

BJNS

Brazilian Journal of Natural Sciences

DESTAQUE DESTA EDIÇÃO

Instituto de Osmologia e Óleos Essenciais
iooe - Produzindo Referências Científicas

WWW.BJNS.COM.BR

2018 - Set. Out. Nov. Dez.
Edição 1 - Volume 3
Versão Online
ISSN 2595-0584

ARTIGO DE OPINIÃO / REVISÃO INSTITUTO DE OSMOLOGIA E ÓLEOS ESSENCIAIS - IOOE - PRODUZINDO REFERÊNCIAS CIENTÍFICAS

Autor: Professor Doutor Carlos Jorge Rocha Oliveira
Biólogo CRBio 19428/01D

Recebido em: set. 2018; aceito set. 2018; publicado out. 2018.

Em últimas comunicações científicas publicadas por integrantes do corpo científico do **iooe**, em diferentes periódicos, observamos o avanço biológico de suas pesquisas. Visando desenvolver a partir de insumos naturais, conhecimento aplicável ao bem-estar da sociedade, o **iooe** tem intensificado suas linhas de pesquisas baseadas na biologia molecular com o objetivo de esclarecer os verdadeiros efeitos celulares dos óleos essenciais. Neste artigo farei um breve resumo de estudos já consolidados cientificamente e a participação do **iooe** em suas referências.

1. Trabalhos científicos de ciências com base molecular, demonstram que vias de sinalização celular são alvos de estudos pertinentes na busca do entendimento de estímulos que ativem o mecanismo celular, quer seja na manutenção, proliferação e morte celular (apoptose).

Em estudos, Oliveira, CJR, et. al, 2003, apontam seus resultados para uma integração das diferentes vias de sinalização mediadas por Óxido Nítrico (NO):

Primeiro - NO e cGMP ao estimularem a atividade tirosina do receptor de EGF devem agir em combinação para ativar p21Ras. **Segundo** - NO/cGMP ao ativarem p21Ras tem seus efeitos mediados por Raf-1, MEK 1 e as MAP quinases ERK 1 e ERK 2. **Terceiro** - a ativação de ERK 1 e ERK 2 precede e é responsável pela ativação do receptor de EGF, cuja atividade tirosina quinase deve iniciar a cascata de fosforilação em tirosina de várias

proteínas em células endoteliais de aorta de coelho estimuladas pelo radical livre”. A representação esquemática da possível integração entre estas vias de sinalização mediadas pelo NO está mostrada na Figura 1.

Estes achados sugerem a participação do NO na angiogênese, processo que envolve a proliferação e a migração de células endoteliais. Levando em conta essas observações, a presente cascata de sinalização mediada pelo NO, pode esclarecer o mecanismo que marca a participação deste radical na proliferação de células endoteliais, como foi demonstrado através das curvas de crescimento celular^[1].

Ainda nessa linha de pesquisa, Oliveira, C.J.R, et.al, 2008, publica mais evidências da participação do Óxido Nítrico (NO) na proliferação celular através da ativação do ciclo celular.

Resultados demonstram inequivocamente a participação do NO na progressão do ciclo celular em células endoteliais de aorta de coelho. Seus efeitos são exercidos especificamente sobre a via p21Ras – MAP quinase. A sequência de eventos: fosforilação de Elk-1, síntese de ciclina D1, cdk4, cdk6, fosforilação da pRb, transição do ciclo celular da fase G1 para a fase S, controlada pela ciclina E, passagem da fase S para G2/M através do aumento da expressão da ciclina A que culmina com a proliferação das células. A representação esquemática desta via de sinalização mediada pelo NO está proposta na figura 2.^[2]

Figura 1.

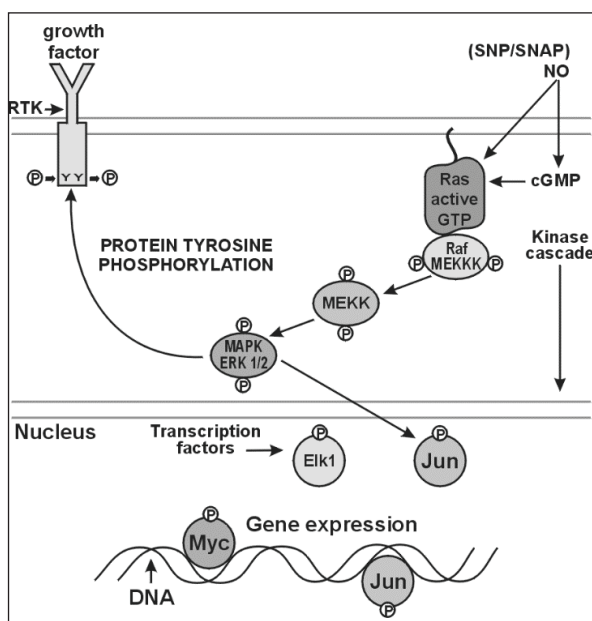


Figura 1. Esquema proposto para a via de transdução de sinal mediada por NO. Elaborado por Juliano Rocha, designer gráfico,^[1]

Figura 2.

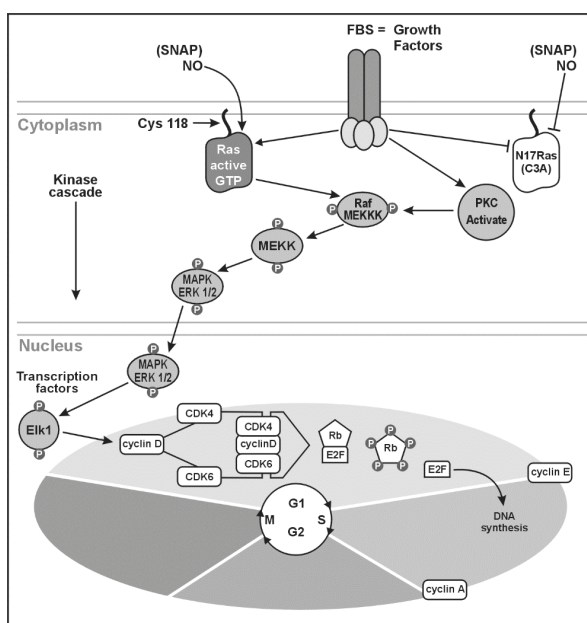


Figura 2. Representação esquemática da via de sinalização mediada pelo óxido nítrico (NO) em células endoteliais de aorta de coelho. NO atua a via p21Ras, Raf-1, MEK 1 e as MAP quinases ERK 1 e ERK 2. NO regula o curso do ciclo

celular através do ponto de restrição da fase G1/S por indução da síntese de ciclinas D1 / cdk 4, cdk6. A hiperfosforilação da proteína Rb marca o ponto de restrição no qual a célula libera o fator de transcrição E2F que regula o gene da ciclina E, dando início a síntese do DNA. O aumento de expressão da ciclina A caracteriza a passagem do ciclo celular da fase S para a fase G2/M, via rotas de sinalização Ras/Raf/MAP quinase ERK 1 e 2 mediadas pelo NO. Na ausência de p21Ras funcional (N17Ras, C3A), NO não promove a ativação da via Ras-MAP quinase e a progressão do ciclo celular. Fatores de crescimento podem participar deste evento independentemente de p21 Ras. Elaborado por Juliano Rocha, designer gráfico,^[2]

2. Em 2017 o iooe participa de uma publicação onde ácido hialurônico de baixo peso molecular (AH) é proposto como agente que atua nas três fases da reparação tecidual.

“O objetivo deste trabalho foi avaliar se o AH é capaz de induzir proliferação celular de fibroblastos dérmicos humanos. Esses efeitos foram avaliados empregando-se as técnicas de azul de tripano e de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT), seguida de análise do ciclo celular, produção de colágeno e modelo de wound healing (WH). Após tratamento com AH, foi verificado aumento significativo na proliferação das células e nas fases S-G2-M do ciclo celular, figura 1. Quando submetido ao teste de WH, a exposição a 0,2% de AH promoveu redução significativa da área da lesão, com taxas de migração celular de 74%. Os resultados confirmam a capacidade do AH em aumentar a proliferação de fibroblastos, o que é relevante para a fase proliferativa da cicatrização^[3]”.

3. Em continuidade, participa em 2018: “Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais associados a ácido hialurônico de baixo peso molecular^[4]. Cinnamomum cassia (canela), Ocimum basilicum (manjeriço), Thymus vulgaris (tomilho) e Melaleuca alternifolia (tea tree) são espécies conhecidas pela produção de óleos essenciais amplamente difundidos e utilizados em diversas

categorias de produtos, graças às variadas ações que apresentam. Uma delas é a capacidade antimicrobiana comprovada sobre vários microrganismos patogênicos, o que é objeto de interesse no contexto

do tratamento de feridas, Tabela 1. Outro componente igualmente relevante nesses casos é o ácido hialurônico (AH), dotado de propriedades antioxidantes e promotoras da regeneração celular [4].

Figura 1.

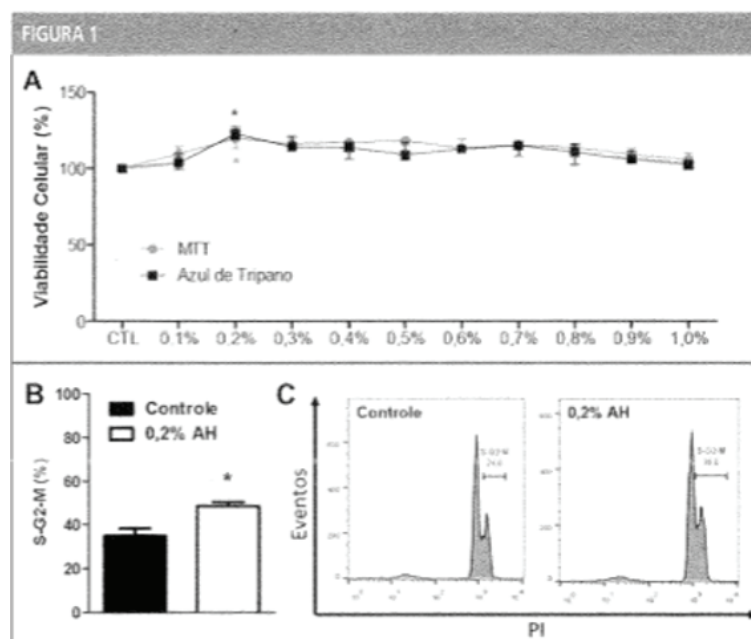


Figura 1. (A) Percentual de viabilidade celular após 24 horas de exposição a diferentes concentrações de AH de baixo peso molecular através das técnicas de azul de tripano e MTT. (*) $P < 0,05$ – significativo em relação ao controle, ANOVA, Tukey. (B) Percentual de células em fase S-G2-M obtidos após exposição por 24 horas a 0,2% de AH de baixo peso molecular sobre linhagem de fibroblastos. (*) $P < 0,05$ significativo em relação ao controle. Teste t de Student. (C) Histogramas representativos da população em fases S-G2-M do ciclo celular dos grupos controle e tratado com 0,2% de AH respectivamente. Ensaio realizado em triplicata. GraphPad Prism V.5.0. Flowjo v10.0 [3].

Tabela 1.

Tabela 1. Sensibilidade de cepas bacterianas frente à ação dos OEs, associados ou não ao AH, em comparação ao controle (estreptomicina/penicilina). Valores das médias dos diâmetros dos halos de inibição obtidos na técnica de difusão em ágar Mueller-Hinton.

