β -dihidroxiyouacapano-17 β oato de metila (m/z 362) e os isômeros éster 6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-youacapano-17 β -oato de metila (m/z 404 A) e éster 6 α -acetoxi-7 β -hidroxi-youacapano-17 β -oato de metila (m/z 404 B).

Figura 9: Variação do teor dos compostos marcadores presentes no óleo dos frutos de *Pterodon pubescens* Benth oriundos de diferentes acessos



Legenda: Compostos marcadores: geranilgeraniol (m/z 288), éster $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapano- 17β oato de metila (m/z 362) éster 6α -hidroxi- 7β -acetoxi-vouacapano- 17β -oato de metila (m/z 404 – A) e acetoxi- 7β -hidroxi-vouacapano- 17β -oato de metila (m/z 404 – B), nd: não detectado.

Foi selecionado o acesso de Ponto Chique-MG para dar continuidade destes estudos, considerando que o material continha dois dos marcadores envolvidos na atividade antinociceptiva, geranilgeraniol e os diterpenos furanicos (Spindola et.al,2010), aliado a facilidade de acesso ao material vegetal.

O processo de extração é uma etapa primordial para estudos com plantas medicinais considerando necessário a associação adequada do método e o líquido extrator para que os compostos de interesse sejam totalmente extraídos (Simões *et al.*, 2001). Assim, como o presente estudo teve como proposta avaliar a indicação popular do uso dos frutos de *P. pubescens*, o líquido extrator utilizado em todos os métodos de extração foi a água. Também foi produzido o extrato diclorometano, como padrão de comparação, visto que sua produção foi padronizada em estudos realizados previamente (Servat, 2010).

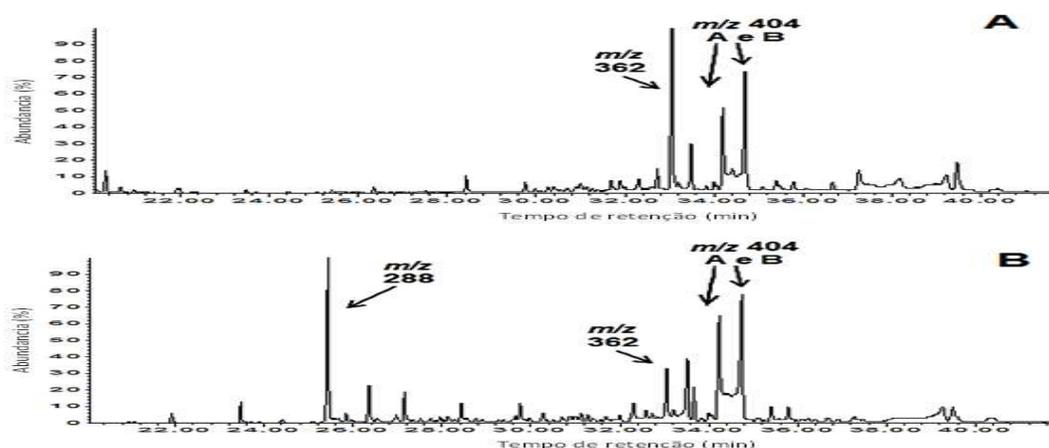
Fatores como estado de divisão da droga, pH, natureza do solvente e aquecimento podem interferir no processo de extração do material vegetal. Observou-se que o aumento da temperatura aumentou significativamente o

rendimento de extração do processo de refluxo, considerando que esse fator possibilita o aumento da solubilidade dos compostos presentes nas mistura. Já a extração via sistema soxhlet apresentou rendimento menor, considerando que o liquido extrator que passou pelo material vegetal foi condensado no processo de renovação do solvente (Simões *et al.*, 2001). Com base nesses resultados de rendimento do processo, os estudos farmacológicos foram realizados com o extrato aquoso produzido pela técnica de refluxo (Tabela 1 e Figura 10).

Tabela 1: Rendimento (m/m) dos processos de extração por Refluxo, Soxhlet e Decocção para produção do extrato aquoso de frutos de *Pterodon pubescens* Benth originadas de Minas Gerais

Método	Massa inicial	Massa Final	Rendimento
Refluxo	20,00 g	2,93 g	14,63 %
Soxhlet	48,16 g	1,10 g	2,28 %

Figura 10: Cromatogramas normalizados, obtidos por CG/EM (HP6890/HP5975), do extrato aquoso (A) e diclorometano (B).



Legenda: Compostos monitorados: geraniogeraniol (m/z 288), éster $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapano- 17β oato de metila (m/z 362) e os isômeros éster 6α -hidroxi- 7β -acetoxi-vouacapano- 17β -oato de metila (m/z 404 A) e éster 6α -acetoxi- 7β -hidroxi-vouacapano- 17β -oato de metila (m/z 404 B).

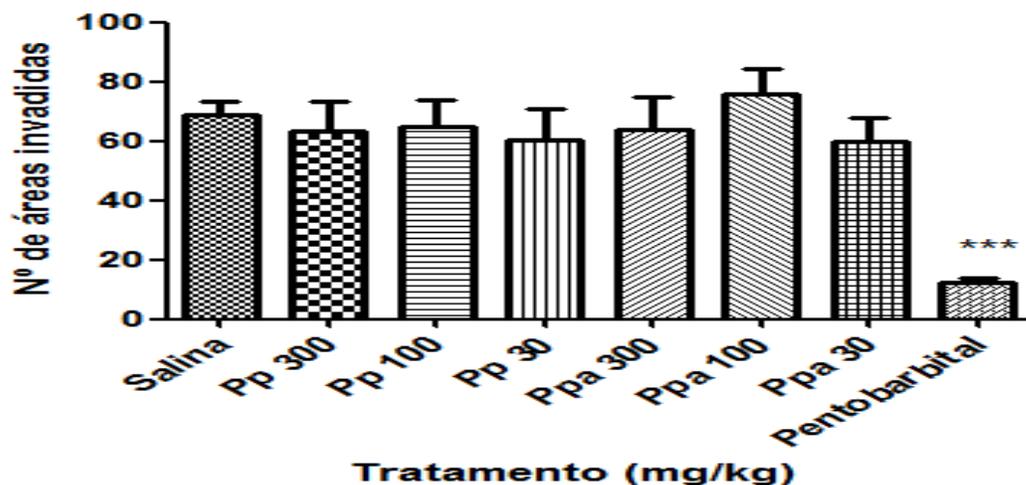
Tabela 2: Teor dos compostos marcadores, geraniogeraniol (m/z 288), éster 6 α ,7 β -dihidroxiyouacapano-17 β oato de metila (m/z 362) e os isômeros éster 6 α -hidroxi-7 β -acetoxiyouacapano-17 β -oato de metila (m/z 404 A) e éster 6 α -acetoxi-7 β -hidroxi-youacapano-17 β -oato de metila (m/z 404 B), no extrato aquoso e diclorometano da espécie *Pterodon pubescens* Benth.

Extrato	Teor dos compostos			
	m/z 288	m/z 362	m/z 404 A	m/z 404 B
Aquoso	0,00	11,68 \pm 0,28	7,00 \pm 0,50	9,54 \pm 0,037
Diclorometano	9,27 \pm 0,12	3,72 \pm 0,16	9,14 \pm 0,50	11,96 \pm 0,57

Dando inicio a avaliação de eficiência antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato aquoso comparando-o com o extrato diclorometano, foram realizados os modelos *in vivo* de *open field*, contorção abdominal induzido por acido acético, lambadura de pata induzida por formalina, e hiperalgesia induzida por carragenina em ratos e camundongos. A atividade anti-inflamatória, por sua vez, foi avaliada nos modelos de edema de pata induzido por carragenina e artrite reumatoide induzida por CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) em ratos.

Animais quando são submetidos a um estímulo reconhecidamente nocivo exibem respostas comportamentais, motoras e fisiológicas. Avaliação desses parâmetros pode inferir se um tratamento está proporcionando uma resposta analgésica (Lappa *et al.*, 2008). Nos modelos de nocicepção o fator comportamental está diretamente envolvido, portanto o estudo de extratos que interfiram na locomoção poderia produzir um resultado falso positivo. Portanto, antes de iniciar os estudos em protocolos de nocicepção e inflamação foi avaliado a interferência dos tratamentos com Pp e Ppa na locomoção em modelo de *open-field*. Nesse modelo foi observado que o tratamento agudo por via oral (v.o.), com o extrato diclorometano (Pp) e extrato aquoso (Ppa) de *P. pubescens*, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, não afetou a locomoção dos animais quando comparado ao grupo controle negativo (Solução NaCl 0,9%), enquanto o tratamento com o controle positivo (pentobarbital 35 mg/Kg, i.p.) reduziu significativamente da locomoção (Figura 11).

Figura 11: Influência do tratamento agudo oral com extrato diclorometano (Pp) e aquoso (Ppa) de *P. pubescens* na locomoção de camundongos Swiss

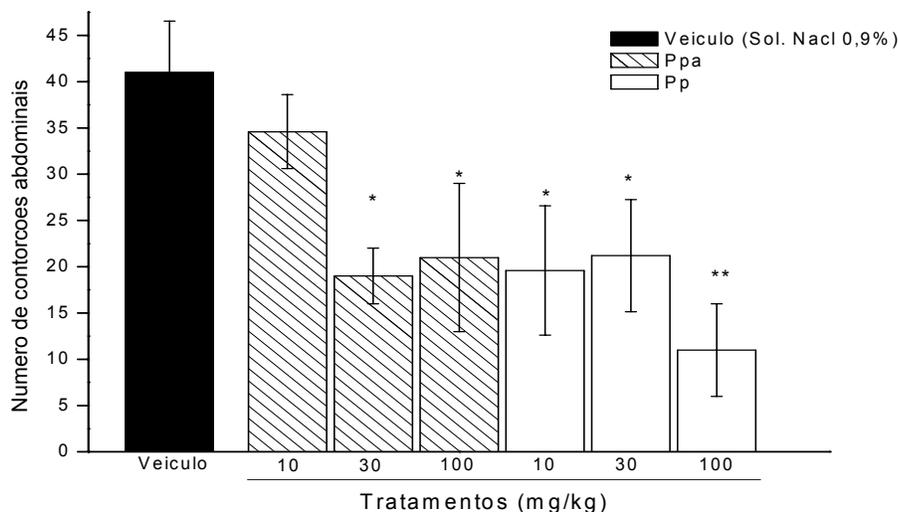


Legenda: Camundongos previamente tratados (60 min.) pela via oral com Ppa ou Pp nas doses de 10, 30 ou 100 mg/kg. Os resultados são expressos em média ± erro padrão da média (epm) de até 6 animais por grupo experimental (ANOVA: *** $p \leq 0,005$).

O ácido acético é um estímulo conveniente para testes de triagem para atividade nociceptiva por produzir uma resposta cuja intensidade depende da interação de vários eventos, neurotransmissores e neuromoduladores que determinam a nocicepção, tais como a liberação de cininas, acetilcolina, substância P e prostaglandinas. Desta forma, pode-se concluir que o modelo é sensível tanto a substâncias analgésicas de ação central quanto de ação periférica, dotadas dos mais variados mecanismos de ação (Cervero & Naird, 1999; Shafiee *et al.*, 2003; Lapa *et al.*, 2008).

No grupo controle, previamente tratado com veículo (solução NaCl 0,9% 10 mL/kg; v.o.), a injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético (0,8% em solução NaCl 0,9%; 10 mL/kg, i.p.) induziu 41 ± 5 contorções durante os 15 minutos de avaliação experimental. O pré-tratamento (60 min) com o extrato aquoso nas doses de 10, 30, 100 mg/kg (v.o.), reduziu o número de contorções abdominais em 17,07% (34 ± 4), 53,65% (19 ± 3) e 48,78% (21 ± 8), respectivamente, enquanto o extrato diclorometano reduziu as contorções, nessas mesmas doses, em 53,65% (19 ± 6), 48,78% (21 ± 6) e 73,17% (11 ± 5), respectivamente (ANOVA $p > 0,05$ - Figura 12).

Figura 12: Gráfico demonstrando os resultados do modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos previamente tratados com o extrato aquoso (Ppa) ou diclorometano (Pp) dos frutos de *P. pubescens*.