INÓCULO	ÓLEO ESSENCIAL	ÓLEO ESSENCIAL+ AH	CONTROLE*
Cinnamomum cassia			
<i>Escherichia coli</i>	0,7 cm	0,7 cm	0,5 cm
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,9 cm	0,9 cm	0,8 cm
Thymus vulgaris			
<i>Escherichia coli</i>	0,5 cm	0,6 cm	0,5 cm
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,6 cm	0,6 cm	0,7 cm
Melaleuca alternifolia			
<i>Escherichia coli</i>	0,5 cm	0,4 cm	0,6 cm
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,5 cm	0,5 cm	0,6 cm

*Estreptomicina 2,5%, penicilina 2,5%. **O óleo de *Ocimum basilicum* (manjeriça) não apresentou efeito antimicrobiano. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os halos de inibição apresentados pelas dispersões de OE isolado e associado ao AH.

4. Com a publicação: "In Vitro Effects of the Phytocomplex TrichoTech™ on Human Fibroblasts: Proliferative Potential and Effects on Gene Expression of FGF-7 and FGF-10" [5], o iioe vem consolidando sua visão da importância dos estudos científicos com base nos efeitos celulares dos óleos essenciais. Neste trabalho o objetivo foi investigar o potencial proliferativo do composto TrichoTech™, um fito complexo obtido a partir de uma mistura de óleos essenciais, em cultura de fibroblastos humanos e sua capacidade de modular a expressão gênica de FGF-7 e FGF-10. O Trichotech™ mostrou aumentar a proliferação de fibroblastos em concentrações de 0,5% a 2,0% e também aumentar a porcentagem de células nas fases S / G2 / M do ciclo celular, figura 2. O Trichotech™ a ambos os 1,0% e 2,0% induziu um efeito estatisticamente significativo no ensaio de cicatrização de feridas em comparação com o controle não tratado. Nós examinamos a interação entre a sobrevivência celular (PI3K / Akt) e mitogênico (Ras / MAPK) vias de transdução de sinal após o

tratamento Trichotech™ (1,0% e 2,0%) na linhagem celular de fibroblastos. O Tricotech™ causou fosforilação de ERK1 / 2, bem como maior fosforilação de MEK em comparação com o controle não tratado e o ERK1 / 2. PI3K e AKT, no entanto, não se mostraram significativamente mais fosforilados após a exposição ao Trichotech™. Para verificar a expressão relativa de mRNA para os genes FGF-7 e FGF-10, foi utilizado um protocolo de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Os resultados mostram o aumento da expressão de mRNA por fibroblastos após tratamento com Trichotech™. Em ambas as concentrações testadas, o Trichotech™ aumentou a expressão de FGF-7 e FGF-10. A coloração com Sirius red permite uma avaliação rápida do conteúdo de colágeno, mostrando um aumento significativo no conteúdo de colágeno nos fibroblastos tratados. Outras investigações sobre o Trichotech™ podem ser úteis para o desenvolvimento de novos fitos complexos bioativos para uso dermatológico e tricológico [5].

Figura 2.

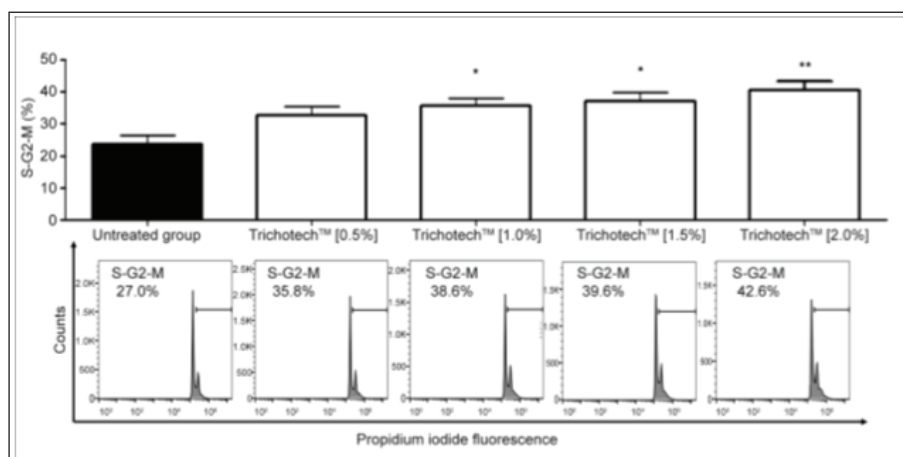


Figura 2. (a) Porcentagem de células obtidas na fase S/G2/M após exposição por 24 horas de CCD-1072 Sk em diferentes concentrações do Tricotech™. Antes de iniciar os testes, as células foram privadas de soro fetal bovino. (*) $P < 0,05$ – significativo em relação ao controle. ANOVA, Tukey. GrapPad v5.0. (b) Histograma representado estatisticamente significativo com concentração de (10%). Flowjo v.10.0, [5].

5. Pinetonina™, publicação do iioe em setembro de 2018, apresenta uma preparação de óleo essencial, administrado por via intranasal, com eficaz diminuição dos níveis de cortisol e na modu-

lação da liberação do glutamato. O iioe através de seus pesquisadores, sugerem que este fitocomplexo tem como objetivo auxiliar nos sintomas de estresse, ansiedade e distúrbios do sono [6].

Em entendimento a este estudo, precisamos relembrar um pouco sobre as formas de sinalização célula-célula, uma vez que ação da produção de hormônios que causam os sintomas de estresse e ansiedade estão intimamente ligados por comportamentos celulares diferentes.

A sinalização celular pode ser realizada pelo contato direto entre as células ou mediado por moléculas sinalizadoras secretadas.

A) Sinalização endócrina, hormônios são transportados pelo sistema circulatório e agem em células em locais distantes.

B) Sinalização parácrina, uma molécula secretada por uma célula irá agir em outras células vizinhas.

C) Sinalização autócrina, uma célula produz uma molécula sinalizadora para a qual ela também responde.

Aspectos gerais da sinalização celular corresponde a componentes de uma via de transdução de sinal onde as células respondem a combinações de sinais específicos mediados por moléculas sinalizadoras. Os componentes de uma via de transdução de sinal ativam um mecanismo que permite a uma célula influenciar o comportamento de outras sendo essencial à manutenção de organismos multicelulares e respondem a combinações de sinais específicos quando uma dada célula é exposta a centenas de sinais solúveis, sinais ligados à matriz extracelular, sinais ligados às células vizinhas.

Todas moléculas sinalizadoras agem por ligação com um receptor expresso na superfície celular, ou localizado no citoplasma ou núcleo. Hormônios esteroides e outros (Hormônio da tireoide, vitamina D3 e ácido retinóico) que são de características hidrofóbicas atravessam a membrana plasmática por difusão e agem diretamente em receptores citoplasmáticos ou nucleares.

Receptores nucleares ou intracelulares

- Receptores acoplados à proteína G
- Receptores Proteína tirosina quinase
- Receptores canais iônicos
- Receptores de citocinas
- Receptores acoplado a outras atividades enzimáticas

Segundos mensageiros

Apesar de as proteínas serem importantes para as vias de transdução de sinal, outras moléculas podem participar da mesma forma. Inúmeras vias envolvem segundos mensageiros, moléculas pequenas e não proteicas que repassam um sinal iniciado pela ligação do ligante (o “primeiro mensageiro”) a seu receptor.

Segundos mensageiros incluem íons de Cálcio, AMP cíclico (AMPC), um derivado do ATP e inositol fosfatos que são sintetizados a partir de fosfolípidos.

Os íons de cálcio são um tipo de segundo mensageiro amplamente utilizado, na maioria das células, a concentração dos íons de cálcio no hialoplasma é muito baixa, visto que as bombas de íons na membrana plasmática trabalham continuamente para removê-los. Com a finalidade de sinalização, pode ser armazenado em compartimentos, com o retículo endoplasmático.

Nas vias que utilizam os íons de cálcio como segundo mensageiro, eventos de sinalização a montante liberam um íon ligante que se vincula e abre os canais de receptores ionotrópicos. Estes canais se abrem e permitem que os altos níveis de íons presentes fora da célula (ou em compartimentos de armazenamento intracelular) fluam para o citoplasma, elevando a concentração plasmática de Cálcio. O Cálcio citoplasmático e nucleoplasmático podem ser regulados independentemente. A relativa contribuição do Cálcio citoplasmático e nucleoplasmático em processos biológicos tais como transcrição gênica, apoptose e proliferação celular já está consagrada da literatura científica.

Outro segundo mensageiro usado em diversos tipos de células é a adenosina monofosfato cíclica (AMP cíclica ou cAMP), uma molécula pequena produzida a partir de ATP. Em resposta aos sinais, uma enzima chamada adenil ciclase converte ATP em cAMP, removendo dois fosfatos e ligando o fosfato remanescente ao açúcar em forma de anel (por isso, o nome “cíclica”).

Depois de produzida, a cAMP pode ativar uma enzima chamada proteína quinase A (PKA), possibilitando que esta fosforile seus alvos e passe o

sinal adiante. A proteína quinase A é encontrada em uma variedade de tipos de células e, em cada tipo, suas proteínas-alvo variam. Desta forma, o mesmo segundo mensageiro cAMP pode produzir diversas respostas em diferentes contextos.

“hipótese de que a severidade ou presença de eventos de vida, estressores são preditivos de severidade ou presença de sintomas de ansiedade ou de transtornos de ansiedade têm sido alvo de estudos com adultos e adolescentes.

“Classicamente, um agente estressor é aquele que possui a capacidade para alterar a homeostasia, provocando a ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal. Como exemplos de agentes estressores, pode-se citar fome, dor, calor/frio, ansiedade, medo, entre outros fatores.

Embora uma grande quantidade de variáveis fisiológicas seja responsiva aos estressores, muita atenção tem sido dada àquelas que direta ou indiretamente ativam o SNS e o Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) [7,8]”. “Os glicocorticoides, por sua vez, são os produtos da ativação do eixo HPA e da resposta central ao estresse. A este respeito, a corticosterona, da mesma forma que o cortisol em humanos pode ser usado como indicador de estresse, figura 3” [6,9,10].

“A relação cortisol - melatonina, hormônio

sintetizado pela glândula pineal, está envolvida em funções imunomodulatórias, anti-inflamatórias, antitumorais, antioxidantes e cronobióticas. Sua secreção ocorre à noite, estando relacionada com o sono, redução da temperatura corporal e outros eventos noturnos. Sua principal função em mamíferos é a de mediar sinais de escuridão, traduzindo informações sobre a duração da noite, com possíveis implicações no controle da ritmicidade circadiana e da sazonalidade. Complexas vias neuroanatômicas conectando o núcleo supraquiasmático do hipotálamo à glândula pineal regulam sua secreção. Sua concentração plasmática é pequena, chegando a ser indetectável em alguns indivíduos, e mesmo doses exógenas mínimas administradas durante o dia são capazes de induzir o sono em indivíduos normais [11].

O uso da Pinetonina™ melhorara a qualidade do sono, ao promover o equilíbrio emocional e o bem-estar reprimindo os níveis de cortisol e estimulando o aumento da Melatonina, fato esse que se assemelha ao padrão fisiológico humano, sem efeitos colaterais, diferentemente de diversas drogas hipnóticas, como os benzodiazepínicos, é por isso pode ser considerado promissor seu uso em tratamento de distúrbios de insônia.

Figura 3.