Legenda: Camundongos previamente tratados (60 min.) pela via oral com Ppa ou Pp de *P. pubescens* nas doses de 10, 30 ou 100 mg/kg. Os resultados são expressos em média ± erro padrão da média de até 6 animais por grupo experimental (ANOVA: *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01).

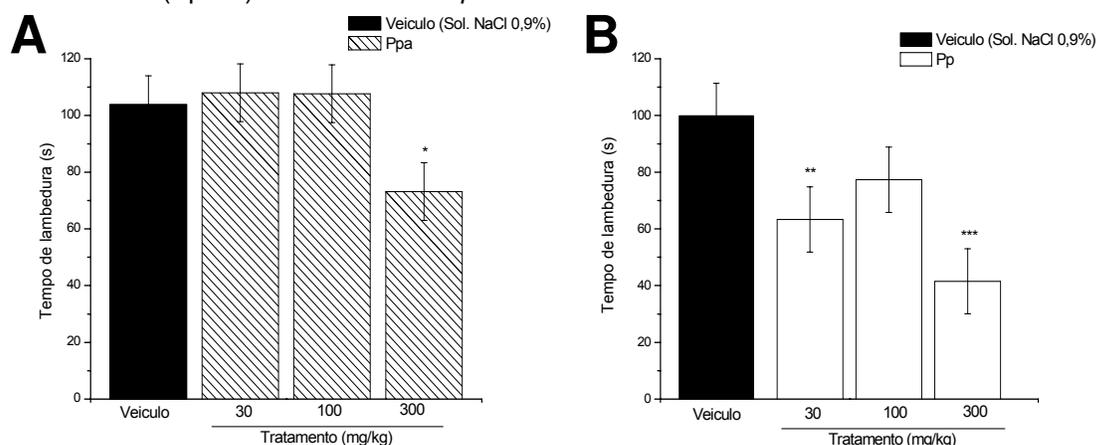
O resultado observado nesse modelo experimental sugeriu que o composto *m/z* 288 esteja diretamente relacionado ao efeito farmacológico dos extratos de *P. pubescens*, uma vez que sua maior concentração relativa no extrato Pp aumentou sua atividade farmacológica evidenciado pela redução significativa das contorções abdominais na dose de 10 mg/kg.

Dando sequencia aos estudos farmacológicos foi realizado o modelo de lambadura de pata induzido por formalina, nesse protocolo experimental, a injeção subplantar de formalina (2% formol em solução NaCl 0,9%, 20µL/pata) na pata posterior direita de camundongos produz intensa resposta nociceptiva em duas fases distintas: a primeira de 0 a 5 minutos (dor neurogênica) e a segunda de 25 a 40 minutos (dor inflamatória - Dubuisson & Dennis 1977; Abbott, 1997).

Na primeira fase, os animais previamente tratados (60 min.) pela via oral com veículo (solução NaCl 0,9%, 10 mL/kg), apresentaram o tempo de reação de 103 ± 10 segundos, com o extrato aquoso e 99 ± 8 segundos, com o extrato diclorometano. O pré-tratamento com o extrato aquoso nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg (v.o.), apresentou-se efetivo somente na maior dose reduzindo em

29,5% (73 ± 10 s) o tempo de reação na primeira fase. Já o tratamento com o extrato diclorometano, nas mesmas doses, inibiu 36,23% (63 ± 11 s), 22,53% (77 ± 9 s) e 58,42% (41 ± 8 s), respectivamente, na mesma fase (Figura 13).

Figura 13: Gráfico demonstrando os resultados da Fase I no modelo de lambertura de pata induzido por formalina em camundongos previamente tratados com o extrato aquoso (Ppa - A) ou diclorometano (Pp - B) dos frutos de *P. pubescens*.



Leg

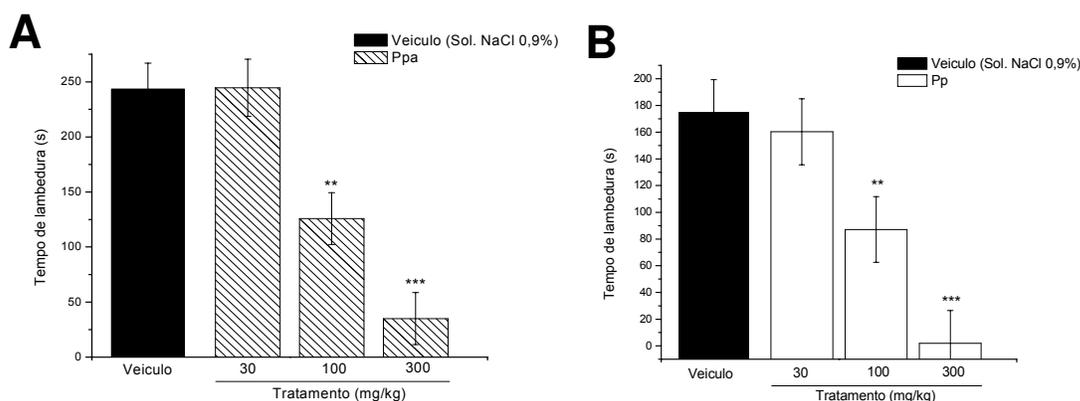
enda: Camundongos previamente tratados (60 min.) pela via com veículo (solução NaCl) (10mL/kg), Ppa ou Pp nas doses de 30, 100 ou 300 mg/kg. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão da média de até 6 animais por grupo experimental (A: ANOVA * $p \leq 0,05$; B: ANOVA: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

A fase I desse protocolo experimental é caracterizada pela produção da dor neurogênica, através da estimulação direta de terminações aferentes nociceptivas. A participação de mediadores periféricos como a substância P, bradicinina, histamina e serotonina é bem comprovada. Na medula, a mediação ocorre principalmente através da liberação de substância P e glutamato. Esta fase é inibida por agonistas opióides, como a morfina, e por agonistas ou antagonistas de receptores de bradicinina B1 e B2 (Hunskar *et al.*, 1986, Hunskar & Hole, 1987; Zhang & Ren, 2011). Nessa fase, o extrato aquoso demonstrou atividade somente na dose de 300 mg/kg enquanto o extrato diclorometano demonstrou efetividade em todas as doses testadas. As análises cromatográficas dos extratos (Figura 9) evidenciaram que o composto geranilgeraniol foi detectado somente no extrato diclorometano de *P. pubescens* sugerindo que este composto estivesse envolvido na ação antinociceptiva tanto por mecanismos centrais quanto periféricos. Estudos realizados por Spindola (2010), sugeriram que os compostos geranilgeraniol e $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapano- 17β oato de metila poderiam exercer as suas

propriedades antinociceptiva, pelo menos em parte, através do sistema serotoninérgico, influenciando as vias descendentes inibitórias do mecanismo de nocicepção, o que justifica a atividade do extrato diclorometano na Fase I desse modelo experimental.

Logo, na Fase II, os animais previamente tratados (60 min.) pela via oral, com veículo (solução NaCl 0,9% 10 mL/kg), apresentaram tempo de reação de 243 ± 23 segundos, com o extrato aquoso, e 174 ± 24 segundos e com o extrato diclorometano. O pré-tratamento com o extrato aquoso nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg (v.o.) apresentou-se efetivo nas doses de 100 e 300 mg/kg reduzindo 48,28% (125 ± 20 s) e 85,61% (35 ± 18) o tempo de reação respectivamente. Já o tratamento com o extrato diclorometano nas mesmas doses inibiram 8,20% (160 ± 17 s), 50,09% (87 ± 20 s) e 98,90% (2 ± 18 s) respectivamente (Figura 14).

Figura 14: Gráfico demonstrando os resultados da Fase II no modelo de lambertura de pata induzido por formalina em camundongos previamente tratados com o extrato aquoso (Ppa - A) ou diclorometano (Pp - B) dos frutos de *P. pubescens*.



Legen

da: Camundongos previamente tratados (60 min.) pela via com veículo (solução NaCl) (10mL/kg), Ppa ou Pp nas doses de 30, 100 ou 300 mg/kg. Os resultados são expressos em média ± erro padrão da média de até 6 animais por grupo experimental (A: ANOVA ** p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,005; B: ANOVA: ** p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,005).

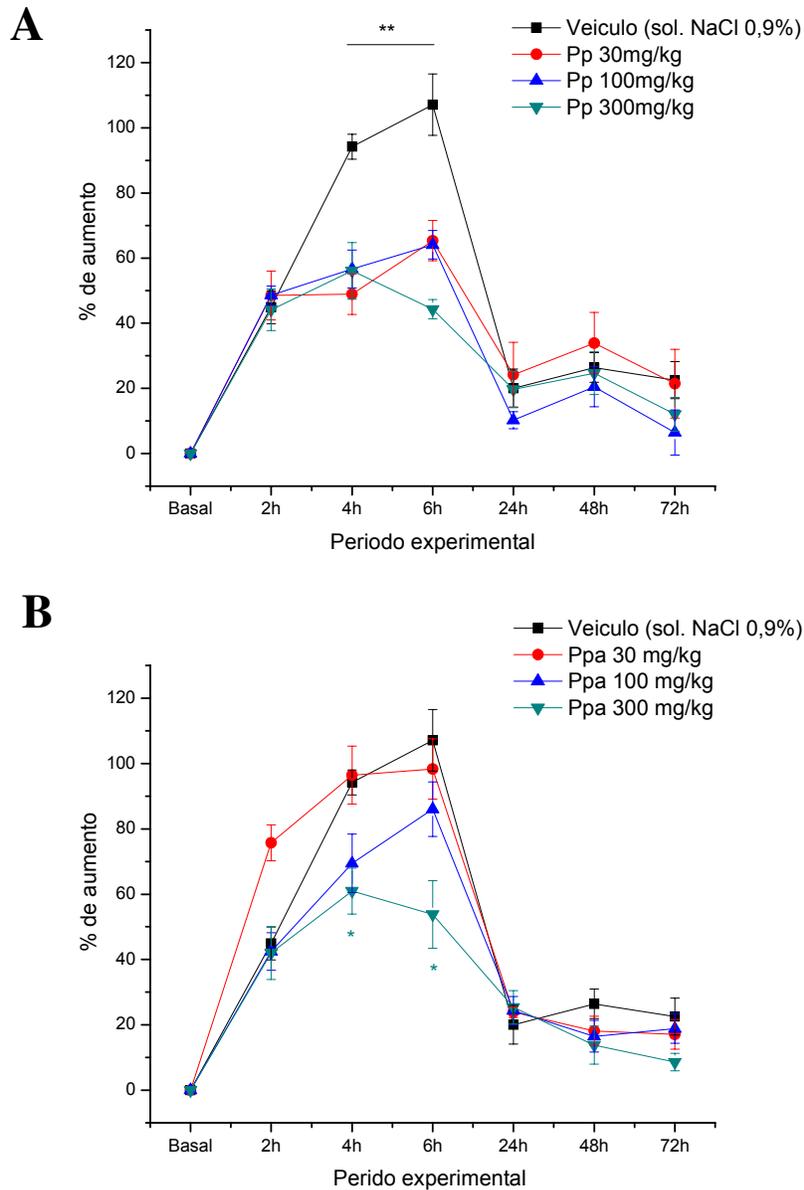
A Fase II coincide com o aparecimento da dor de origem inflamatória, ocorrendo entre 25 e 45 minutos após a injeção da formalina e está relacionada com a produção e liberação de vários mediadores pró-inflamatórios como a histamina, serotonina, prostaglandinas e bradicinina. Essa fase é sensível aos anti-inflamatórios não esteroidais, esteroidais e aos analgésicos opióides de ação central ou periférica (Hunnskaar *et al.*, 1986, Hunnskaar & Hole, 1987; Zhang & Ren, 2011).

Os resultados obtidos nessa fase demonstraram a atividade anti-inflamatória semelhante para ambos extratos nas doses de 100 e 300 mg/kg reduzindo o tempo de lambeduras na pata em, aproximadamente, 50 % e 90 %, respectivamente, indícios que a ação dos compostos de esqueleto vouacapano estejam mais relacionados com a redução do processo inflamatório, uma vez que a soma das concentrações relativas dos compostos m/z 362, e m/z 404 A e B nos extratos aquoso (28,22%) e diclorometano (24,82%) são semelhantes. A ação anti-inflamatória dos extratos na Fase II deu suporte para a avaliação da atividade anti-inflamatória e antihiperálgica nos modelos de edema de pata e hiperalgesia induzidos por carragenina.