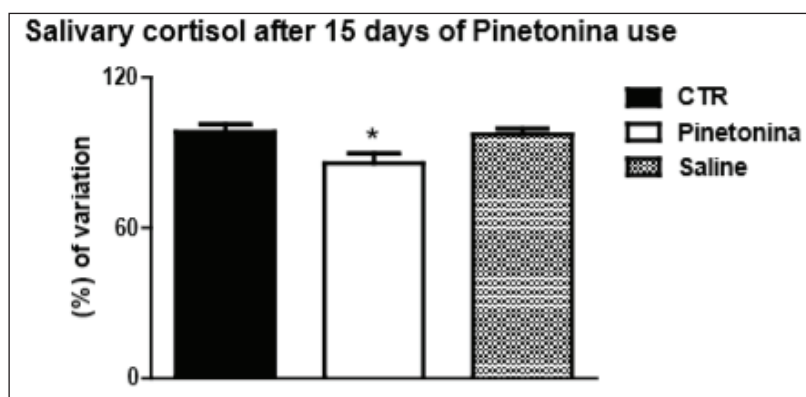


Figura 3. Variação do nível de cortisol salivar entre grupos de voluntários que receberam Pinetonina™, solução salina e sem tratamento. O grupo tratado com Pinetonina™ obteve menor média (%) quando comparado ao grupo controle (sem tratamento) e quando comparado ao grupo tratado com salina. (*) P <0,05 - significativo em relação ao controle, ANOVA, Tukey. Ensaio realizado em triplicado. GraphPad Prism V.5.0, [6].

Nessa linha deste raciocínio propomos que o fito complexo Pinetonina™, atua como sinalizador celular promovendo atividade de transcrição em células específicas para formação dos hormônios aqui mencionados. Estudos a serem realizados pela equipe de pesquisadores do iooe.

Os resultados apresentados mostram que marcadores bioquímicos e níveis de íons podem ser usados como índices fisiológicos fidedignos de estados de estresse/ansiedade.

Em resumo, a importância das evidências científicas quanto aos alvos celulares alcançados pelos óleos essenciais é inquestionável até o momento. Entendemos ao mesmo tempo que a ação antioxidante e proliferativa promovida pelos óleos essenciais, estimulam a produção de gases como o Óxido Nítrico e consequente cascata das vias de sinalização celular e seus efeitos mediados por receptores, ligantes, segundos mensageiros como o cálcio entre outros. Assim, o iooe aumenta seu foco em afirmações científicas de comprovação da efetiva ação dos óleos essenciais em alvos celulares com dados biológicos moleculares confiáveis e já consagrados na literatura científica.

Referências bibliográficas

1. Carlos J. R. Oliveira; Fernanda Schindler; Armando M. Ventura; Miriam S. Morais; Roberto J. Arai; Victor Debbas; Arnold Stern; Hugo P. Monteiro: **Nitric Oxide and CGMP activate the Ras-Map Kinase pathway stimulating Protein Tyrosine Phosphorylation in Rabbit Aortic Endothelial Cells**: Free Radical Biology & Medicine, Vol. 35, No. 4, pp. 381-396, 2003. DOI:10.1016/S0891-5849(03)00311-3.
2. Carlos J. R. Oliveira; Marli F. Curcio; Miriam S. Moraes; Maristela Tsujita; Hugo P. Monteiro: **The low molecular weight S-nitrosothiol, S-nitroso-N-acetylpenicillamine, promotes cell cycle progression in rabbit aortic endothelial cells**: Nitric Oxide. Biology and Chemistry, v. 18, p. 241-255, 2008. DOI: 10.1016/j.niox.2008.02.001.
3. Oliveira, Pedro Gonçalves de; Castilho, João Cezar; Spindola, Daniel Gonsales; Trindade, Claudia Bincoletto; Oliveira, Carlos Rocha. **Avaliação in vitro da atividade do ácido hialurônico de baixo peso molecular sobre a proliferação de fibroblastos dérmicos humanos / In vitro Evolution of acid activity hyaluronic acid of low molecular weight on proliferation of human dermal fibroblasts**: Nursing (São Paulo);20(224):1552-1555, jan.2017. ilus.
4. Oliveira, P.G.; Castilho, J.C.; Souza, M.S.A.; Siqueto, F.R.; Silva, S.O.; Tamashiro, L.Y.; Spindola, D.G.; Cavalaro, V.; Oliveira, C.R: **Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais associados a ácido hialurônico de baixo peso molecular**: Revista Feridas, 2018; 06 (30) 996-1002.
5. Fernando Amaral; Maira Jardim; Valeria Maria de Souza Antunes; Luis Felipe Gomes Michelin; Bárbara Anaís Rodrigues dos Santos; Christiano Marcelo Vaz Barbosa; Daniel Gonsales Spindola; Claudia Bincoletto; Carlos Rocha Oliveira: **In Vitro Effects of the Phytocomplex TrichoTech™ on Human Fibroblasts: Proliferative Potential and Effects on Gene Expression of FGF-7 and FGF-10**: Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications, 2017, 7, 1-13. DOI: doi.org/10.4236/jcdsa.2017.71001.
6. Maira Jardim; Fernando Amaral; Valeria Maria de Souza Antunes; Fernando Rodrigues; Mariana Soares Alves de Souza; Fernanda Rossi Siqueto; Luiza Melanie Silva; Rafaela Alves Bertolino; Victor Cavalaro; Carlos Rocha Oliveira; **Pinetonina™, an Intranasally Administered Essential Oil Preparation, Is Effective in Decrease of Cortisol Levels and on the Glutamate Release Modulation**: Neuroscience & Medicine, 2018, 9, 135-149.
7. Natelson, B.H.; Creighton, D.; McCarty, R.; Tapp, W.N.; Pitman, D.; Ottenweller, J.E. (1987) . **Adrenal hormonal indices of stress in laboratory rats**. Physiol. Behav. 39:117-125
8. Verano, J.L.; Grassi-Kassisse, D.M.; Spadari-Bratfisch, R.C. (2001) **Metabolic markers following beta-adrenoceptor agonist infusion in footshock-stressed rats**. Braz J Med Biol Res. 34(9)1197-1207.
9. De Kloet, E.R.; Joëls, M.; Holsboer, F. (2005) **Stress and the brain: from adaptation to disease**. Nature Reviews. 6:463-475.
10. Charmandari, E.; Tsigos, C.; Chrousos, G. (2005) **Endocrinology of the stress response**. Annu Rev. Physiol. 67:259-284
11. Júlio Anselmo Sousa Neto; Bruno Freire de Castro: **Melatonina, ritmos biológicos e sono** - uma revisão da literatura: Revista Brasileira de Neurologia, 44 (1): 5-11. 2008.

GUAÇATONGA (*CASEARIA SYLVESTRIS* SW) E PORANGABA (*CORDIA SALICIFOLIA* OU *CORDIA ECALYCVLATA* VELL / BORAGINACEAE) POSSUEM AÇÃO NO EMAGRECIMENTO?

Karla de Picoli Alexandre¹, Flavio Sussumu Yasuda¹, Luis Carlos Marques², Carolina Passarelli Gonçalves³, Rogerio da Silva Veiga⁴, Sonia Mariza Luiz de Oliveira⁵, Maria Cristina Marcucci^{6*}

¹Mestre pelo Programa de Mestrado Profissional em Farmácia da Universidade Anhanguera de São Paulo-SP Brasil. ²Fitoscience Consulting Ltd., São Paulo, SP, Brazil. ³Docente da Faculdade Anhanguera Osasco, ⁴Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, ⁵Mestranda do Programa de Biotecnologia e Inovação em Saúde da UNIAN-SP, ⁶Docente do Programa de Pós-graduação Stricto sensu da Universidade Anhanguera de São Paulo. Endereço para correspondência: Programa de Pós-graduação Stricto sensu em Farmácia e Biotecnologia da Universidade Anhanguera de São Paulo. Av. Raimundo Pereira de Magalhães, 3305. Pirituba, São Paulo, Brasil. CEP 05145-200. Fone/FAX: 0055113512-8400. e-mail: cristina.marcucci@anhanguera.com

Recebido em: set. 2018; aceito set. 2018; publicado out. 2018.

Resumo

O mercado de plantas medicinais no Brasil, é composto por farmácias, drogarias e ervanarias, e atualmente sem mínima regulamentação em feiras-livres, não estando livre de adulteração e/ou confusão de plantas e espécies. No comércio de plantas as Rubiáceas são habitualmente usadas como adulterantes da *Cordia salicifolia* Cham. A *Casearia sylvestris* (guaçatonga) é utilizada como adulterante da *Cordia salicifolia* (porangaba), a qual é comercializada com suposta ação emagrecedora, aumentando desta forma, a ação antrópica sobre a espécie. No presente trabalho são apresentadas as principais características botânicas, composição química, atividade biológica e terapêutica, além dos usos populares das plantas *Casearia sylvestris* e *Cordia salicifolia*. Também é apresentada a segurança de uso das duas plantas em questão. Existem problemas no uso de uma ou de outra planta, tendo-se o agravante do emprego da *Casearia sylvestris* como adulterante da *Cordia salicifolia*, a qual é utilizada com suposta ação emagrecedora, existindo controvérsias da sua eficácia para esse fim. A sustentabilidade da fitoterapia depende, dentre outros fatores, da manutenção de um mínimo de qualidade dos produtos, sem criar falsas expectativas, o surgimento de efeitos adversos inesperados e a não produção de efeitos terapêuticos necessários, um conjunto de problemas que acaba depondo contra o próprio mercado de fitoterápicos.

Palavras chave: *C. sylvestris*, *C. salicifolia*, controle de qualidade.

Introdução

Nas últimas décadas a comunidade científica vem ampliando gradativamente as pesquisas em relação ao potencial terapêutico das plantas. Ao mesmo tempo, o interesse pela ecologia, assim como uma procura cada vez maior pelas terapias alternativas faz com que a divulgação dos resulta-

dos dessas pesquisas tenha uma repercussão muito maior do que anteriormente ⁽¹⁻³⁾. Entretanto, o controle de qualidade é imprescindível quando se trata de plantas medicinais, este deve ser feito desde o plantio, colheita e até que a droga vegetal esteja apta para o consumo. Devem ser verificados os constituintes químicos da espécie que caracterizam as atividades farmacológicas e suas possíveis

reações adversas, deve ser identificada a espécie botânica para evitar fraudes e contaminações com materiais estranhos, realizar estudos microbiológicos, pois, podem existir alguns micro-organismos patogênicos para o homem ou que sejam responsáveis pela diminuição da eficácia do material vegetal⁽⁴⁻⁶⁾. A guaçatonga, *Casearia sylvestris* (*C. sylvestris*) é vastamente utilizada na medicina popular da América Latina, sendo de aplicação diversa, principalmente em comunidades indígenas. O uso dessa planta é descrito como cicatrizante para doenças da pele^(7, 8) e outras⁽⁹⁻¹⁵⁾. A porangaba (*Cordia salicifolia* Cham., *C. salicifolia*) é da família *Boraginaceae*. Poucos estudos estão registrados na literatura sobre a *Cordia salicifolia*, existindo escassos relatos sobre a atividade biológica da *C. salicifolia*. Alguns destes informam sobre a sua ação sobre o vírus herpes 1⁽¹⁶⁾ e uma atividade muito fraca como inibidor do crescimento de *Helicobacter pylori in vitro*⁽¹⁷⁾. A porangaba tem sido utilizada popularmente como promotora de emagrecimento⁽¹⁸⁻²¹⁾.

No comércio de plantas, as Rubiáceas são habitualmente usadas como adulterantes das *Cordia salicifolia* Cham. Segundo DA SILVA⁽²²⁾ a *C. sylvestris* é utilizada como adulterante de *Cordia salicifolia*. Além da confusão gerada pelas características morfológicas semelhantes, a possibilidade de adulteração de preparações vegetais pode estar também ligada a diversidade de nomes vernaculares que são atribuídos às plantas, que podem variar para cada região do Brasil⁽²³⁾. Nomes populares (vulgares ou regionais) variam de local para local, de região para região, de um país para outro, podendo uma mesma planta ter diversas denominações e uma denominação ser comum para diversas plantas. No Brasil, diversas espécies são denominadas “guaçatonga”, sendo que a mesma denominação popular somada à semelhança vegetativa entre as espécies ocasiona, muitas vezes, dificuldades na sua identificação. Algumas espécies (por exemplo, *Casearia sylvestris* Swartz, *Casearia obliqua* Spreng. e *Casearia decandra* Jacq.) são muito semelhantes vegetativamente⁽²⁴⁾.

A maioria dos produtos é comercializada a partir de plantas secas, que são consumidas sob as for-

mas de infuso e decocto, principalmente, seguidas de formas líquidas como tinturas e extratos fluidos. Nesse contexto, tem sido comum a detecção de problemas de qualidade nos produtos comerciais ofertados à população em todo o país. Assim, vários autores e grupos de pesquisa têm apontado a ocorrência, no mercado brasileiro, de diversos problemas de qualidade, desde problemas de identidade, teor de princípios ativos até presença de sujidades e contaminação microbiana⁽²⁵⁻³¹⁾.

Método

Realizou-se um levantamento bibliográfico para a busca de informações sobre os composição química, atividade biológica e terapêutica das duas plantas, a *C. sylvestris* e a *C. salicifolia*. Para isso, foram utilizadas as bases de dados PUBMED, Scielo e Google acadêmico, além de livros e legislações, utilizando-se como palavras-chaves os nomes científicos das plantas, constituintes químicos e efeitos, sem restrição de idioma e tipo de publicação, dos anos de 1999 a 2017. Os artigos mais antigos foram buscados *in loco* nas bibliotecas da Universidade de São Paulo (USP), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), pois não estavam disponíveis sem as senhas de acesso restrito por se tratarem de textos muito antigos.

Resultados e discussão

Casearia sylvestris

No Brasil, o gênero *Casearia* é representado por aproximadamente setenta espécies⁽³²⁾ sendo que se encontram onze espécies de *Casearia* no Estado de São Paulo^(33, 34). As *Casearias* apresentam grande dimorfismo foliar sendo a espécie *Casearia sylvestris* (*C. sylvestris*) a que melhor demonstra essa variação. Segundo além de ocupar diferentes ambientes, a *C. sylvestris* apresenta grande variação com relação ao tamanho, forma e textura das folhas, à pilosidade dos ramos mais jovens e da inflorescência e no comprimento dos pedicelos⁽²⁴⁾. Nas folhas e casca da *Casearia* são encontrados fla-

vonoides, óleos essenciais, saponinas, taninos, resinas, antocianosídeos e diterpenos clerodânicos, entre outros⁽³⁵⁻⁴⁰⁾. Na primeira edição da Farmacopeia Brasileira de 1929⁽⁴¹⁾ a *C. sylvestris* Swartz (Flacourtiaceae) encontra-se inscrita como erva de bugre, nome popular da *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth encontrada em Minas Gerais⁽⁴²⁾. A espécie *C. sylvestris* pertence à família Flacourtiaceae, e tem ampla distribuição em todo território brasileiro. Apresenta um porte de dois a mais de dez metros de altura em média. Aparece nas mais variadas formações florestais, com ênfase no sul do país, especialmente nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul podendo ser encontrada desde Cuba, Jamaica, Porto Rico, Ilhas Virgens, Trindade e Tobago, México, América Central e do Sul, principalmente Bolívia, Paraguai até o Uruguai^(43, 44). É uma planta perenifolia, heliófita, seletiva higrófila, característica e preferencial dos sub-bosques dos pinhais, menos frequente na floresta umbrófila densa e rara na floresta estacional semidecídua⁽⁴⁵⁾. Por ser planta pioneira, ocorre com grande frequência nas formações secundárias, como capoeiras e capoeirões. Como planta medicinal, suas porções mais utilizadas são a casca e as folhas⁽⁴⁵⁾. Apresenta-se distribuída em quase todo o território nacional e se destaca por sua copa globosa e densa, com flores de coloração creme, de cheiro forte, regularmente distribuídas ao longo dos ramos extremos. É uma das poucas espécies florestais melíferas durante o inverno. Como planta rústica é bastante comum em beira de estradas e ao longo de cercas. Suas folhas são usadas como depurativas, antirreumáticas, cicatrizantes e anti-inflamatórias; além de ter excelente ação contra picadas de jararaca e cascavel através do uso de infusão da casca. É empregada para outros fins, tais como em produtos madeiros (cochos, esculturas, gamelas, objetos ortopédicos, tamancos, celulose e papel, construção civil, canoa, jangada, lenha, carpintaria e marcenaria), produtos não madeiros (atividades apícolas, recurso para fauna, medicinal, ornamental, produto bioquímico, substâncias tanantes)⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾.

A *C. sylvestris* (FIGURA 1) é uma das poucas espécies florestais nativas que estão na Lista Na-

cional de Plantas Medicinais do Sistema Único de Saúde (RENISUS). A maioria das espécies citadas no RENISUS são exóticas, o que é indicativo da falta de conhecimento tradicional, problema ligado ao desmatamento histórico, extração predatória e consequente descaracterização das culturas locais⁽⁴⁹⁾.

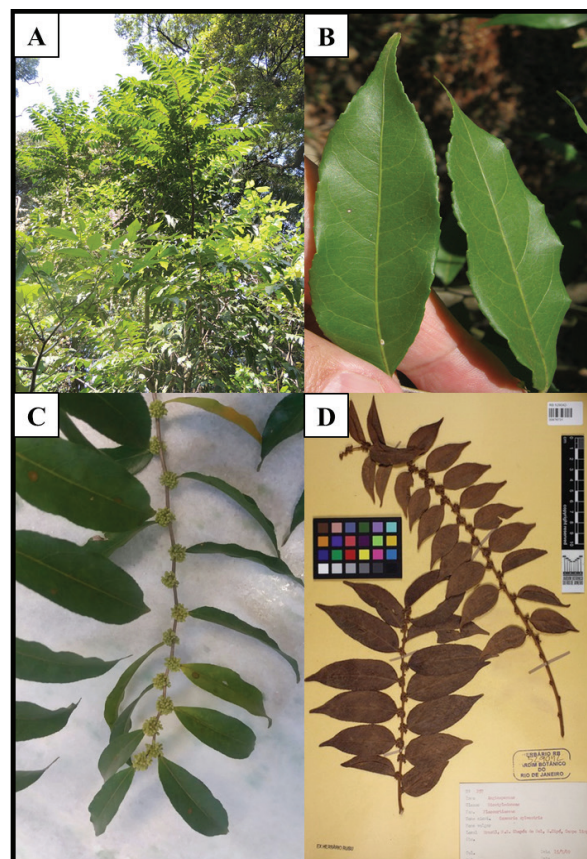


Figura 1: Aspectos da *C. sylvestris*. A: árvore, B: detalhe das folhas, C: inflorescência, D: exsicata dos galhos.

Fotos: A e B, Luis Carlos Marques. C: Alexandra C. H. F. Sawaya (usadas com permissão). D: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/ConsultaPublicoHVUC/ConsultaPublicoHVUC.do?idTestemunho=245991> Acesso 14/8/201.

Composição química da *C. sylvestris*

Da Silva⁽²²⁾ analisou a composição química de várias amostras de *C. sylvestris* utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção no ultravioleta (HPLC-UV), demonstrando que

existe grande variabilidade no conteúdo de rutina entre os indivíduos dentro e entre as populações estudadas (3,07 a 12,99 mg/g peso seco). As comparações estabelecidas entre as populações e entre os dois biomas estudados (cerrado e mata atlântica) em relação aos teores de rutina mostraram que as populações do cerrado foram as que apresentaram os valores significativamente maiores. O óleo

essencial das folhas apresentou um componente majoritário, o bicilogermacreno (67,19 %), sendo que todos os outros componentes apresentaram teor relativo inferior a 9,0 %⁽⁵⁰⁾. Outros trabalhos realizados com óleo essencial de folhas de *C. sylvestris* também demonstraram que o bicilogermacreno era um dos componentes (Tabela 1)^(36, 50-54).

Tabela 1: Constituintes principais¹ no óleo de folhas de *C. sylvestris* Sw.

Substância identificada ¹	Período	
	Manhã	Tarde
Longifoleno	1,8%	3,2%
β -Selineno	4,2%	5,2%
Germacreno-D	79,2%	66,2%
Germacreno-B	14,8%	13,7%
β -Gurjuneno	-	1,1%
δ -Gurjuneno	-	2,2%
Bicilogermacreno	-	3,6%

¹constituintes principais (teor relativo maior que 1%)⁽⁵⁰⁾.

Outros autores⁽³⁵⁾ estudando amostras de *C. sylvestris* por HPLC-DAD demonstraram que existe um perfil metabólico mais complexo em folhas e flores. Nas análises, foram identificadas casearinas ou a caseargrewiina F em folhas, flores e madeira do caule. Já o diterpeno b foi identificado na madeira e na casca do caule e na raiz.

As análises realizadas indicaram a presença de diterpenos clerodânicos típicos de Casearia em todos os órgãos avaliados. Nos métodos cromatográficos foram utilizados padrões, o que conferiu maior confiabilidade aos resultados qualitativos obtidos. Os resultados obtidos indicaram perfil metabólico mais complexo em folhas e flores. Foram obtidos perfis fitoquímicos de todos os órgãos, os quais podem ser utilizados na obtenção de substâncias de interesse relacionadas a propriedades farmacológicas exibidas pelos extratos da planta⁽³⁵⁾.

Aguilar⁽³⁶⁾ realizou uma cromatografia em camada delgada (CCD) de extratos (hexânico, etanólico e em acetato de etila) de diferentes partes (folhas e flores) de *C. sylvestris*. Através dos valores

de fator de retenção (Rf) de manchas dos extratos foi possível observar a presença de casearina X nos extratos EHFL (extrato hexânico da flor), EHFO (extrato hexânico da folha), EAFL (extrato em acetato de etila da flor) e EAFO (extrato em acetato de etila da folha). A presença de caseargrewiina F foi verificada em todos extratos incluindo o EEFL (extrato etanólico da flor) com exceção do EEFO (extrato etanólico da folha). A casearina B não foi identificada em nenhum dos extratos⁽³⁶⁾. A mesma autora quantificou os diterpenos nos diferentes extratos, expressos em caseargrewiina F. O extrato da folha em hexano (EHFO) foi o que apresentou o maior teor de diterpenos, de 40,59 %, seguido do extrato em acetato de etila da folha, de 28,18 %⁽³⁶⁾.

Visando a descoberta de novos compostos antitumorais da flora brasileira, as folhas frescas de *C. sylvestris* foram extraídas por arraste a vapor, obtendo-se um óleo amarelo pálido. A análise de seus componentes químicos foi realizada por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (GC-MS). Esta análise permitiu a identificação de vinte e três substâncias, correspondendo

a 98,73% da composição total do óleo. O óleo mostrou-se composto principalmente por α -zingibereno (48,31%), seguido de E-cariofileno (14,27%), γ -muuroleno (5,16%), viridifloreno (5,07%) e aco-radieno (4,11%)^(37, 38).

A combinação de parâmetros rigorosamente otimizados utilizando um planejamento experimental (DOE) que abrangeu tanto a extração de amostras como o método cromatográfico, permitiu que tanto os compostos fenólicos como os diterpenos do tipo clerodano fossem identificados como metabólitos secundários de *C. sylvestris*. Uma abordagem metabolômica foi essencial para encontrar o maior número possível de metabólitos secundários, resultado de um extrato de *C. sylvestris* muito complexo⁽²⁷⁾.

Outros diterpenos foram também identificados em *C. sylvestris*, *silvestrisida A*, *silvestrisida B*, *silvestrisida C*, *silvestrisida D* e *silvestrisida E*. Sesquiterpenos, fenilpropanoides, flavonoides, esteróides e outras substâncias fenólicas também foram identificadas^(40, 57, 58).