O edema inflamatório induzido pela injeção de carragenina é resultante da ação sequencial e integrada de vários mediadores inflamatórios. Nos primeiros 60 a 90 minutos ocorre a liberação de histamina, serotonina, bradicinina, PAF, substância P e prostaglandinas, dentre outras substâncias. A partir desse momento o edema é mantido principalmente pela produção de prostaglandinas, atingindo um pico entre 4^a e 6^o horas. De 24^a a 72^a horas a mediação inflamatória depende principalmente da produção de citocinas (Lapa *et al.*, 2008; Zhang & Ren, 2011).

Observou-se uma redução do edema da pata nos animais tratados com Pp (doses 30, 100 e 300 mg/kg, v.o) Ppa (dose de 300 mg/kg, v.o) a partir da 4^a hora após administração da carragenina ação que permaneceu até 24^a hora (Figura 15). Esperar-se-ia um segundo pico decorrente a resposta inflamatória celular entre a 24^a a 72^a entretanto esse pico não foi evidenciado nesse estudo.

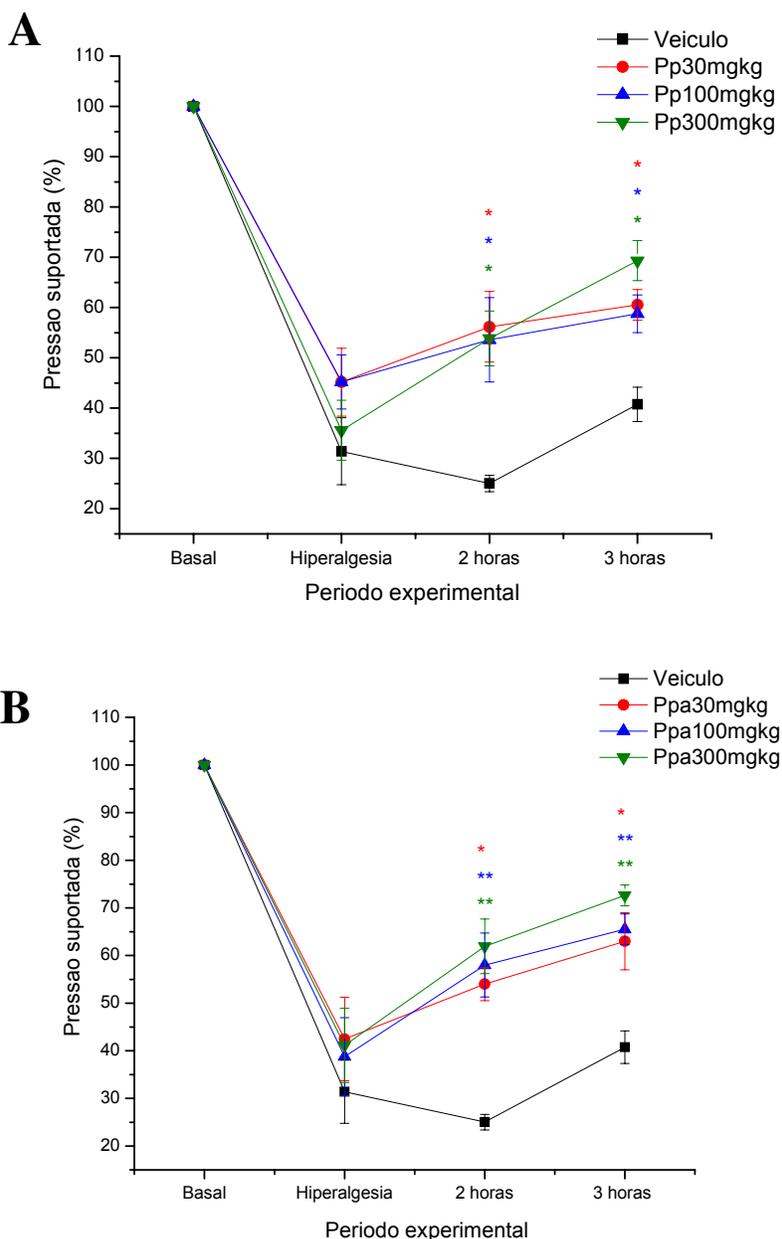
Figura 15: Efeito do pré-tratamento com o extrato diclorometano (A - Pp) extrato aquoso (B - Ppa) de *P. pubescens* no modelo de edema de pata induzido por carragenina.



Legenda: Camundongos previamente tratados (60 min.) pela via com veículo (solução NaCl 0,9% (10mL/kg), Ppa ou Pp nas doses de 30, 100 ou 300 mg/kg. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão da média de até 6 animais por grupo experimental (A: ANOVA ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$; B: ANOVA: ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$).

No modelo de hiperalgesia a injeção subplantar de carragenina produziu hiperalgesia 2h e 30min após a aplicação do agente inflamatório (Figura 16).

Figura 16: Efeito do pré-tratamento com o extrato diclorometano (Pp) extrato aquoso (Ppa) de *P. pubescens* Benth no modelo de hiperalgesia de pata induzido por carragenina.



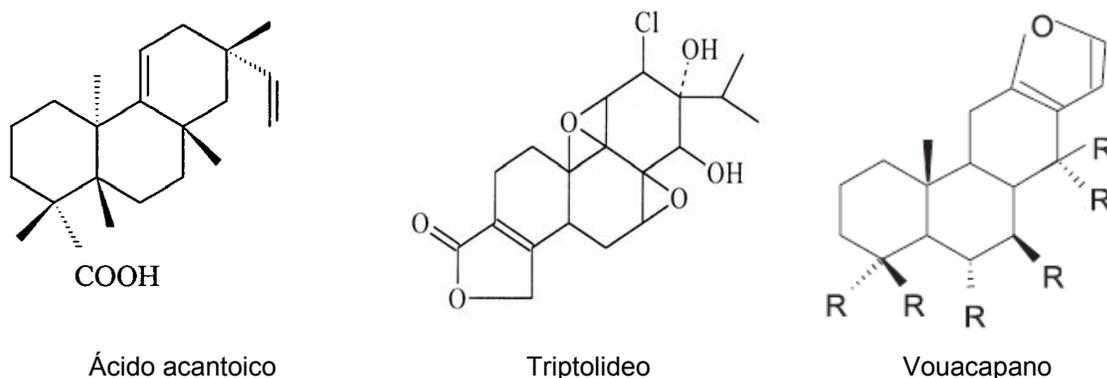
Legenda: Ratos previamente tratados (60 min.) pela via com veiculo (solução NaCl 0,9% (10mL/kg), Ppa ou Pp nas doses de 30, 100 ou 300 mg/kg. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão da média de até 6 animais por grupo experimental (A: ANOVA ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$; B: ANOVA: ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$).

De acordo com Lappa (2008), o edema inflamatório é decorrente da interação sinérgica entre mediadores que aumentem a permeabilidade vascular, com mediadores que causam a vasodilatação. Portanto fármacos que inibam a produção ou ação de algum desses mediadores vão reduzir o potencial

inflamatório e conseqüentemente a sensibilização de nociceptores. A redução do edema de pata a partir da 4ª hora, associado ao aumento do limiar nociceptivo evidenciado no modelo de hiperalgesia sugerem que os compostos vouacapanos, de alguma forma, atuam inibindo a ação da prostaglandinas.

Em alguns estudos foi evidenciado que diterpenóides como o ácido acantoico (diterpeno cíclico isolado da espécie *Acanthopanax koreanum*) e o Triptolideo (diterpeno cíclico isolado da espécie isolado da *Tripterygtium wilfordii*) apresentaram atividade anti-inflamatória inibindo a enzima cicloxigenase II (COX II - Prabhala , Pai & Prabhala, 2013). Uma vez que os extratos Pp e Ppa apresentaram em sua composição compostos com esqueleto vouacapanico que são estruturalmente analogos ao esqueleto básico dos diterpenos isolados do *A. koreanum* e *T. wilfordii* (Figura 17), acredita-se que a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da *P. pubescens* também possa estar relacionada a inibição da formação de prostanóides pela inibição da enzima COX. Entretanto mais estudos devem ser realizados para a confirmação desse dado.

Figura 17: Diterpenóides cíclicos isolados das espécies *Acanthopanax koreanum* (Ácido acantoico) da *Tripterygtium wilfordii* (Triptolideo) e *Pterodon pubescens* (Vouacapano)



Spindola *et al.*, (2010) comprovaram a eficácia antinociceptiva dos compostos m/z 288 e m/z 362 isolados, e observou que o extrato bruto contendo $6\alpha,7\beta$ -dihidroxivouacapano- 17β -oato de metila (m/z 362 - equivalente a 4,7 mg/kg) e o geranilgeraniol (m/z 288 - equivalente a 34,6 mg/kg) tiveram a mesma eficácia que cada composto isoladamente, todos testados na dose de 100 mg/kg, sugerindo o efeito sinérgico entre os compostos do extrato.

No presente estudo foi observado uma menor potência, nos modelos de contorção abdominal, formalina e edema de pata, do extrato aquoso quando comparado ao extrato diclorometano. Ao relacionar o perfil cromatográfico dos extratos produzidos (Figura 14 e Tabela 2) verificou-se uma diferença no teor dos compostos marcadores, principalmente no teor composto geranilgeraniol (não detectado no extrato aquoso) sugerindo que esse composto esteja relacionado com a potência dos extratos produzidos de *Pterodon pubescens* Benth.

O modelo de artrite induzida por Adjuvante Completo de Freund (*Complete Freund's Adjuvant* – CFA) em ratos é um modelo bastante empregado na investigação de novas terapias para artropatias inflamatórias crônicas, como a artrite reumatoide. Nesse modelo, a artrite é induzida com uma única injeção intraplantar de CFA, um adjuvante com antígeno *Mycobacterium tuberculosis* emulsificado com óleo mineral. O CFA atua como estimulante de resposta imunológica a antígenos, incluindo imunidade celular e aumento da produção de certas imunoglobulinas, levando ao desenvolvimento de uma reação articular inflamatória intensa dependente de células T, além do aumento persistente da produção local e sistêmica de TNF e interleucinas inflamatórias (Venkatesha, 2011; Nanjudaiad, 2013).

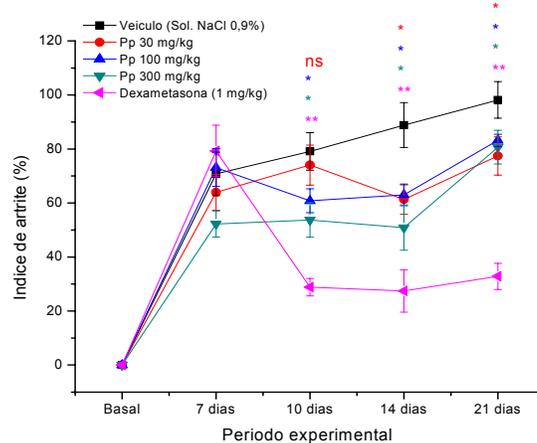
O desenvolvimento da artrite nesse modelo experimental inicia-se de 4 a 7 dias após a injeção do adjuvante, os picos entre 15-17 dias, e em seguida passa por uma recuperação espontânea e gradual nos subsequentes 17-21 dias. Por demonstrar características inflamatórias, incluindo elevação de citocinas e resposta variável a diferentes drogas imunossupressoras, este modelo tem-se mostrado útil nos estudos de mecanismos imunopatogênicos da artrite reumatoide e no estudo não clínico de novas terapias (Neugebauer, 2007; Venkatesha, 2011).

Considerando, uma maior potência do extrato diclorometano associado ao maior rendimento do processo de extração, a atividade antiartrítica foi avaliada somente com esse extrato.

Foi observado que o tratamento durante 14 dias com o extrato diclorometano de *P. pubescens* nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg (v.o.), quando comparado ao grupo controle negativo (solução NaCl 0,9%), reduziu

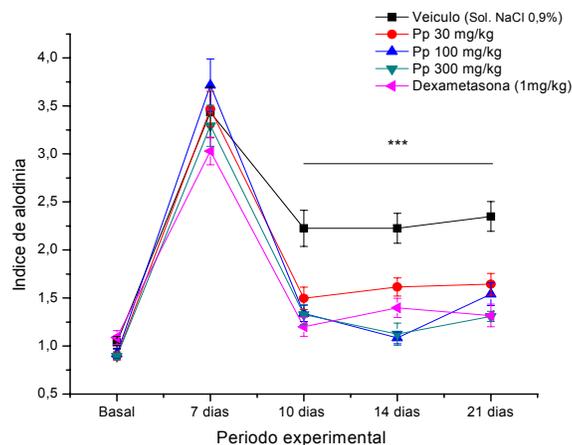
significativamente o índice de artrite nas doses de 100 e 300 mg/kg após o terceiro dia de tratamento. A dose de 30 mg/kg se mostrou efetiva a partir do sétimo dia de tratamento (Figura 18). O tratamento com o extrato Pp também reduziu significativamente o índice de alodínia a partir do terceiro dia da administração do mesmo (Figura 19).

Figura 18: Efeito do tratamento com o extrato diclorometano (Pp) de *P. pubescens* no índice de artrite induzido pela injeção de CFA em ratos.



Legenda: Animais tratados diariamente a partir do 7 dias com as doses de 30, 100 e 300 mg/kg por via oral, Cada ponto representa as médias do índice de artrite de seis animais \pm epm. Asteriscos denotam a significância estatística quando comparado aos valores do grupo controle: ns: não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$.

Figura 19: Efeito do tratamento com o extrato diclorometano (Pp) de *P. pubescens* Benth no índice de alodinia induzida pela injeção de CFA em ratos.



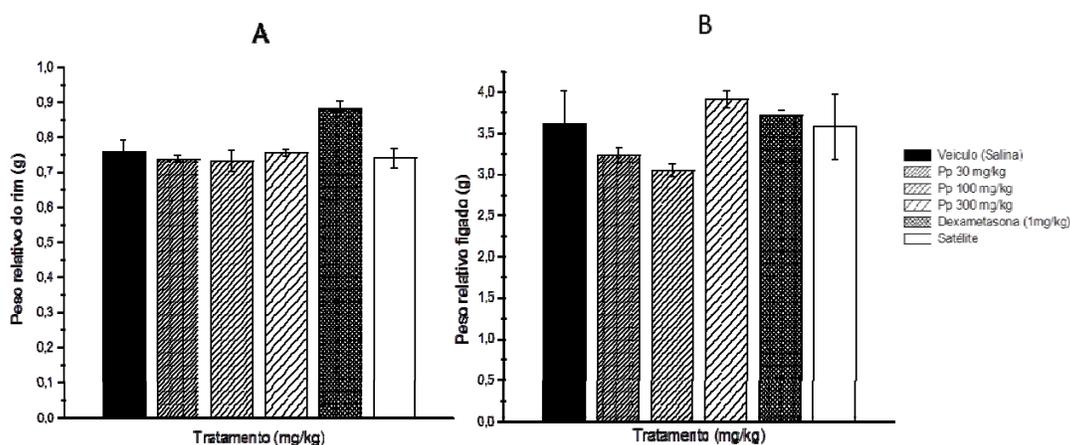
Legenda: Animais tratados diariamente a partir do 7 dias com as doses de 30, 100 e 300 mg/kg administrados por via oral. Cada ponto representa as medias do índice de alodinia de seis animais \pm SEM. Asteriscos denotam a significância estatística quando comparado aos valores do grupo controle: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

Segundo Venkatesha (2011), a resposta celular e humoral, liberação e manutenção de citocinas inflamatórias e migração celular para as articulações são atualmente os principais alvos de ação dos produtos naturais para o tratamento da artrite reumatoide. Os resultados observados no presente estudo sugerem que a atividade antiartrítica do extrato diclorometano dos frutos de *P. pubescens* pode estar relacionada à inibição do processo inflamatório, efeito ocasionado pela presença dos compostos vouacapanicos e a modulação da resposta nociceptiva por meio da ação do composto geranilgeraniol nas vias serotoninérgicas descendentes desse processo conforme o descrito por Spindola, 2010.

Com a finalidade de verificar as possíveis reações adversas com o tratamento com o extrato Pp nesse trabalho também foi avaliado a influencia da administração continua do esse extrato nas funções hepática e renal dos ratos.

Os resultados demonstram que o tratamento com o extrato diclorometânico de Pp não foi observada alteração da função hepática e renal, caracterizado pela não alteração do peso relativo dos órgãos (fígado e rim – Figura 20) e dos níveis sanguíneos das enzimas TGO, TGP, ALP (marcadores de função hepática) e ureia, creatinina e ácido úrico (marcadores de função renal – Tabela 3 e 4)

Figura 20: Peso relativo do rim (A) e fígado (B) de ratos com artrite reumatoide após tratamento de 14 dias com o extrato diclorometano de *P. pubescens*.



Legenda: Tratamento realizado por via oral e os valores expressos representam a médias do peso relativo dos órgãos de seis animais \pm erro padrão da média.

Tabela 3: Influencia de 14 dias de tratamento com o Pp nos níveis sanguíneos de ureia, creatinina, ácido úrico. em ratos com artrite reumatoide.

Tratamento	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Ácido úrico (mg/dL)
Veículo (Sol. NaCl 0,9%)	58,66 ± 2,54	<0,500	2,00 ± 0,02
Dexametasona (1 mg/kg)	53,69 ± 2,15	<0,500	2,00 ± 0,01
Pp 30 mg/kg	52,52 ± 2,32	<0,500	2,00 ± 0,01
Pp 100 mg/kg	51,07 ± 2,15	<0,500	2,00 ± 0,01
Pp 300 mg/kg	46,77 ± 2,32	<0,500	2,00 ± 0,01
Satélite	52,72 ± 2,54	<0,500	2,00 ± 0,02

Os tratamentos foram realizados pela via oral e os valores expressos representam a medias de seis animais ± epm. Asteriscos denotam a significância estatística quando comparado aos valores do grupo controle

Tabela 4: Influencia de 14 dias de tratamento com o Pp nos níveis sanguíneos TGO, TGP e ALP em ratos com artrite reumatoide.

Tratamento	TGO (U/L)	TGP (U/L)	ALP (U/L)
Veículo (Sol. NaCl 0,9%)	249,40 ± 19,45	15,28 ± 1,01	68,28 ± 8,22
Dexametasona (1 mg/kg)	236,14 ± 16,43	19,14 ± 0,85	62,06 ± 6,94
Pp 30 mg/kg	232,33 ± 17,75	13,07 ± 0,92	93,57 ± 7,50
Pp 100 mg/kg	224,57 ± 16,43	12,19 ± 0,85	58,61 ± 6,94
Pp 300 mg/kg	236,33 ± 17,75	10,91 ± 0,92	74,12 ± 7,50
Satélite	213,60 ± 19,45	14,12 ± 1,01	86,02 ± 8,22

Os tratamentos foram realizados pela via oral e os valores expressos representam a medias de seis animais ± epm. Asteriscos denotam a significância estatística quando comparado aos valores do grupo controle. Transaminase glutâmico oxalacética (TGO), transaminase glutâmico pirúvica (TGP) e fosfatase alcalina (ALP)

Dentre os medicamentos utilizados para minimizar os sintomas da artrite reumatóide destacam-se os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e os corticoides com o principal objetivo de reduzir a inflamação, evitar ou reduzir os danos nas articulações melhorando assim a qualidade de vida do paciente. Entretanto, os efeitos adversos como doenças no trato gastrointestinal, danos severos nas funções cardíaca, hepática e renal tem estimulado a pesquisa de novos fármacos para substituir esses medicamentos. O grande desafio é buscar um medicamento que aumente o limiar nociceptivo, reduza a inflamação e

paralelamente não apresente os mesmos efeitos adversos observados na terapia convencional. No presente trabalho, foi observado que o tratamento contínuo com o extrato Pp não alterou as funções hepática e renal dos ratos.

Sendo assim, a administração oral do extrato diclorometano se mostrou eficaz para o tratamento da atrite induzida pelo CFA, atuando possivelmente em na via inflamatória e principalmente na modulação da nocicepção, além de não alterar as funções hepática e renal dos animais tratados. Porém, mais estudos devem ser realizados para melhor esclarecer os mecanismos envolvidos e comprovar a segurança desse extrato.

Os fitoterápicos, assim como todos os medicamentos, devem atender a critérios de qualidade, eficácia e segurança, como preconizado na resolução da ANVISA RDC nº 14 (Brasil, 2010). A qualidade deve ser alcançada mediante o controle das matérias-primas e do produto acabado através de estudos que garantam a reprodutibilidade de lotes e estabilidade.

A estabilidade de fármacos pode ser alterada por fatores extrínsecos, relacionados à condições externas (como tempo, temperatura, luz, oxigênio, umidade, material de acondicionamento, microrganismos e vibração), intrínsecos tais como a incompatibilidade física ou química (pH, reações de óxido-redução, reações de hidrólise, etc) e interações entre ingredientes da formulação com o material de acondicionamento (Ansel *et al.*, 2007; Gil, 2010).

Uma vez comprovada a atividade farmacológica do extrato aquoso de *P. pubescens* Benth., visando o desenvolvimento e produção de um medicamento fitoterápico, foi importante avaliar a estabilidade desse extrato. Para isso o extrato recém-produzido foi submetido a estudo de estabilidade forçada conforme preconizado na Resolução 01 de 2005 da ANVISA (Brasil, 2005).

O extrato foi armazenado a temperatura de 45°C e umidade relativa de 75% durante um período de 180 dias. Durante esse período foram realizadas análises organolépticas, físico-químicas, teor dos compostos marcadores e também foi avaliado se a atividade farmacológica foi preservada através do modelo de contorção abdominal, nos tempos inicial (T0), 90 (T90) e 180 (T180) dias.

Após 90 dias do estudo de estabilidade observaram-se alterações macroscópicas no aspecto do extrato aquoso, caracterizado pelo escurecimento e enrijecimento da amostra em comparação ao tempo inicial (Figura 21).

Figura 21: Comparação do extrato bruto aquoso de *Pterodon pubescens* Benth livre após estudo de estabilidade acelerada



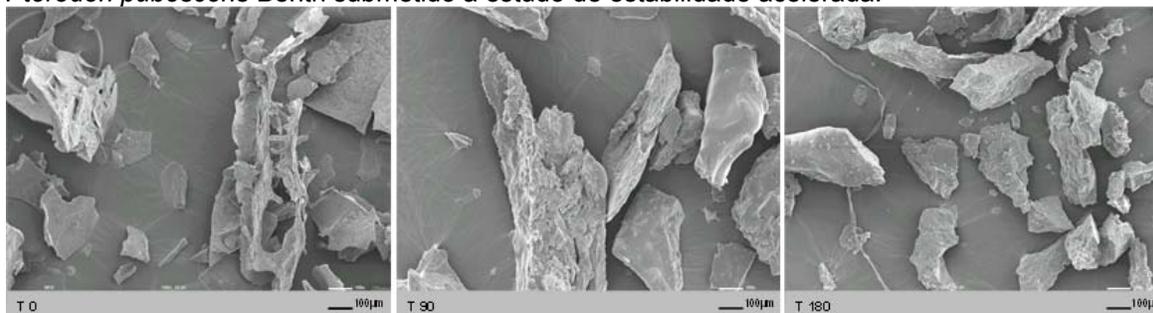
Legenda: armazenamento a 40°C e 75% UR; T0: tempo inicial; T90: 90 dias de armazenamento; T 180: 180 dias de armazenamento

As análises por microscopia eletrônica por varredura (MEV) não apresentaram diferenças no decorrer do período experimental (Figura 22). Os resultados obtidos nos estudos físico-químicos não demonstraram alterações drástica nos valores de pH, porém houve um ganho de umidade de 116,05 % após 180 dias de armazenamento (Tabela 5).