Atividade biológica da *C. sylvestris*

De acordo com Santos et al.⁽⁵⁶⁾ as indicações como antifúngico, antitérmico, cicatrizante e no tratamento de úlceras e gastrites são as mais citadas na literatura, sendo as folhas as partes mais utilizadas, seguidas por cascas do caule e raízes. Os resultados de um estudo demonstram que o extrato hidroalcolico de *C. sylvestris* Sw (*C. sylvestris*) apresentou atividade hipotrigliceridemiante em ratos machos adultos da linhagem Wistar, o que pode justificar o seu uso popular na redução de peso^(40,59). Também foi relatada a sua ação antihiperlipidêmica (uso popular)⁽⁶⁰⁾ e antitumoral^(38, 46, 61-63). A ação anti-inflamatória e antioxidante da *C. sylvestris* foi relatada⁽⁶⁴⁾. Também foi relatada a atividade de casearinas isoladas de *C. sylvestris* contra leishmania e *Trypanosoma cruzi*^(15, 37, 65, 66).

Um estudo realizado por Brant et al.⁽⁶⁷⁾ demonstrou que o extrato metanólico de *C. sylvestris* reduziu os lipídios séricos e o estresse oxidativo quando administrado oralmente a camundongos Swiss and LDLr-null. Além disso, foi possível pre-

venir o engrossamento das artérias induzido pela dieta rica em gorduras e inibir a agregação plaquetária *in vitro*.

Gusman et al.⁽⁶⁸⁾ descreveram a ação anti-inflamatória da *C. sylvestris* através de um mecanismo de inibição da produção de TNF- α de maneira dependente da concentração do extrato.

Em um estudo realizado com a *C. sylvestris*, ficou demonstrado que o extrato metanólico das folhas dessa planta possui um efeito hipolipidêmico (com a redução da LDL, VLDL, triglicerídeos e aumento de HDL) e protetor do endotélio (revestimento interno dos vasos) em camundongos com dieta hiperlipídica (rica em gorduras) auxiliando assim na prevenção do estreitamento das artérias e da agregação plaquetária que ocorrem na aterosclerose^(67, 69).

Segurança de uso da *C. sylvestris*

Os resultados do estudo de toxicidade aguda indicaram que a DL₅₀ (dose letal a 50%) é superior a 2000mg/kg e a toxicidade oral de vinte e oito e noventa dias mostrou que não foram detectados efeitos tóxicos em nenhum dos parâmetros avaliados: peso corporal e peso relativo do órgão, alterações gerais de comportamento, parâmetros hematológicos e bioquímicos, e exames histopatológicos. Com base neste resultado, foi sugerido que o extrato hidroetanólico de *C. sylvestris* pode ser seguro mesmo quando utilizado durante um longo período para fins terapêuticos^(70, 71). Entretanto, um trabalho desenvolvido por De Araujo et al.⁽⁶⁶⁾, sobre a toxicidade da *C. sylvestris*, mostrou que os animais apresentaram alterações histológicas sugestivas de neurotoxicidade e hepatotoxicidade, indicando a necessidade de precaução quanto ao consumo de formulações medicinais baseadas na planta. Avaliações detalhadas de toxicidade e efeitos colaterais também são necessárias para obter uma compreensão completa das atividades farmacológicas da *C. sylvestris*⁽⁴⁰⁾.

Cordia salicifolia

A árvore da porangaba (*Cordia salicifolia*, *C.*

salicifolia) é nativa do Brasil, das regiões centrais e mais ao norte e nordeste. É um fruto pequeno e redondo, de cores vermelhas, semelhantes ao grão de café e que também contém cafeína. Daí o nome popular cafezinho-do-mato, também pode ser encontrada em florestas da Argentina e Paraguai. Possui propriedades diuréticas, febrífugas (diminuição da febre) e ajuda a melhorar a circulação sanguínea. É comercializada como redutor de apetite, auxiliando o emagrecimento. É conhecida por outros nomes populares, tais como, café de bugre, café do mato, cafezinho, chá de bugre, chá de frade, claraíba, louro mole, louro salgueiro e porangaba⁽²³⁾. A porangaba (*C. salicifolia*), mais comumente encontrada em artigos científicos como *Cordia ecalyculata* Vell. (Boraginaceae) (*C. ecalyculata*), possui folhas alternas, lanceoladas ou oblongo-lanceoladas, ápice agudo, planas, membranáceas, glabras e estípulas ausentes⁽⁷²⁻⁷⁴⁾. Quando adulta, possui porte arbóreo, podendo atingir até vinte metros de altura por até trinta centímetros de diâmetro na base do tronco (Figura 2)⁽⁷⁴⁾.

Saito e Oliveira⁽⁷³⁾ caracterizaram botânica e quimicamente a *C. ecalyculata* Vell. (Boraginaceae). Nesse estudo, os autores já relatavam que a espécie poderia ser confundida com outras, entre elas *Rudgea viburnoides* (*R. viburnoides*). No entanto, estudos caracterizando farmacognosticamente as espécies do gênero *Rudgea* são escassos. Apenas a anatomia foliar de *Rudgea decipiens* e *Rudgea macrophylla* foi detalhadamente descrita⁽⁷⁵⁾. Um estudo realizado por Alves et al.⁽⁷⁶⁾, teve como objetivo a determinação de algumas características farmacognósticas das folhas de *R. viburnoides*, de modo a auxiliar na identificação taxonômica e no controle de qualidade de produtos com elas preparados. Todas as amostras comercializadas como congonha e/ou bugre, adquiridas nas ervanarias de Belo Horizonte corresponderam à *R. viburnoides*. Este quadro parece indicar que a espécie é facilmente reconhecida pelos raizeiros que coletam o material para comercialização. Apesar da uniformidade encontrada nas amostras, as mesmas são comercializadas com nomes e indicações terapêuticas diferentes.

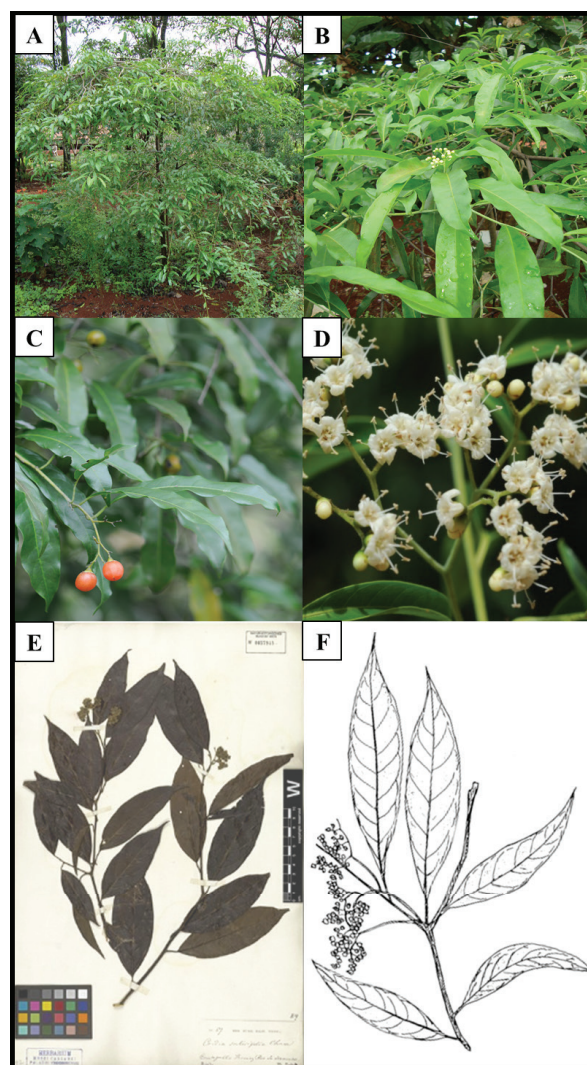


Figura 2: Aspectos da *C. salicifolia*. A: árvore, B: detalhe das folhas com flores, C: fruto; D: ramo florido, E: exsicata e F: desenho das folhas com frutos.

Fonte: A, B e C: Dra. Ana Maria Soares Pereira, Docente da UNAERP-RP, Brasil; B: Marcio Verdi (IFFSC-UFRGS), 2009; D: Sergio Bordignon (UFRGS), 2008; E: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/ConsultaPublicoHVUC/ConsultaPublicoHVUC.do?idTestemunho=2662138>. Acesso em 14/8/2017. F: SAITO, 1984 (Fotos usadas com permissão).

Composição química da *C. salicifolia*

Apesar da popularidade atribuída ao chá de bugre na medicina popular brasileira, poucos estudos

encontram-se na literatura a respeito da composição química desta planta. Os únicos relatos encontrados são referentes à presença de cafeína, sais de potássio, alantoína, ácido alantóico (que são particularmente abundantes nos frutos), hidróxiésteres alifáticos, tritriacontano, além de flavonoides, saponinas, taninos e mucilagens⁽⁷⁴⁾. O extrato diclorometânico das folhas de *C. salicifolia* foi estudado e, após purificação em colunas de sílica forneceu como constituintes principais o (+) espatulenol com teores ao redor de 0,53% e do β -sitosterol em concentrações de aproximadamente 0,24%⁽¹⁷⁾. O (+) espatulenol já tinha sido previamente descrito como sendo um componente presente no óleo essencial das partes aéreas de outras plantas do gênero *Cordia*, como por exemplo, *Cordia leucomaloides* Taroda, *Cordia curassavica* (Jacq.) Roen.& Schult⁽⁷⁷⁾ e *Cordia verbenaceae* D.C.⁽⁷⁸⁾. Apesar disso, altas concentrações deste componente somente foram observadas em *C. salicifolia*^(17, 19). Outros componentes também foram identificados como, por exemplo, hidrocarbonetos de cadeia longa (10 a 30 átomos de carbono), álcoois alifáticos de cadeia longa (12 a 28 átomos de carbono) e finalmente, ácidos graxos, como por exemplo, ácido palmítico (27,2%), ácido mirístico (8,4%), ácido esteárico (31,2%), ácido oleico (15,7%) e ácido linoleico (17,5%)^(17, 19). Foi desenvolvido e validado um método cromatográfico via HPLC para a determinação qualitativa e quantitativa do marcador químico alantoína, presente na *C. ecalyculata* (*C. salicifolia*). Os valores obtidos para a matéria prima foram de 0,32% na média, 0,75% para o extrato bruto, 0% para a fase hexânica, 0,15% para a fase acetato de etila e 1,54% para a fase aquosa⁽¹⁹⁾.

Encontram-se na planta alcaloides, quinonas, naftoquinonas, saponinas, taninos, ácidos fenólicos, alantoínas, mucilagens, polissacarídeos, flavonoides, ciclitóis e ácidos graxos de interesse terapêutico e nutricional, como o ácido gamalino-lênico^(19, 78-82).

Atividade biológica da *C. salicifolia*

Existem poucos relatos na literatura sobre a atividade biológica da *C. salicifolia*. Pesquisadores

japoneses demonstraram que extratos das folhas podem reduzir a penetração do vírus Herpes 1⁽¹⁶⁾. Tem sido utilizada popularmente como promotora de emagrecimento⁽¹⁸⁻²¹⁾. O componente principal do extrato em diclorometano das folhas de *C. salicifolia*, o(+)-espatulenol exibiu uma atividade muito fraca como inibidor do crescimento de *Helicobacter pylori in vitro* (concentração inibitória mínima de 200 $\mu\text{g/mL}$)⁽¹⁷⁾. Em contraste com o uso popular como antiobesidade, supressor de apetite e diurético, nenhum efeito foi detectado nesse sentido. Contudo, foi observado efeito hipolipidêmico em ratos normais e diabéticos induzidos por aloxano⁽⁸³⁾.

Dos Santos⁽³⁰⁾ avaliou o efeito de redução corporal de extratos de *C. salicifolia*. Ao final do tratamento, a massa corpórea dos animais que receberam o extrato foi similar ao grupo controle, demonstrando a ineficácia da planta na redução do peso corporal.

Segurança de uso da *C. salicifolia*

Existem poucos estudos sobre essa planta, apesar de haver uma comercialização significativa da mesma no Brasil. Não há comprovação científica destes efeitos descritos como emagrecedores e são necessários mais estudos pré-clínicos, clínicos e toxicológicos que certifiquem a efetividade e a segurança no uso dessa planta como emagrecedora⁽²⁰⁾.

A toxicidade aguda do extrato hidroetanólico das folhas de *C. salicifolia* foi avaliada (5000 mg/kg), onde este foi administrado durante 15 dias em ratos Wistar machos e fêmeas. No último dia, os animais foram necropsiados e alterações macroscópicas nos órgãos foram avaliadas. Os resultados indicaram ausência de toxicidade do extrato nos órgãos, que não promoveu mortalidade e não alterou o comportamento dos animais⁽⁸⁴⁾.

A administração oral diária do extrato aquoso, nas doses de 20, 100, 200 e 400 mg/kg, por um período de noventa dias, não causou modificações no ganho de peso corporal, no peso dos órgãos, nos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais. Estes resultados indicam que a adminis-

tração do extrato por um período mais prolongado não provocou efeitos de toxicidade nos animais ⁽¹⁸⁾.

O extrato hidroetanólico da planta (7:3) não mostrou efeito citotóxico e nem genotóxico em ratos machos Wistar ⁽²²⁾.

Araldi et al. ⁽²¹⁾ relataram que o tratamento combinado de *C. salicifolia* e *Spirulina maxima* em uma dose de 250 a 500 mg/kg provou ser um candidato promissor para terapia de redução de peso e não exibiu ação mutagênica em células de ratos ou humanas. Este efeito, aliado à ausência de efeitos adversos comumente observados em outros tratamentos similares com fármacos como a sibutramina, mostra grande potencial desses novos candidatos na redução da incidência de obesidade em combinação com mudanças de estilo de vida como educação nutricional e exercícios práticos.

Alves et al. ⁽⁴³⁾ realizaram um estudo a fim de determinar algumas características farmacodiagnósticas e auxiliar na identificação taxonômica e no controle de qualidade de produtos preparados das folhas de *Rudgea viburnoides*, conhecida como congonha, congonha-de-bugre e bugre de modo, pois na época, esta espécie vinha sendo comercializada e utilizada em regimes de emagrecimento, substituindo a *C. salicifolia*.

Outros estudos mostraram que extratos de *C. salicifolia* não apresentaram citotoxicidade e genotoxicidade, embora não fossem efetivos no tratamento da obesidade ⁽⁸⁵⁾.

Conclusão

Além da confusão gerada pelas características morfológicas semelhantes, a possibilidade de adulteração de preparações vegetais pode estar também ligada a diversidade de nomes vernaculares que são atribuídos às plantas, que podem variar para cada região do Brasil. Nomes populares (vulgares ou regionais) variam de local para local, de região para região, de um país para outro, podendo uma mesma planta ter diversas denominações e uma denominação ser comum para diversas plantas. No Brasil, diversas espécies são denominadas “guaçatonga”, uma das plantas utilizadas, sendo que a mesma denominação popular somada

à semelhança vegetativa entre as espécies ocasional, muitas vezes, dificuldades na sua identificação. Algumas espécies (por exemplo, *C. sylvestris* Sw., *Casearia obliqua* Spreng. e *Casearia decandra* Jacq.) são muito semelhantes vegetativamente. No comércio de plantas as Rubiáceas são habitualmente usadas como adulterantes da *C. salicifolia*. A *C. sylvestris* é utilizada como adulterante de *C. salicifolia*, a qual é comercializada com suposta ação emagrecedora, aumentando desta forma, a ação antrópica sobre a espécie. Existem relatos de profissionais que prescrevem a espécie *C. salicifolia* que quando utilizada em doses excessivas cronicamente pode ocasionar danos aos rins. A causa dessa toxicidade é desconhecida.

Agradecimentos

Os autores agradecem as fotos cedidas pela Profa. Dra. Alexandra C. H. F. Sawaya, da Faculdade de Farmácia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil e Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira, da UNAERP, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Referências

1. Soejardo, D.D. Biodiversity prospecting and sharing: from the field. *J. Ethnopharmacol.* 1996; 51: 1-15.
2. Carneiro, F.M.; Da Silva, M.J.P; Borges, L.L.; Albernaz, L.C.; Costa, J.D.P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. *Rev. Sapiên.* 2014; 3(2): 44-75.
3. Vendramini, J.R.H.E.A.; Reis, R.D.; Marques, L.C.; Marcucci, M.C. Controle de qualidade de fitoterápicos no Brasil: avaliação diagnóstica e propostas de intervenção. *Rev. Fitoter.* 2014; 14(2): 5-36.
4. Nascimento, V.T.; Lacerda, E.U.; Melo, J.G.; Lima, C.S.A.; Amorim, E.L.C.; Albuquerque, U.P. Controle de qualidade de produtos à base de plantas medicinais comercializados na cidade do Recife-PE: erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus spp*), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e camomila (*Matricaria*

- recutita L.). Rev. Bras. Pl. Med. 2005; 7(3): 56-64.
5. Souza-Moreira, T.M.; Salgado, H.R.N.; Pietro, R.C.L.R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. Rev. Bras. Farmacogn. 2010; 20(3): 435-440.
6. De Sousa, K.M.F. Controle de qualidade de amostras de *Ocimum gratissimum* adquiridas em ervanarias e farmácias de manipulação de Palmas-TO. Monografia de TCC em Ciências Farmacêuticas, Centro Universitário Luterano de Palmas, 2015, 49p.
7. Howard, R.A. Flora of the Lesser Antilles, Leeward and Windward islands. Vol. 5. Arnold Arboretum, Harvard University, Jamaica Plain, MA. 604 p, 1989.
8. USDA, United States Department of Agriculture, Forest Service International Institute of Tropical Forestry San Juan, PR Rocky Mountain Research Station Fort Collins, CO. General Technical Report IITF-GTR-26, July 2004. Wildland Shrubs of the United States and Its Territories: Thamnic Descriptions: Volume 1, Ed. John K. Francis.
9. Scavone, O., Grecchi, R., Panizza, S.; Silva, R.A.P.S. Guaçatonga (*C. sylvestris* Swartz) Aspectos botânicos da planta, ensaios fitoquímicos e propriedades cicatrizantes da folha. An. Farm. Quím. SP. 1979; 19: 73-81.
10. Basile, A.C.; Serie, J.A.A.; Panizza, S.; Oshiro, T.T.; Azzolini, C.A. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: preventive antiulcer activity and toxicity of the leave crude extract. J. Ethnopharmacol. 1990; 30: 185-197.
11. Itokawa, H.; Totsuka, N.; Takeya, K.; Watanabe, K.; Obata, E. Antitumor principles from *C. sylvestris* Sw Flacourtiaceae. Structure elucidation of new clerodane diterpenes by D NMR spectroscopy. Chem. Pharm. Bull. 1988; 36: 1585-1588.
12. Carvalho, P.R.F.; Furlan, M.; Young, M.C.M.; Kingston, D.G.I.; Bolzani, V.S. Acetylated DNA-damage clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. Phytochem. 1998; 49(6) 1659-1662.
13. Borges, M.H.; Soares, A.M.; Rodrigues, V.M.; Andrião-Escarso, S.H.; Diniz, H.; Hamaguchi, A.; Quintero, A.; Lizano, S.; Gutiérrez, J.M.; Giglio, J.R.; Homs-Brandeburgo, M.I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol. 2000; 127B: 21-30.
14. Santos, A.G.; Ferreira, P.M.P.; Vieira Júnior, G.M.; Perez, C.C.; Tininis, A.G.; Silva, G.H.; Bolzani, V.S.; Costa-Lotufo, L.V.; Pessoa, C.Ó.; Cavaleiro, A.J. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells. Chem. Biodiv. 2010; 7(1); 205-215.
15. Antinarelli, L.M.R.; Pinto, N.C.; Scio, E.; Coimbra, E.S. Antileishmanial activity of some Brazilian plants, with particular reference to *Casearia sylvestris*. An. Acad. Bras. Ciênc. 2015; 87(2): 733-742.
16. Hayashi, K.; Hayashi, T.; Morita, N.; Niwayama, S. Antiviral activity of an extract of *Cordia salicifolia* on herpes simplex virus type 1. Planta Med. 1990; 56: 439-443.
17. Menghini, L.; Epifano, F.; Leporini, L.; Paggiotti, R.; Tirillini, B. Phytochemical investigation on leaf extract of *Cordia salicifolia* Cham. J. Med. Food. 2008; 11(1): 193-194.
18. Caparroz-Assef, S.M.; Grespan, R.; Batista, R.C.F.; Bersani Amado, F.A.; Baroni, S., Dantas, J.A.; Cuman, R.K.N.; Bersani-Amado, C.A. Toxicity studies of *Cordia salicifolia* extract. Acta Sci. Health Sci. 2005; 27(1): 41-44.
19. Assonuma, M.M. Determinação de alantoina e avaliação farmacológica de *Cordia ecalyculata* Vell. (chá de bugre). Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, 2009. 82pp.
20. Pelizza, M.C. Uso de *Cereus* sp. e *Cordia ecalyculata* Vell. como emagrecedores: uma revisão. Trabalho de conclusão de curso, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010, 29p.
21. Araldi, R.P.; Rechiutti, B.M.; Mendes, T.B.; Ito, E.T.; Souza, E.B. Mutagenic potential of *Cordia ecalyculata* alone and in association with *Spirulina maxima* for their evaluation as candidate anti-obesity drugs. Gen. Mol. Res. 2014; 13(3): 5207-5220.
22. Da Silva, M.A.S. Variabilidade genética e fitoquímica de população do cerrado e mata atlântica de *Casearia sylvestris* Sw. Tese de Doutorado,

Faculdade de Ciências Agrônômicas – Unesp. Botucatu, São Paulo, Brasil, 2003, 155p.

23. Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2002, 512p.

24. Torres, R.B.; Yamamoto, K. Taxonomia das espécies de *Casearia* Jacq. (Flacourtiaceae) do estado de São Paulo. Rev. Bras. Bot. 1986; 9: 239-258.

25. Amaral, F.M.M.; Coutinho, D.F.; Ribeiro, M.N.S.; Oliveira, M.A. Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luis – Maranhão. Rev. Bras. Farmacogn. 2003; 13: 27-30.

26. Melo, J.G, Nascimento, V.T., Amorin, E.L.C.; Lima, A.C.S.; Albuquerque, U.P. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo, pata de vaca e gínco. Rev. Bras. Farmacogn. 2004; 14(2): 111-120.

27. Martins, E.L.P.; Brandão, M.G.L. Qualidade de amostras comerciais preparadas com *Aesculus hippocastanum* L. (castanha da Índia). Rev. Bras. Farmacogn. 2006; 16(2): 224-229.

28. Lucca, P.S.R.; Eckert, R.G.; Smanhotto, V.; Kuhn, L.M.; Minanti, L.R. Avaliação farmacognóstica e microbiológica da droga vegetal camomila (*Chamomilla recutita* L.) comercializada como alimento em Cascavel – Paraná. Rev. Bras. Pl. Med. 2010; 12(2): 153-156.

29. Barros, L.D.Q. *Cymbopogon citratus*: controle de qualidade de amostras comercializadas no município de Palmas – TO. Monografia de TCC em Ciências Farmacêuticas, Centro Universitário Luterano de Palmas, 2015, 45p.