Tabela 5: Avaliação do pH e umidade do extrato aquoso de *P. pubescens* após estudo de estabilidade acelerada (armazenamento 40°C e 75% de UR) T0: tempo inicial; T90: 90dias de armazenamento; T180: 180 dias de armazenamento

	T 0	T 90	T 180
Umidade	9,78 ± 0,06	11,09 ± 1,12	21,13 ± 0,37
pH	4,95 ± 0,02	4,85 ± 0,01	4,82 ± 0,01

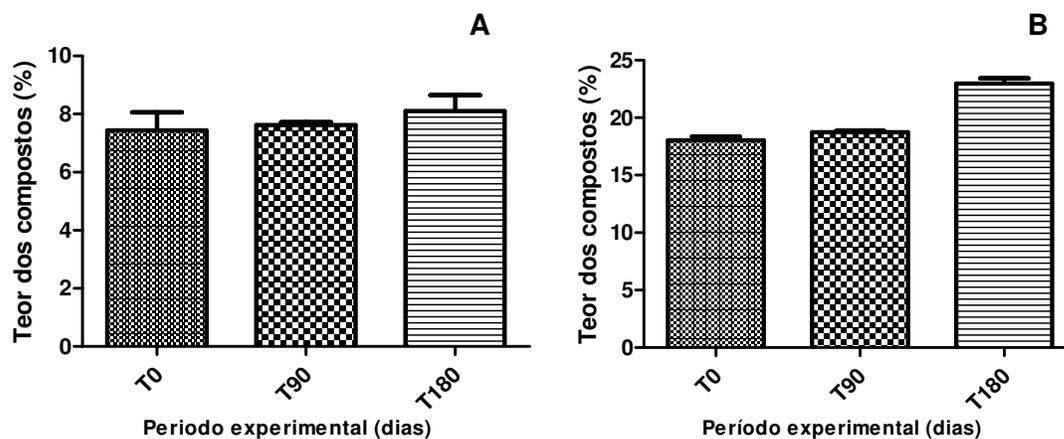
Figura 22: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do extrato aquoso de *Pterodon pubescens* Benth submetido a estudo de estabilidade acelerada.



Legenda: Aumento de 100X e 15kv. armazenamento a 40°C e 75% UR ; T0: tempo inicial; T90: 90dias de armazenamento; T180: 180 dias

As análises cromatográficas (CG-EM e quantificação por normalização de área) mostraram que o teor do composto m/z 362 permaneceu constante durante todo o período experimental e que houve um aumento de 20,3% na concentração dos compostos de m/z 404 (Figura 23).

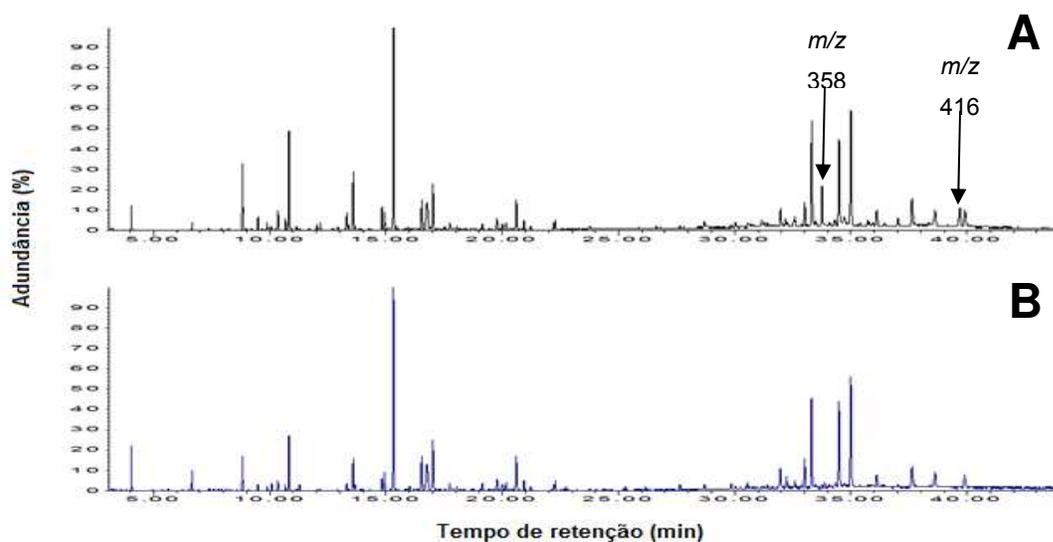
Figura 23: Comparação do teor do composto vouacapanos m/z 362 – A e a mistura dos isômeros m/z 404. presentes no extrato aquoso de *Pterodon pubescens* após o estudo de estabilidade acelerada



Legenda: Composto m/z 362: $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapano- 17β oato de metila; m/z 404: 6α -hidroxi- 7β -acetoxi-vouacapano- 17β -oato de metila e 6α -acetoxi- 7β -hidroxi-vouacapano- 17β -oato de metila. (armazenamento 40°C e 75% de UR) T0: tempo inicial; T90: 90dias de armazenamento; T180: 180 dias de armazenamento

Nos cromatogramas, gerados por CG-EM, do extrato aquoso no tempo inicial e após 180 dias de armazenamento, observou-se a supressão dos picos m/z 358 e m/z 416 nos tempos de retenção 33,71 min e 39,68 min o que sugere que o composto de m/z 404 seja um produto de degradação desses outros compostos, entretanto outros estudos devem ser realizados para verificar a via de formação desse composto (Figura 24).

Figura 24: Cromatogramas normalizados, obtidos por CG/EM, do extrato aquoso submetido ao estudo de estabilidade.

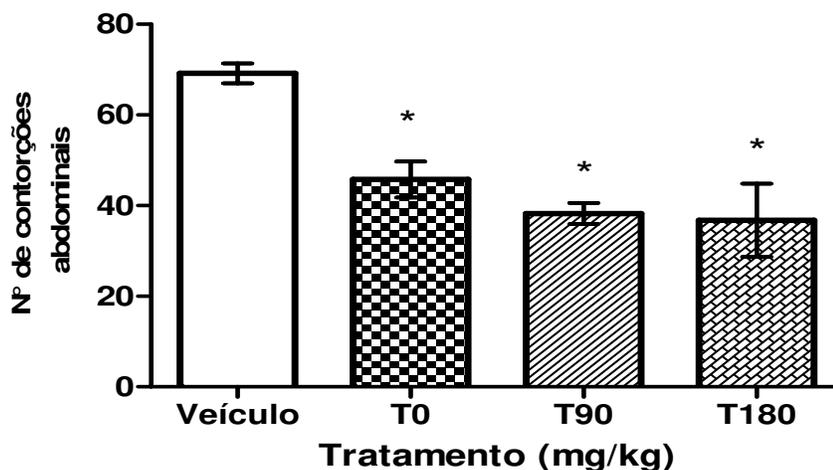


Legenda: A: cromatograma do extrato aquoso no tempo inicial. B: cromatograma do extrato aquoso após 180 dias de armazenamento

O monitoramento da atividade antinociceptiva do extrato submetido ao estudo de estabilidade foi realizado pelo modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético. Como o extrato aquoso demonstrou já se mostrou efetivo nesse modelo experimental, optou-se somente pela utilização da dose de 30 mg/kg para o monitoramento da atividade farmacológica.

No grupo controle, previamente tratado com veículo (solução NaCl 0,9% a 10 mL/kg, v.o.), a injeção de ácido acético (0,8% em solução NaCl 0,9%; 10 mL/kg i.p.) induziu 69 ± 2 contorções durante os 15 minutos de avaliação experimental. O pré-tratamento com as amostras T0, T90 e T180 na dose de 30 mg/kg (v.o.), reduziu o número de contorções abdominais em 33,85% (45 ± 4), 53,65% (38 ± 2) e 48,78% (36 ± 8), respectivamente (Figura 25).

Figura 25: Gráfico demonstrando os resultados da avaliação da atividade antinociceptiva do extrato aquoso após estudo de estabilidade.



Legenda: Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético (em camundongos previamente tratados (60 min.) pela via oral com o veículo (Solução NaCl 0,9%, 10mL/kg), e extrato aquoso nos tempos inicial (T0); 90 dias de armazenamento (T90) e 180 dias de armazenamento (T180) na dose de 30 mg/kg. Os resultados são expressos em média ± erro padrão de até 6 animais por grupo experimental (ANOVA:*p ≤0,05).

Durante o período experimental, observamos um aumento da umidade de 116,0 %. Esse aumento de umidade pode promover reações de hidrólise e acelerar a cinética de degradação dos compostos do extrato reduzindo sua estabilidade (Ansel *et al.*, 2007). Durante o período experimental não foi observado alterações drásticas no pH, por outro lado, as análises cromatográficas demonstraram que, durante o estudo de estabilidade, o teor do composto *m/z* 362 permaneceu constante e que houve um aumento significativo de 20,3 % na concentração de compostos vouacapânicos de *m/z* 404 após 180 dias.

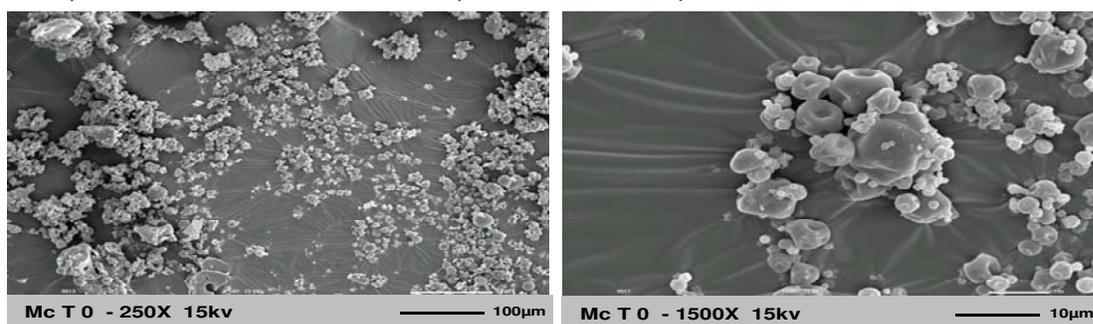
A adsorção de água pelo extrato alterou suas características físicas sendo que, após 90 dias, ele apresentou-se rígido e compacto o que trouxe dificuldades em sua manipulação (diminuição da solubilidade, e aumento da coesão e aderência), limitando sua produção em grande escala.

A fim de solucionar os problemas observados com o extrato livre, foi realizado a microencapsulação do extrato aquoso. A técnica de microencapsulação é uma ferramenta amplamente utilizada pela indústria farmacêutica para minimizar dificuldades farmacotécnicas relacionadas ao fármaco (solubilidade, higroscopicidade, volatilidade, entre outros), problemas

relacionados a proteção do produto (contra luz, umidade, pH) além de alterar parâmetros farmacocinéticos (Tomaro Duchesneau *et al.*, 2013). Neste estudo, as micropartículas foram produzidas pela técnica de atomização utilizando como material formador de parede a goma arábica devido sua alta solubilidade, baixa viscosidade e boas propriedades emulsificantes (Carneiro, 2013).

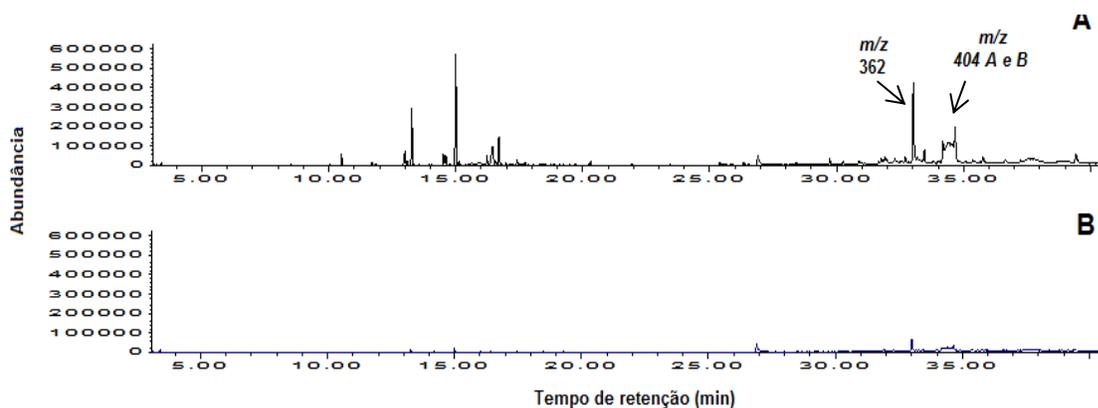
A análise de microscopia (MEV) mostrou que as partículas apresentaram uma forma esférica, com superfície rugosa e ampla faixa de populações de partículas que variaram de 10 a 100 μm , características típicas de micropartículas produzidas por secagem por pulverização (Figura 26). A encapsulação dos compostos marcadores foi evidenciada pela detecção dos compostos m/z 362 e m/z 404 (tempo de retenção 33 min e 34 min respectivamente) na fase interna das partículas e pela ausência dos mesmos na da fase externa das partículas (Figura 27).