30. Dos Santos, M.C. Avaliação do potencial tóxico reprodutivo do extrato de *Cordia ecalyculata* Vell., em ratos wistar. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP. 2014, 77p.

31. De Souza, K.M.F. Controle de qualidade de amostras de *Ocimum gratissimum* adquiridas em ervanarias e farmácias de manipulação de Palmas-TO. Monografia de TCC em Ciências Farmacêuticas, Centro Universitário Luterano de Palmas, 2015, 49p.

32. Maistro, E.L.; Carvalho, J.C.T.; Mantovani, M.S. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by

the comet assay. Toxicol *in vitro*. 2004; 18: 337-342.

33. Torres, R.B.; Ramos, R. Flacourtiaceae. In: Wanderley MGL, Shepherd GJ, Melhem TSA, Giulietti AM (Coord.). Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. São Paulo: Instituto de Botânica. 2007. p. 201-223.

34. Cavallari, M.M.; Billot, M.; Bouvet, J-M.; Favreau, B.; Zucchi, M.I.; Palmieri, D.A.; Gimenes, A. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae), a neotropical medicinal tree. Mol. Ecol. Res. 2008; 8: 802-804.

35. Carvalho, E.S.; Santos, A.G.; Cavalheiro, A.J. Identificação de diterpenos clerodânicos em diferentes órgãos de *Casearia sylvestris* Swartz. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl. 2009; 30(3):277-284.

36. Aguilar, P.F. Análise fitoquímica comparativa de flores e folhas de *Casearia sylvestris* Swartz. Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da UNESP, Araraquara, SP, Brasil, 2013. 75p.

37. Bou, D.D.; Lago, J.H.G.; Figueiredo, C.R.; Matsuo, A.L.; Guadagnin, R.C.; Soares, M.G.; Sartorelli, P. Chemical composition and cytotoxicity evaluation of essential oil from leaves of *Casearia sylvestris*, its main compound α -zingiberene and derivatives. Molecules 2013, 18: 9477-9487.

38. Bou, D.D.; Dos Santos, A.L.; Figueiredo, C.R.; Farias, C.F.; Matsuo, A.L.; Kitamura, R.O.S.; Gimenes, L.; Lago, J.H.G.; Sartorelli, P.; Dinor casearin X, a new cytotoxic clerodane diterpene from *Casearia sylvestris*. Braz. Chem. Soc. 2015; 26(8): 1725-1729.

39. Bueno, P.C.P.; Pereira, F.M.V.; Torres, R.B.; Cavalheiro, A.J. Development of a comprehensive method for analyzing clerodane-type diterpenes and phenolic compounds from *Casearia sylvestris* Swartz (Salicaceae) based on Ultra High Performance Liquid Chromatography combined with chemometric tools. J. Sep. Sci. 2015; 38: 1649-1656.

40. Xia, L.; Guo, Q.; Tu, P.; Chai, X. The genus *Casearia*: a phytochemical and pharmacological overview. Phytochem. Rev. 2015; 14: 99-135.

41. Brandão, M.G.L.; Cosenza, G.P.; Graell,

- C.F.F.; Netto Junior, N.L.; Monte-Mór, R.L.M. Traditional uses of American plant species from the 1st edition of Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2009; 19(2A): 478-487.
42. Carvalho, P.R.F.; Furlan, M.; Young, M.C.M.; Kingston, D.G.I.; Bolzani, V.S. Acetylated DNA-damage clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. *Phytochem.* 1998; 49(6): 1659-1662.
43. Alves, R.M.S.; Stehmann, J.R.; Isaias, R.M.S.; Brandão, M.G.L. Caracterização botânica e química de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth., (Rubiaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* 2004; 14(1): 49-56.
44. Little, E.L.; Wadsworth, F.L. Common trees of Puerto Rico and Virgin Islands. Washington: Department of Agriculture, 548 p, 1964.
45. Fernandes, V.F.; Thadeo, M.; Dalvi, V.C.; Marquete, R.; Meira, R.M.S. Colleters in *Casearia* (Salicaceae): a new interpretation for the theoid teeth. *Bot. J. Linnean Soc.* 2016; 181: 682-691.
46. Ferreira, P.M.P.; Costa-Lotufo, L.V.; Moraes, M.O.; Barros, F.W.A.; Martins, A.M.A.; Cavaleiro, A.J.; Bolzani, V.S.; Santos, A.G.; Pessoa, C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. *An. Acad. Bras. Ciên.* 2011; 83: 1373-1384.
47. Backes, P.; Irgang, B. Mata Atlântica: as árvores e a paisagem. Porto Alegre: Paisagem do Sul, 2004. 396p.
48. Carvalho, P.E.R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. v. 2, 627 p.
49. Rovedder, A.P.M.; Piazza, E.M.; Thomas, P.A.; Felker, R.M.; Hummel, R.B.; De Farias, J.A. Potential medicinal use of forest species of the deciduous seasonal forest from Atlantic forest biome, south Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2016; 59: e16150329.
50. Tininis, A.G.; Assonuma, M.M.; Telascra, M.; Perez, C.C.; Silva, M.R.S.R.M.; Favoreto, R.; Cavaleiro, A.J. Composição e variabilidade química de óleo essencial de *Casearia sylvestris* SW. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2006; 8(4): 132-136.
51. Moraes, S.M.; Machado, M.I.L. Essential oil of *Casearia grandiflora* Camb. *J. Ess. Oil Res.* 1997; 9: 697-698.
52. Esteves, I.; Souza, I.R.; Rodrigues, M.; Cardoso, L.G.V.; Santos, L.S.; Sertiè, J.A.A.; Perazzo, F.F.; Lima, L.M.; Schneedorf, J.M.; Bass, J.K.; Carvalho, J.C.T. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. *J. Ethnopharmacol.* 2005; 101: 191-196.
53. Schneider, N.F.; Moura, N.F.; Colpo, T.; Flach, A. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo volátil de *Casearia sylvestris* Swart. *Rev. Bras. Farm.* 2006; 87(4): 112-114.
54. Sousa, F.G.; Denardin, R.B.N.; Moura, N.F.; Dreves, S. Allelopathy and genotoxic potential of *Casearia sylvestris* Sw. extracts. *Allelop J.* 2007; 20(1): 195-202.
55. Bueno, P.C.P.; Verbipereira, F.M.; Torres, R.B.; Cavaleiro, A.J. Development of a comprehensive method for analyzing clerodane-type diterpenes and phenolic compounds from *Casearia sylvestris* Swartz (Salicaceae) based on ultra high performance liquid chromatography combined with chemometric tools. *J. Sep. Sci.* 2015; 38:1649-1656.
56. Santos, L.C.; Pellizzon, C.H.; Rocha, L.R.; Vilegas, W.; Souza Brito, A.R.; Cardoso, C.R.; Varranda, E.A.; Moraes, H.P.; Bauab, T.M.; Carli, C.; Carlos, I.Z.; Hiruma-Lima, C.A. *Byrsonima fagifolia*: an integrative study to validate the gastroprotective, healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. *J. Ethnopharmacol.* 2008; 120: 149-160.
57. Bueno, P.C.P.; Passarelli, F.; Anhesine, N.B.; Torres, R.B.; Cavaleiro, A.J. Flavonoids from *Casearia sylvestris* Swartz variety *lingua* (Salicaceae). *Biochem. System. Ecol.* 2016; 68: 23-26.
58. Santos, R.P.; Nunes, E.P.; Nascimento, R.F.; Santiago, G.M.P.; Menezes, G.H.A.; Silveira, E.R.; Pessoa, O.; Deusdenia, I. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the northeast of Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* 2006; 17: 1027-1030.
59. Werle, A.L.B.; Zanetti, G.D.; Ceron, C.S.; Melânia, P. Avaliação da atividade de *Casearia sylvestris* Swartz (Flacourtiaceae) sobre os níveis séricos de triglicerídeos em ratos. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2009; 19: 400-402.

60. Darabas, A.M.; Moreira, J.; Rossato, A.E.; Citadini-Zanette, V.; Amaral, P.A. *Casearia sylvestris* SW. (salicaceae) e *Jacaranda puberula* cham. (bignoniaceae): uso popular versus literatura científica. Vis. Acad. Curitiba. 2009; 10(1): 83-96.
61. Ferreira, P.M.P.; Bezerra, D.P.; Silva, J.N.; Da Costa, M.P.; Ferreira, J.R.O.; Alencar, N.M.N.; De Figueiredo, I.S.T.; Cavalheiro, A.J.; Machado, C.M.L.; Chammas, R.; Alves, A.P.N.N.; De Moraes, M.O.; Pessoa, C. Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component Casearin-X: *in vivo* and *ex vivo* methods and microscopy examinations. J. Ethnopharmacol. 2016; 186: 270-279.
62. Felipe, K.B.; Kwiecinska, M.R.; Da Silva, F.O.; Bückera, N.F.; Farias, M.S.; Castro, L.S.E.P.W.; Grinevicius, V.M.A.S.; Motta, N.S.; Correia, J.F.G.; Rossic, M.H.; Pedrosa, R.C. Inhibition of tumor proliferation associated with cell cycle arrest caused by extract and fraction from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). J. Ethnopharmacol. 2014; 155: 1492-1499.
63. Da Silva, R.M.; Verjee, S.; De Gaitani, C.M.; De Oliveira, E.R.M.; Bueno, P.C.P.; Cavalheiro, A.J.; Lopes, N.P.; Butterweck, V. Evaluation of the intestinal absorption mechanism of casearin x in Caco-2 cells with modified carboxylesterase activity. J. Nat. Prod. 2016; 79: 1084-1090.
64. Albano, M.N.; Da Silveira, M.R.; Danielski, L.G.; Florentino, D.; Petronilho, F.; Piovezan, A.P. Anti-inflammatory and antioxidant properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae). J. Ethnopharmacol. 2013; 147: 612-617.
65. Bou, D.D.; Tempone, A.G.; Pinto, E.G.; Lago, J.H.G.; Sartorelli, P. Antiparasitic activity and effect of casearins isolated from *Casearia sylvestris* on *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi* plasma membrane. Phytomed. 2014; 21: 676-681.
66. De Araújo, E.J.F.; De Oliveira, G.A.L.; De Sousa, I.Q.; Bolzani, V.S.; Cavalheiro, A.J.; Tome, A.R.; Peron, A.P.; Dos Santos, A.Q.; Citó, A.M.G.L.; Pessoa, C.; De Freitas, R.M.; Ferreira, P.M.P. Counteracting effects on free radicals and histological alterations induced by a fraction with casearins. An. Acad. Bras. Ciênc. 2015; 87(3): 1791-1807.
67. Brant, N.M.F.; Gasparotto, F.M.; Araújo, V.O.; Maraschin, J.C.; Ribeiro, R.C.L.; Lourenço, L.M.B.; Cardozo Junior, E.L.; Gasparotto Junior, A. Cardiovascular protective effects of *Casearia sylvestris* Swartz in Swiss and C57BL/6 LDLr-null mice undergoing high fat diet. J. Ethnopharmacol. 2014; 154: 419-427.
68. Gusman, G.; Campana, P.V.; Castro, L.C.; Castilho, R.; Teixeira, M.M.; Braga, F.C. Evaluation of the effects of some Brazilian medicinal plants on the production of TNF- α and CCL2 by THP-1 cells. EcAM. 2015; Article ID 497123, 11 pages.
69. Branta, N.M.F.; Gasparotto, F.M.; Araújo, V.A.; Maraschina, J.C.; Ribeiro, R.C.L.; Lourenço, E.L.B.; Cardozo Junior, E.L.; Gasparotto Junior, A. Cardiovascular protective effects of *Casearia sylvestris* Swartz in Swiss and C57BL/6 LDLr-null mice undergoing high fat diet. J. Ethnopharmacol. 2014; 154: 419-427.
70. Ameni, A.; Latorre, A.; Torres, L.; Górnaiak, S. Risk assessment of medicinal plant *Casearia sylvestris* Sw (Salicaceae). Toxicol Lett. 2014; 229S: S40-S252.
71. Ameni, A.Z.; Latorre, O.A.; Torres, L.M.B.; Górnaiak, S.L. Toxicity study about a medicinal plant *Casearia sylvestris*: A contribution to the Brazilian Unified Health System (SUS). J. Ethnopharmacol. 2015; 175: 9-13.
72. Matias, E.F.F.; Alves, E.F.; Silva, M.K.N.; Carvalho, V.R.A.; Coutinho, H.D.M.; Da Costa, J.G.M. The genus *Cordia*: botanists, ethno, chemical and pharmacological aspects. Rev. Bras. Farmacogn. 2015; 25: 542-552.
73. Saito, M.L.; De Oliveira, F. Características físicas e químicas do extrato fluido de *Cordia ecalyculata* Vell – Boraginaceae. Rev. Bras. Farmacogn. 1986; 1(1): 3-11.
74. Saito, M.L. Farmacognosia de *Cordia ecalyculata* Vell. (Boraginaceae). Dissertação de mestrado apresentada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 1984, 164 p.
75. Mantovani, A.; Gomes, M.; Gomes, D.M.S.; Vieira, V.C. Anatomia foliar de *Rudgea decipiens* Müll. Arg. e R. *Macrophylla* benth. (rubiaceae). Acta Bot. Bras. 1995; 9(2): 247-261.