Figura 26: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das micropartículas oriundas do extrato aquoso de *Pterodon pubescens* Benth.



Legenda: Aumento de 250 e 1500 X e 15kv.

Figura 27: Cromatogramas, obtidos por CG/EM, da fase interna (recheio - A) e externa (B) de microcápsulas oriundas do extrato aquoso de *P. pubescens*.



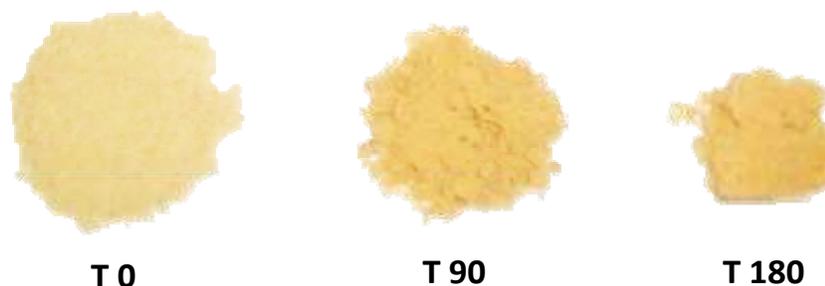
Legenda: Composto m/z 362: 6 α ,7 β -diidroxivouacapano-17 β oato de metila; m/z 404 A: 6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-vouacapano-17 β -oato de metila e m/z 404 B: 6 α -acetoxi-7 β -hidroxi-vouacapano-17 β -oato de

Posteriormente, as micropartículas foram submetidas ao estudo de estabilidade acelerada conforme Resolução nº1 de 2005 da ANVISA.

Durante o período experimental, não foram observadas diferenças macroscópicas nas micropartículas oriundas do extrato aquoso de *P. pubescens* nos tempos inicial e após 90 dias de armazenamento (Figura 28 e 29). Após 180 dias foi observado o aparecimento de grumos decorrente à aglomeração das partículas.

No decorrer do estudo de estabilidade, assim como no extrato livre, também não foram observado alterações drásticas no pH das partículas produzidas e houve um aumento de umidade de 50,30% na micropartículas após 180 dias de armazenamento (Tabela 6).

Figura 28: Comparação do aspecto das microcapsulas oriundas o extrato bruto aquoso de *Benth. pubescens* Benth. após estudo de estabilidade acelerada.



Legenda: armazenamento a 40°C e 75% UR; T0: tempo inicial; T90: 90 dias de armazenamento; T 180: 180 dias de armazenamento

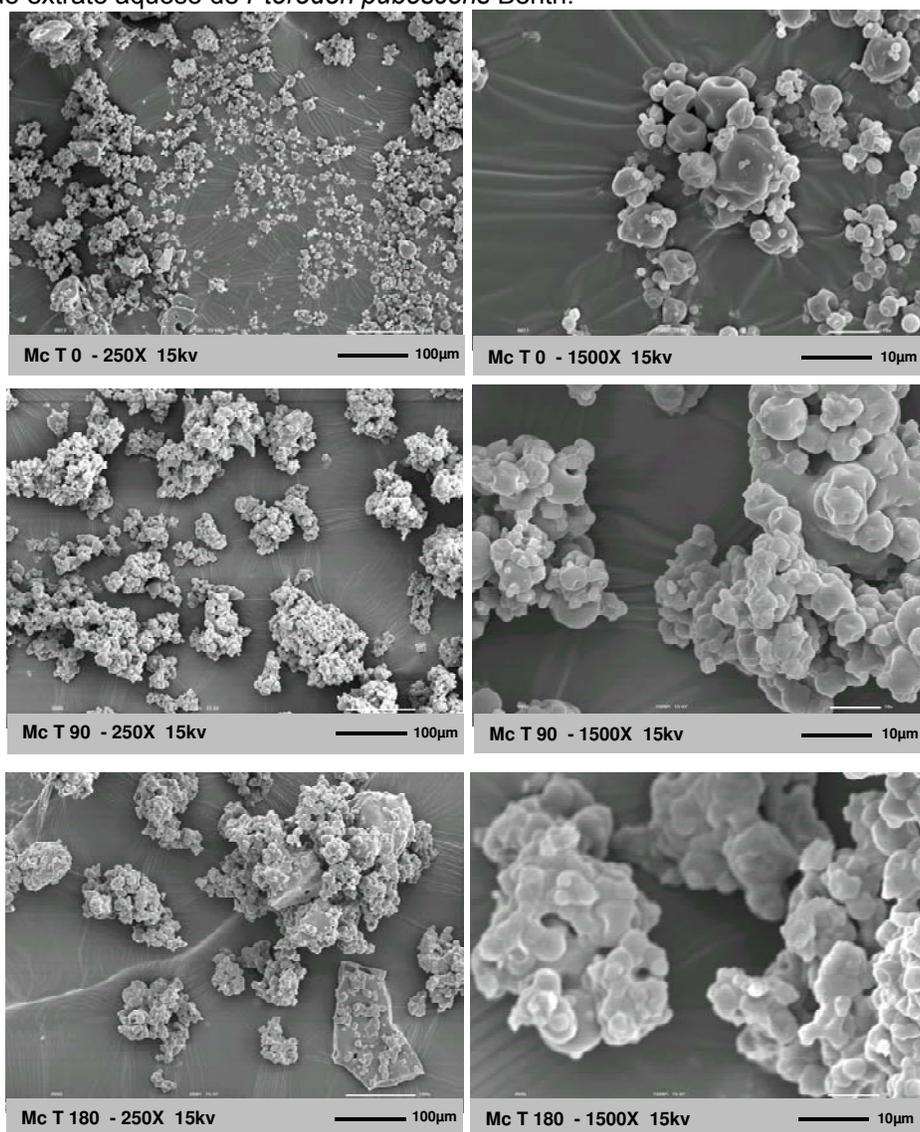
Tabela 6: Avaliação do pH e umidade das micropartículas oriundas do extrato aquoso de *P. pubescens* após estudo de estabilidade acelerada.

	Mc T 0	Mc T 90	Mc T 180
Umidade	9,74 ± 0,07	12,21 ± 0,12	14,64 ± 0,33
pH	4,88 ± 0,01	4,91 ± 0,03	5,03 ± 0,01

Armazenamento 40°C e 75% de UR;. Mc T0: tempo inicial; Mc T90: 90dias de armazenamento; Mc T180: 180 dias de armazenamento

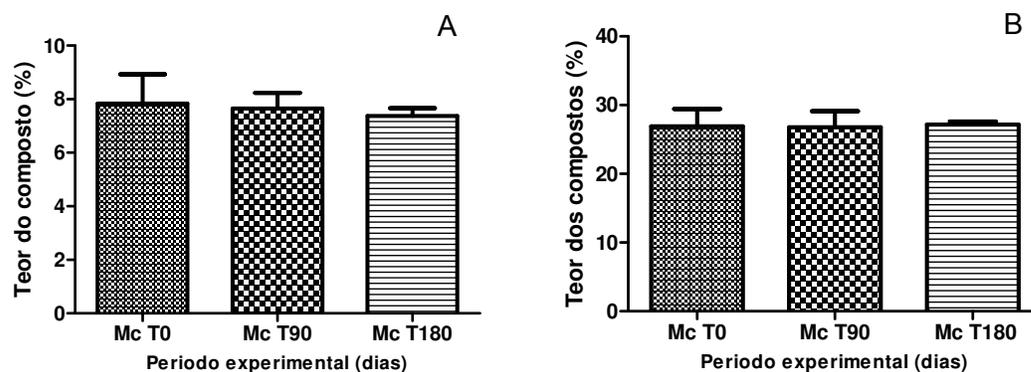
As análises por cromatografia (CG/EM) do extrato microencapsulado, após extração, mostraram que a concentração de compostos voucapanicos de *m/z* 362 e *m/z* 404 permaneceu constante durante todo o estudo de estabilidade (Figura 30).

Figura 29: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das micropartículas oriundas do extrato aquoso de *Pterodon pubescens* Benth.



Legenda: armazenamento a 40°C e 75% UR; T0: tempo inicial; T90: 90 dias de armazenamento; T 180: 180 dias de armazenamento.

Figura 30: Comparação do teor do composto vouacapanos m/z 362 – A e a mistura dos isômeros m/z 404. presentes nas micropartículas do extrato aquoso de *Pterodon pubescens* após o estudo de estabilidade acelerada.

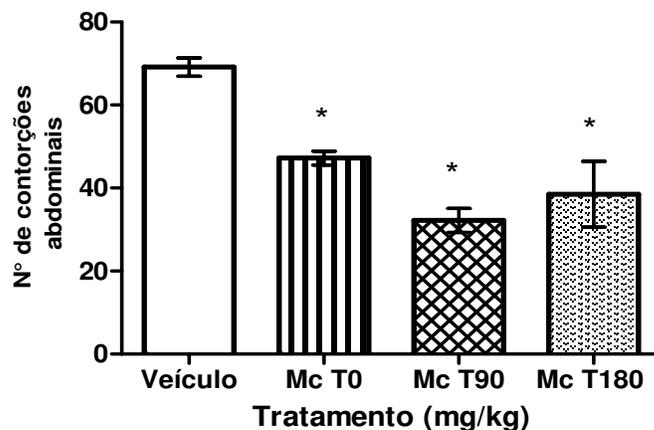


Legenda: Composto m/z 362: $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapano- 17β oato de metila; m/z 404: 6α -hidroxi- 7β -acetoxi-vouacapano- 17β -oato de metila e 6α -acetoxi- 7β -hidroxi-vouacapano- 17β -oato de metila. (armazenamento 40°C e 75% de UR) T0: tempo inicial; T90: 90dias de armazenamento; T180: 180 dias de armazenamento.

A preservação da atividade antinociceptiva das micropartículas também foi avaliada no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético, utilizando-se as micropartículas de Ppa nos tempos inicial (MCT0), 90 (MCT90) e 180 dias (MCT180), na dose de 30 mg/kg de extrato, por via oral.

No grupo controle, previamente tratado com veículo (solução NaCl 0,9% 10 mL/kg, v.o.), a injeção de ácido acético (0,8% em solução NaCl 0,9%, 10 mL/kg, i.p.) induziu 69 ± 2 contorções durante os 15 minutos de avaliação experimental. O pré-tratamento com as amostras MCT0, MCT90 e MCT180, na dose de 30 mg/kg, (v.o.), reduziu o número de contorções abdominais em 31,67% (47 ± 2), 53,44% (32 ± 3) e 44,34% (39 ± 8), respectivamente (Figura 31).

Figura 31: Gráfico demonstrando os resultados da avaliação da atividade antinociceptiva das micropartículas do extrato aquoso após submetido ao estudo de estabilidade.



Legenda: Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético (em camundongos previamente tratados (60 min.) pela via oral com o veículo (solução NaCl 0,9%, 10mL/kg), e micropartículas na tempos inicial (Mc T0); 90 dias de armazenamento (Mc T90) e 180 dias de armazenamento (Mc T180) na dose de 30 mg/kg. Os resultados são expressos em média ± erro padrão da média de até 6 animais por grupo experimental (ANOVA:*p ≤0,05).

Assim como no extrato livre, as micropartículas produzidas com o extrato aquoso de *P. pubescens* também apresentaram um ganho de umidade (50,30%), devido as condições drásticas de armazenamento, que modificou suas características físicas (presença de grumos).

Apesar disso, o processo de microencapsulação por *spray drying* preservou as características físico-químicas e atividade antinociceptiva do extrato aquoso demonstrando ser uma alternativa útil para prolongar o tempo de armazenamento desse extrato hidrofílico.