76. Alves, R.M.S.; Stehmann, J.R.; Isaias, R.M.S.; Brandão, M.G.L. Caracterização botânica e química de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth., (Rubiaceae). Rev. Bras. Farmacogn. 2004; 14(1): 49-56.

77. Santos, R.P.; Nunes, E.P.; Nascimento, R.F.; Santiago, G.M.P.; Menezes, G.H.A.; Silveira, E.R.; Pessoa, O.D.L. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils of *Cordia leucomaloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil J. Braz. Chem. Soc. 2006; 17(5): 1027-1030.

78. De Carvalho, P.M.; Rodrigues, R.F.O.; Sawaya, A.C.H.F.; Marques, M.O.M.; Shimizu, M.T. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. J. Ethnopharmacol. 2004; 95: 297-301.

79. Fell, K.R.; Peck, M.J. Phytochemical investigation of some species of the Boraginaceae. Planta Med. 1968; 16(4): 411-420.

80. Velasco, L.; Goffman, F.D. Chemotaxonomic significance of fatty acids and tocopherols in Boraginaceae. Phytochem. 1999; 52: 423-426.

81. Kuroyanagi, M.; Seki, T.; Hayashi, T.; Nagashima, Y.; Kawahara, N.; Sekita, S.; Satake, M. Anti-androgenic triterpenoids from Brazilian medicinal plants. Chem. Pharm. Bull. 2001; 49(8) 954-957.

82. Arrebola, M.R.B.; Peterlin, M.F.; Bastos, D.H.M.; Rodrigues, R.F.O.; Carvalho, P.O. Estudo dos componentes lipídicos das sementes de três espécies do gênero *Cordia* L. (Boraginaceae). Rev. Bras. Farmacogn. 2004; 14(1): 57-65.

83. Siqueira, V.L.D.; Cortez, D.A.G.; De Oliveira, C.E.; Nakamura, C.V.; Bazotte, R.B. Pharmacological studies of *Cordia salicifolia* Cham in normal and diabetic rats. Braz. Arch. Biol. Technol. 2006; 49, n. 2, p. 215-218, 2006.

84. Dias, T.G. Estudo farmacognóstico de porangaba (*Cordia ecalyculata* Vell.-Boraginaceae) e identificação de adulterações. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP-São Paulo. 2004, 147p.

85. Da Silva, C.J.; Bastos, J.K.; Takahashi, C.S. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of crude extracts of *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus*. J. Ethnopharmacol. 2010; 127: 445-450.

FITOQUÍMICA: TRIAGEM EM EXTRATOS DE PLANTAS COM ABORDAGENS CROMATOGRÁFICAS “ESTADO DA ARTE”

Cavalaro, V.¹¹ ; Oliveira, C.R.²²

¹Cavalaro, Victor. Farmacêutico pela Universidade Anhembi Morumbi, São Paulo, Brasil. victor.cavalaro@yahoo.com. ²Carlos Rocha Oliveira _ Professor da Universidade Anhembi Morumbi.

Recebido em: out. 2017; aceito ago. 2018; publicado out. 2018.

Resumo

O uso de vegetais com propósito de utilização como medicamentos tem origens remotas na história do homem, no Brasil remonta ao período de pré-colonização, com os nativos habitantes do território somados às contribuições de colonizadores e escravos africanos e expandindo seu nível de aplicação atualmente, por ser uma fonte de matérias-primas facilmente obtidas e pela grande diversidade biológica das espécies vegetais presentes no território nacional. Antes do uso medicamentoso, é necessário preparar a planta e realizar estudos para elucidar a presença e ação dos metabólitos secundários que possuem efeitos biológicos e assim realizar extrações para verificar se há a presença de novos metabólitos secundários e a cromatografia nas suas várias frentes tem sido amplamente aplicada nesta linha de estudo, onde há a possibilidade de se realizar desde a triagem por atividades biológicas de interesse, como por exemplo, cromatografia em camada delgada com verificação da atividade inibitória em microrganismos ou antioxidantes até a classificação por classe e estrutura molecular, através de técnicas mais avançadas, mas já consolidadas, como cromatografia de alto desempenho, cromatografia gasosa e as abordagens das três técnicas hífenizadas com espectroscopia de massas, na qual é possível criar bancos de dados complexos contendo os metabolomas de cada espécie investigada. No entanto, não há trabalho em que a convergência de todas essas técnicas ocorra com a exposição dos principais avanços e perspectivas.

Palavras-chave: Fitoquímica, triagem cromatográfica, TLC, HPLC e GC

Introdução

Em 1993, foi proposta a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB), sendo o Brasil o signatário e o gestor do maior patrimônio de biodiversidade do mundo, já que existem mais de 46 mil espécies da flora catalogada no território nacional. A grande variedade de espécies deriva da diversidade de biomas presentes no Brasil e é devido a esta grande biodiversidade que o Brasil tem potencial para se tornar referência no mercado mundial

de ervas medicinais (MMA, 2015)

O conhecimento das plantas medicinais, que no Brasil deriva de nativos, africanos e colonizadores, ganharam força em virtude da inserção desse conhecimento, unindo-se às ações da política de saúde pública inserindo protocolos para o uso de 47 plantas que têm seus efeitos bem estabelecidos bem como os testes de novas plantas e regulamentações através da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e da Política Nacional de Plantas Medicinais e Ervas Medicinais

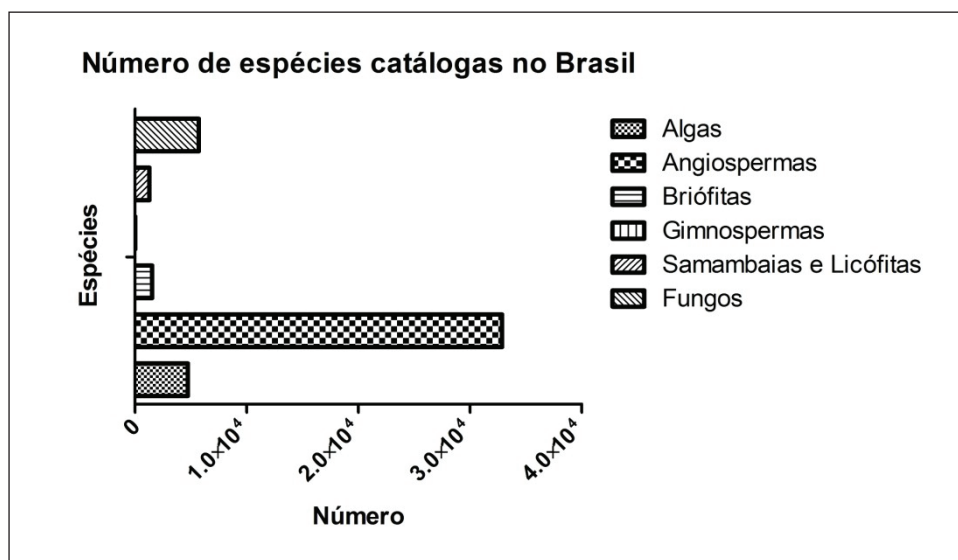


Gráfico 1 - Número de espécies catalogadas no Brasil, indicando o grande número para angiospermas que são as principais fontes de estudo para uso como medicamento (Adaptado de Sistema de flora do Brasil 2020, disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>, Autorizada pelos autores Cavalaro, V., Oliveira, C.R.).

(PNPMF) no Sistema Único de Saúde (SUS), bem como métodos de controle de qualidade através da revisão da Farmacopeia Brasileira (FB), que nesta sexta edição incluiu 150 monografias referentes a plantas medicinais, o que mais uma vez reforça que este setor possui grande posição estratégica para o país. (Antônio, Tesser e Moretti-Pires, 2014; MATOS, 2017; Carvalho et al, 2011 e ANVISA, 2011).

O uso de plantas medicinais se deve à atividade farmacológica de seus metabolitos secundários, facilidade de obtenção da matéria-prima e fonte de moléculas facilmente biodegradáveis, de modo que as atividades de pesquisa em Fitoquímica são realizadas com o objetivo de elucidar ou avaliar a presença de compostos químicos que constituem as espécies das plantas estudadas e, em geral, as etapas iniciais dos estudos em Fitoquímica seguem o racional apresentado na figura 1, onde o primeiro passo é a seleção das espécies vegetais e busca dos grupos de metabolitos secundários ou por uma classe específica, após se segue para a pesquisa e coleta das espécies em seu ambiente nativo, é nesse estágio que deve ser preparada uma exsicata com a identificação da planta e os dados do momento da coleta, caso a espécie vegetal seja desconhecida

ocorre primeiro a identificação botânica, com uso da exsicata, para depois realizar a caracterização fitoquímica. É então definido se as moléculas de interesse devem ser extraídas da amostra fresca ou se devem ser secas e estabilizadas. Finalmente, a extração ocorre pela adoção do método mais correto para o tipo de metabolito escolhido. (SIMOES et al., 2007; AL-RUBAYE; HAMMED; KADHIM, 2017).

Após a extração dos metabolitos antes da avaliação da atividade biológica, a estrutura da molécula deve ser esclarecida para identificar os grupos de atividade ou grupos de substâncias presentes. Existe a possibilidade de caracterização direta nos tecidos do material vegetal com grandes riscos de criar falsos positivos ou mesmo de não identificar grupos de grande importância e novos compostos. Assim, a extração torna-se necessária, como mostrado na figura 1. Após a extração, as reações químicas em tubos de ensaio serão usadas para verificar a precipitação ou alteração na coloração devido à presença de grupos funcionais conhecidos ou classes de metabolitos secundários, mas essas técnicas são muito simples já que revelam a presença de

grupos de metabólitos secundários sendo qualitativas e não são usadas para quantificação dos principais metabólitos secundários (marcadores) e não revelam maiores detalhes sobre a estrutura molecular do metabólito, sendo assim impossível identificar se o composto estudado é um novo metabólito secundário ainda não catalogado. Assim, é extremamente comum proce-

der às etapas de identificação por cromatografia de camada delgada (TLC), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG), ambas passíveis de serem acopladas à espectrometria de massa, espectroscopia de infravermelho com transformação de Fourier (IV-TF) e ressonância magnética nuclear do carbono e hidrogênio (RMN).