5 - CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que:

- ✓ O extrato aquoso apresentou atividade anti-inflamatória e antinociceptiva nos modelos propostos, corroborando a indicação popular porém, com menor potencia quando comparado ao extrato diclorometano.
- ✓ A potência da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da espécie *Pterodon pubescens* Benth., parece estar relacionada a ação sinérgica entre os compostos com esqueleto vouacapanico e o geranilgeraniol.
- ✓ A administração oral do extrato diclorometano se mostrou eficaz para o tratamento da atrite induzida pelo CFA, atuando em diferentes vias da doença simultaneamente. Porém mais estudos devem ser realizados para melhor esclarecer os mecanismos envolvidos
- ✓ O processo de microencapsulação por *spray drying* demonstrou ser uma alternativa útil para prolongar o tempo de armazenagem do extrato aquoso das sementes de *P. pubescens*, preservando suas características físicas e químicas.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, F.V., FRANKLIN, K.B.J., WESTBROOK, R.F., The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain**, v. 60, n. 1, p. 91-102, 1995.

ALVES, S.F.; BORGES, L.L.; DE PAULA, J.A.; VIEIRA, R.F. ; FERRI, P. H.; COUTO, R. O.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Chemical variability os the essential oils from fruits os *P emarginatus* in the brazilian cerrado. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 224-229, 2013.

ANSEL HC, POPOVICH NG, ALLEN-JR L.V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 8ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2007. 775 p.

APPLETON, I., Non-steroidal anti-inflammatory drugs and pain. In: DICKENSON, A.H.; BESSON, J.M. **The pharmacology of pain**. Springer, 1997, p. 43-60.

BALBINO, E.E.; DIAS, M.F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 992-1000, 2010.

BARNABE, C.; BESSETE, L.; FLANAGAN, C.; LECLERCEQ, S.; STEIMAN, F. K.; KUNG, T.; POPE, J.E.; HARAOU, B.; HOCHMAN, D.M.; THOME, C.; BYKERK, V. Sex Differences in pain scores and localization in inflammatory arthritis: A systematic review and metaanalysis. **Journal of Rheumatology**, v. 39, n.6, p. 1221-1230, 2012.

BENITA, S. **Microencapsulation Methods and Industrial Applications**. 6ª ed., Florida: Taylor & Francis Group, 2006. 784 p.

BRASIL. Agencia nacional de vigilância Sanitária. RDC 14, de 31 de março de 2010, **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos**. *Diário Oficial da União*; Brasília, 29 de março de 2010.

BRASIL. Agência nacional de vigilância Sanitária. Resolução 01, de 29 de julho de 2005, **Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade**. *Diário Oficial da União*; Brasília, 01 de agosto de 2005.

CABRAL, E. C.; SEVART, L.; SPINDOLA, H.M.; COELHO, M.B.; SOUSA, I.M.O.; QUEIROZ, N.C.A.; FOGGIO, M.A.; EBERLIN, M. N. ; RIVEROS, J. M. *Pterodon pubescens* Oil: Characterisation, Certification of Origin and Quality Control via Mass Spectrometry Fingerprinting Analysis. **Phytochemical Analysis**. v. 24, n. 3, p. 184-192, 2013.

CALIXTO, J. B. Medicamentos fitoterápicos In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001, p. 298-231.

CALIXTO, N.O.; DA COSTA E SILVA, M.C.; GAYER, C.R.; COELHO, M.G.; PAES, M.C.; TODESCHINI, A.R. Antiplatelet activity of geranylgeraniol isolated from *Pterodon pubescens* fruit oil is mediated by inhibition of cyclooxygenase-1. **Planta Medica**, v. 73, n. 5, p. 480-483, 2007.

CARDOSO, C.C.; PINTO, A.C.; MARQUES, P.R.; GAYER, C.R.M.; AFEL, M.I.R.; COELHO, M.G.P.; SABINO, K.C.C. Suppression of T and B cell responses by *Pterodon pubescens* seeds ethanolic extract. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 19, p. 2308 - 2313, 2007.

CARNEIRO, H.C.F., TONON, R.V., GROSSO, C.R.F. & HUBINGER, M.D. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. **Journal of Food Engineering**, v. 115, n. 4, p. 443-451, 2013.

CARR, D.B., GOUDAS, L.C. Acute pain. **Lancet**, v. 353, n. 9169, p. 2051 -2058, 1999.

CARVALHO, J.C.T., **Fitoterápicos. Anti-inflamatórios. Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. 1ª ed., São Paulo: Tecmedd, 2004, p.384-400.

CASTRO, M.A.S., **Mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do 3-O-Glicosil- diidrocanferol, flavonóide extraído dos rizomas de Cochlospermum regium (algodãozinho)**. [Tese] - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina, 2000

CERVERO, F.; LAIRD, J.M. *Visceral pain*. **Lancet**, v.19, n. 353, p. 2145-2148, 1999.

COELHO, L.; REIS, P.A.; LIMA, de C.F.; ROBERTO, C.; GAYER, M.; LOPES, C.; COSTA e SILVA, M.C.; SABINO, K.C.C.; TODESCHINI, A.R.; COELHO, G.P. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions os *Pterodon pubescens* Benth. seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v.98, n. 1-2, p. 109-116, 2005.

COELHO, M.G.P., MARQUES, P.R., GAYER, C.R.M., VAZ, L.C.A., NETO, J.F.N., SABINO, K.C.C., Subacute toxicity evaluation of a hydroalcoholic extract of *Pterodon pubescens* seeds in mice with collagen-induced arthritis, **Journal of Ethnopharmacology**, v.77, n. 2-3, p. 159-164, 2001.

DENNY, C., **Atividade antiinflamatória do óleo de sucupira *Pterodon pubescens* Benth.** Dissertação de Mestrado em Odontologia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 2002.

DUARTE, I.D.G.; ALVES, D.L.F.; VELOSO, D.P.; NAKAMURA-CRAG, M. Evidence of the involvement of biogenic amines in the antinociceptive effects vouacapan extrated from *Pterodon polygalaeflorus* Benth. **Journal of Ethnopharmacology**, v.55, n. 1, p. 13-18, 1996.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, n. 2, p. 161-174, 1977.

DUTRA, R.C.; BRAGA, F.G.; COIMBRA, E.S.; SILVA, A.D.; BARBOSA, N.R. Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n.2A, p. 429-435, 2009^b.

DUTRA, R.C.; PITTELLA, F.; FERREIRA, A.S.; LARCHER, P.; FARIAS, R.E.; BARBOSA, N.R. Efeito Cicatrizante das Sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel em Modelos de Úlceras Dérmicas Experimentais em Coelhos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 3, p. 375-382, 2009^a.

DUTRA, R.C.; TREVIZANI, R.; PITTELLA, F.; BARBOSA, N.R. Antinociceptive Activity of the Essential Oil and Fractions of *Pterodon emarginatus* Vogel Seeds. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n.6, p. 865-870, 2008.

FANG, Z., BHANDARI, B. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 1139-1147, 2011.

FERREIRA, J.F.S.; LUTHRIA, D.L.; SASAKI, T.; HEYERICK, A. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as Antioxidants and their potencial synergism with Artemisinin against Malaria and Cancer. **Molecules** v. 15, n. 5, p. 3135-3170, 2010.

FILKOVÁ, I.; MUJUMDAR, A.S. **Industrial Spray Drying systems in Handbook of Industrial drying**, A. S. Mujumdar. Marcel Dekker Inc. New York, 742, 1995.

GIL, E.S. **Controle físico químico de qualidade de medicamentos** 3^a ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010, 512 p.

GOELDNER, I.; SKARE, T.L.; MESSIAS, I.T.; UTIYAMA, S.R. Artrite reumatóide: uma visão atual. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 47, n. 5, p. 495-503, 2011.

GRANADA, A.; NEMEN, D. ; DORA, C. L. ; NECKEL, G. L.; LEMOS-SENNA, E. O emprego de sistemas de liberação como estratégia para melhorar as propriedades terapêuticas de fármacos de origem natural: o exemplo da camptotecina e seus derivados. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 28, n. 2, p. 129-139, 2007.

HEINRICH, M.; BARNES, J.; GIBBONS, S. & WILLIAMSON, E. M. **Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy**, 4^o ed., Londres: Churchill Livingstone , 2007, 319 p.

HILDEBERT, W. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**., v.16, n. 2-3, p. 97-110, 2011.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v.30, n. 1, p. 103-114, 1987.

HUNSKAAR, S.; BERGER, O.G; HOLE, K. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. **Pain**, v. 25, n. 1, p. 125-132, 1986.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E.J., *Acetic acid* for analgesic screening, **Federation proceeding**, v. 18, p. 412-416, 1959.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDOM, R. Microencapsulation of *Morinda citrifolia* L. extract by spray drying. **Chemical Engineering Research and Desing**, v. 90, n. 5, p. 622-632, 2012.

LAPPA, A.J.; SOUCCAR C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; CASTRO, M.S.A.; DE LIMA,T.C.M. **Plantas Medicinais: Métodos de avaliação da atividade farmacológica**. Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais, 2008.

LOESER, J.D.; MELZACK, R., Pain: an overview. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1607-1609, 1999.

MCINNES, I.B.; SCHETT, G. The Pathogenesis of rheumatoid. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n.23, p. 2205-2219, 2011.

MEEUS, M.; VERVISCH, S.; De CLERCK, L.S; MOORKENS, G. ; HANS, G. NIJS, J. Central sensitization in patients with rheumatoid arthritis: A systematic literature review. **Seminars in arthritis and rheumatism**. v. 41, n.4, p. 556-567, 2012

MEHNERT, W.; MÄDER, K. *Solid lipid nanoparticles: production*, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery. Reviews**, v. 47, n. 2-3, p. 165-196, 2001.

MENNA-BARRETO, R.F.S.; LARANJA, G.A.T.; SILVA, M.C.C.; COELHO, M.G.P.; PAES, M. C.; OLIVEIRA, M.M.; DE CASTRO, S. L. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. **Parasitology Research**, v.103, n.1, p. 111-117, 2008.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, n. 6,

p. 355-474, 2002.

MORAES, W.F.; GALDINO, P.M. NASCIMENTO, M.V. Triterpenes involved in the anti-inflammatory effect of ethanolic extract of *Pterodon emarginatus* Vogel stem bark. **Journal of Natural Medicines**. v.66, n.11, p.202-207, 2012.

MOREIRA, G.E.G. **Obtenção e caracterização de extrato microencapsulado de resíduo agroindustrial de acerola**. [dissertação], UFRN- Departamento de Engenharia Química, 2007.

MOTA, L.M.H.; SANTOS NETO, L.L.; BURLINGAME, R.; MENARD, H.; LAURINDO, I.M.M. Características laboratoriais de um grupo de pacientes com artrite reumatóide inicial. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v.50, n.4, p. 375-388, 2010.

MOTA, L.M.H; CRUZ B.A.; BRENOL, C.V.; PEREIRA, I.V., REZANDE-FRONZA, L.S.; BERTOLO, M.B.; FREITAS, M.V.C.; SILVA, N.A.; LOUZADA JR, P.; GIORGI, N.; LIMA, R.A.C.; PINHEIRO,G.R.C. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v.52, n.2, p.135-174, 2012.

NANJUNDAIAH, S., ASTRY, B., MOUDGIL, K.D. **Mediators of inflammation induced bone damage in arthritis and their control by herbal products**. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013, 20p;

NETTERANON, V.; ZHANG, G.; DARIEN, B. J.; PARKIN, K.. Isolation and synergism of in vitro anti-inflammatory and quimone reductase (QR) inducing agents the fruits of *Morinda citrifolia* (noni). **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2271-2277, 2011.

NEUGEBAUER, V., ADWANIKAR, H., HAN, J. FU, Y., JI, G. Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. **Molecular pain**, v. 3, n. 8, p. 1-13, 2007.

NEWMAN, D.J; CRAGG, G.M. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

NUNAN, E.A.; CARVALHO, M.G.; PILOVELOSO, D. Furane diterpenes with anti-inflammatory and pro-inflammatory activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 15 n. 6, p.450-451, 1982.

OBEIDAT, W. M. Recent patents Review in Microencapsulation of Pharmaceuticals Usin the Emulsion Solvente Removal Methods. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**. v. 3, n. 3, p. 178-192, 2009.

OLIVEIRA, C.J. & ARAUJO, T.L. Plantas medicinais: uso e crenças de idosos portadores de hipertensão arterial. **Revista Eletrônica de Enfermagem**. v.9, n.1, p. 93-195, 2007.

OLIVEIRA, P. C.; PAULA, C.A.; REZENDE, S.A.; CAMPOS, F.T.; GUIMARÃES, A.G.; LOMBARDI, J.A.; GUIMARÃES, D.A.S. Anti-inflammatory activity of *Lychnophora passerina*, Asteraceae (Brazilian "Arnica). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 135, n. 2, p. 393-398, 2011.

OLIVEIRA, P. G. **Avaliação de Eficácia de um antagonista do receptor do peptídeo liberador da gastrina em modelos experimentais de artrite**. [Tese], Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, 2011.

OLIVIA, W. O.; PETROVICK, P.R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.20, n.3, p. 641-650, 2010. .

OISEN, N.J.; STEIN, M. New drugs for Rheumatoid Arthritis. **New England Journal of Medicine**. v. 350, n. 21, p. 2167-2179, 2004.

OMURA K, IMAI S, MAEDA T, HUKUDA S. Prolonged and increasing expression of Fos related antigens in the hippocampus of adjuvant arthritic rats. **Journal of Rheumatology**. v.25, n.5, p. 936- 944, 1998.

PEREIRA, M.F., MARTINO, T., DALMAU, S.R., FERZOU, J.P., COSTA, S.S., COELHO, M.G. & SABINO, K.G. Terpenic subfraction of *Pterodon pubescens* induces apoptosis of K562 leukemic cells by modulating gene expression. **Oncology Reports**, v.25, n.1, p. 215- 221, 2011.

PEREIRA, MF ; MARTINO, T; DALMAU, SR ; PAES, MC ; BARJA-FIDALGO, C; ALBANO, RM ; COELHO, MGP ; SABINO, KCD. Terpenic fraction of *Pterodon pubescens* inhibits nuclear factor kappa B and extracellular signal-regulated protein Kinase 1/2 activation and deregulates gene expression in leukemia cells. **Bmc Complementary And Alternative**, v.12, n.231, p. 3 - 8, 2012.

PRABHALA, H.K., PAI, C., PRABHALA, R.H. **Anti-inflammatory natural foods** In: Bioactive Food as dietary interventions for arthritis and related inflammatory diseases. Elsevier, 2013

RANDALL, R.O.; SELITTO, J.J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**. v.111, n. 4, p. 409-419, 1957.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., MOORE, P.K., **Farmacologia** 5^a ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2004, p. 640-642.

RÉ, M. I., Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**. v. 16, n. 6, p. 1195-1236, 1998.

RÉ, M.I., Microencapsulação: em busca de produtos “inteligentes. **Ciência Hoje**. v. 27, n. 162, p. 24-29, 2000.

RODRIGUES, R.A.F., **Preparo, caracterização e avaliação funcional de microcápsulas obtidas por spray drying, contendo extrato de café crioconcentrado**, [Tese] UNICAMP - Faculdade de Engenharia de Alimentos, , 2004.

SACK, K.E.; FYE, K.H. **Doenças reumatóides** In: STITES, D. P.; TERR, A.; PARSLOW, T.G. **Imunologia Médica**. 9^oed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 354-370.

SCOTT, D.L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T.W.J Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v.76, n. 9746, p. 1094-1108, 2010.

SERVAT, L. **Atividade antinociceptiva e anticâncer in vitro de microencapsulados produzidos com extrato bruto e vouacapanos obtidos**

das sementes de *Pterodon pubescens* Benth. . [Dissertação], UNICAMP Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 2010.

SERVAT, L.; SPINDOLA, H.M.; RODRIGUES, R. A. F.; SOUSA, I.M.O; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; FOGLIO, M.A. *Pterodon pubescens* Benth. Stability Study of Microencapsulated Extract and Isolated Compounds Monitored by Antinociceptive Assays. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.23, n.7 , p. 1244-1253, 2012.

SHAFIEE, A.; BAGHERI, M.; SHEKARCHI, M.; ABDOLLAHI, M. The antinociceptive activities of 1-(4-aryl-2-thiazolyl)-3,5-disubstituted-2 pyrazolines in mouse writhing test. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 6, n. 3, p. 360-362, 2003.

SILVA, M.C.C.; GAYER, C.R.M.; LOPES, C.S.; CALIXTO, N.O.; REIS, P.A.; PASSEAS, C.P.B.; PAES, M.C.; DALMAU, S.R.; SABINO, K.C.C.; TODESCHINI, A.R.; COELHO, M.G.P. Acute and topic anti-edematogenic fractions isolated from the seeds of *Pterodon pubescens*. **Pharmacy and pharmacology**. v. 56, n. 1, p. 135-141, 2004.

SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M. A. M; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: umas realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n.4, p. 618-626, 2008.

SIMÕES, C. M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**.3 .ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS: 2001.

SIMÕES, C.M.O.; ALEXANDRE, R.F.; BAGATINI, F. **Interação entre fármacos e medicamentos fitoterápicos á base de ginkgo e ginseng**. Revista Brasileira de Farmacognosia. v.18, n.1, p. 117-126, 2008.

SOUZA, G.H.B., MELLO, J.C.P., LOPES, N.P. **Farmacognosia Coletânea Científica**, Ouro Preto: UFOP., 2012, p. 19-22.

SOUSA, I. M. O. **Avaliação da estabilidade do extrato seco e formulações de bases semi sólidas, contendo *Arrabidaea chica* Verlot, para uso em cicatrização.** [dissertação], Unicamp- Instituto DE Biologia , 2013.

SPINDOLA, H.M. **Atividade antinociceptiva do óleo das sementes de *Pterodon pubescens* Benth.** . [dissertação], UNICAMP- Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 2006.

SPINDOLA, H.M. **Atividade antinociceptiva e antitumoral de compostos isolados da *Pterodon pubescens* Benth. . (Leguminosae- Papillonoidea).** [tese], UNICAMP- Faculdade de Odontologia de Piracicaba-Unicamp, 2010.

SPINDOLA, H.M.; CARVALHO, J.E.; RUIZ, A.L.T.G.; RODRIGUES, R.A.F.; DENNY, C.; SOUSA, I.M.O.; TAMASHIRO, J.Y.; FOGLIO, M.A. Furanoditerpenes from *Pterodon pubescens* Benth. . with selective in vitro anticancer activity for prostate cell line. **Journal of the Brazilian Chemical Society.** v. 20, n. 3, p. 569-575, 2009.

SPINDOLA, H.M.; SERVAT, L.; CARVALHO, J.E.; RODRIGUES, R.A.F.; SOUSA, I.M.O.; FOGLIO, M.A. Geranylgeraniol and 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Benth. .: further investigation of the antinociceptive mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology.** v. 656, n.1-3, p.45-51, 2011.

TOCCAFONDO, M. L.; HUANG, S.M. Botanical-drug interactions: a scientific perspective. **Planta medica.** v. 48, n. 13, p. 1400-1415, 2012.

TOMARO-DUCHESNEAU, C., SAHA, MALHOTRA, M., KAHOU, I, PRAKASH, S , Microencapsulation for the therapeutic delivery of drugs, live mammalian and bacterial cells and other biopharmaceutics: Current status and future directions. **Journal of Pharmaceutics.** 19 p., 2012.

USNAYO, M.J.G.; ANDRADE, L.E.C.; ALARCON, R.T.; OLIVEIRA, J.C.; SILVA, G.M.; BENDET, I.; BURLINGAME, R.; PORTO, L.C.; PINHEIRO, G.R.C. Estudo da frequência dos alelos de HLA-DRB1 em pacientes brasileiros com artrite reumatóide. **Revista Brasileira Reumatologia.** v. 51., n. 5, p. 465-483, 2011.

VACHER, J., DUCHENE-MARULLAZ, P., Comparison of the peripheral vasodilator action of atropine and some synthetic spasmolytics, **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et des ses Filiales (Paris)**. v. 158, p. 1522-1524, 1964

VASIR, J.K.; TAMBWEKAR, K.; GARG, S. Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutic**. v. 255, n.1-2, p.13-32, 2003..

VELOZO, L. S.M. ; MARTINO, T.; VIGLIANO, M. V.; PINTO, F. A.; SILVA, P. G.; JUSTO, M. G. S.; SABINO, K. C. C.; COELHO, M.G.P. Pterodon polygalaeflorus Essential Oil Modulates Acute Inflammation and B and T Lymphocyte Activation. **The American Journal of Chinese Medicine**. v. 41, n. 3, p. 545–563, 2013.

VENKATESHA, S., RAJAIAH, R. BERMAN, B.M., MOUDGIL, K.D. **Immunomodulation of autoimmune arthritis by herbal CAM** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011, 13p

VIEIRA, C.R.; MARQUES, M.F.; SOARES, P.R.; MATUDA, L.; DE OLIVEIRA, C.M.A.P; KATO, L.; DA SILVA, C.C.; GUILLO, L.A. Antiproliferative activity of *Pterodon pubescens* Benth. . seed oil and its active principle on humam melanoma cells. **Phytomedicine**. v.15, n. 6-7, p.528-532, 2008.

VIEIRA, M.L.T., HUANG, S.M. Botanical drug interaticons: Scientific perspective. **Planta médica**. v.78, n. 14, p. 1400-1415, 2012.

VILLETI, G.; BERGAMARCHI, M.; BASSANI, F.; BOLZONI, P.T.; MAIORINO, M.; PIETRA, C.; RONDELLI, I.; CHAMIOT-CLARK, P.; SIMONATO, M.; BARBIERI, M. Antinociceptive activity of the N-Metil-D-Aspartate receptor antagonist N-(2-Indanyl)-glycinamide Hydrochloride (CHF3381) in experimental Models of Inflammatory and Neurophatic Pain. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.306, n. 2, p. 804-814, 2003.

VOIPIO HM, BANEUX P, GOMEZ DE SEGURA IA, HAU J, WOLFENSOHN S: **Joint Working Group on Veterinary Care. Journal of Laboratory Animal Science And Welfare**. v. 42, n.1, p.1-11, 2008.

WAGNER , H. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**. v. 82, n.1 , p. 34-37, 2011.

WAGNER, H. Multitarget therapy – the future of treatment for more than Just functional dyspepsia. **Phytomedicine**. v. 15, n. 5, p. 122-129, 2006.

WENDEL, S., ÇELIK, M., **Uma visão geral sobre o uso da tecnologia de Spray-Drying**, Pharmaceutical Technology, 1998, 31-45.

WILLIAMS, D.G. **Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis** In: Klippel, J.H.; Dieppe, P.A. Rheumatology. 2^a ed London: Mosby. p.9.1-9.8

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

ZHANG, R, REN, K. **Animal models of Pain**. Neutmethods, 2011, v. 49, n. , p.24-40.

ZHONGXIANG, F.; BHESH, B. Encapsulation of polyphenols – a review. **Trends in Food Science & Technology** v.21, n.10, p. 510-523, 2010.

8 – ANEXOS

8.1 - ANEXO 1 – Autorização de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético

 <p>Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético</p> <p>O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, nos termos Deliberação 246/2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, autoriza a instituição identificada no verso deste documento a acessar e remeter componente do Patrimônio Genético com a finalidade de pesquisa científica.</p> <p>Brasília, 10 de Outubro de 2012</p> <p>Paulo Sergio Lacerda Beirao Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde PO 161/2010</p>	<p>Processo: 010495/2012-6 Validade: 10/10/2012 a 10/09/2013 Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS CNPJ: 460.684.250/0001-33 Pesquisador: Mary Ann Foglio CPF: 096.776.818-77 RG: W132904Z - se/dpmaf / SP</p> <p><i>Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/ e informar o número do protocolo 0180220438370291 para recuperá-la do banco de dados do CNPq</i></p>
--	--

8.2 – ANEXO 2- Declaração da Comissão de Ética no uso de Animais CEUA/UNICAMP



CEUA/Unicamp

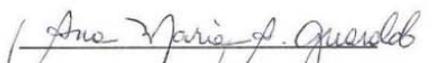
Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

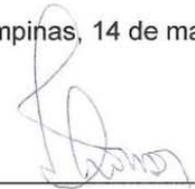
Certificamos que o projeto **“Avaliação de eficácia antinociceptiva de formulação de *Pterodon pubescens benth.* microencapsulado”** (protocolo n ° 2367-1), sob responsabilidade de **Profa. Dra. Mary Ann Foglio / Rogério Grandó**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.764, 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 **14 de março de 2011**.

Campinas, 14 de março de 2011.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva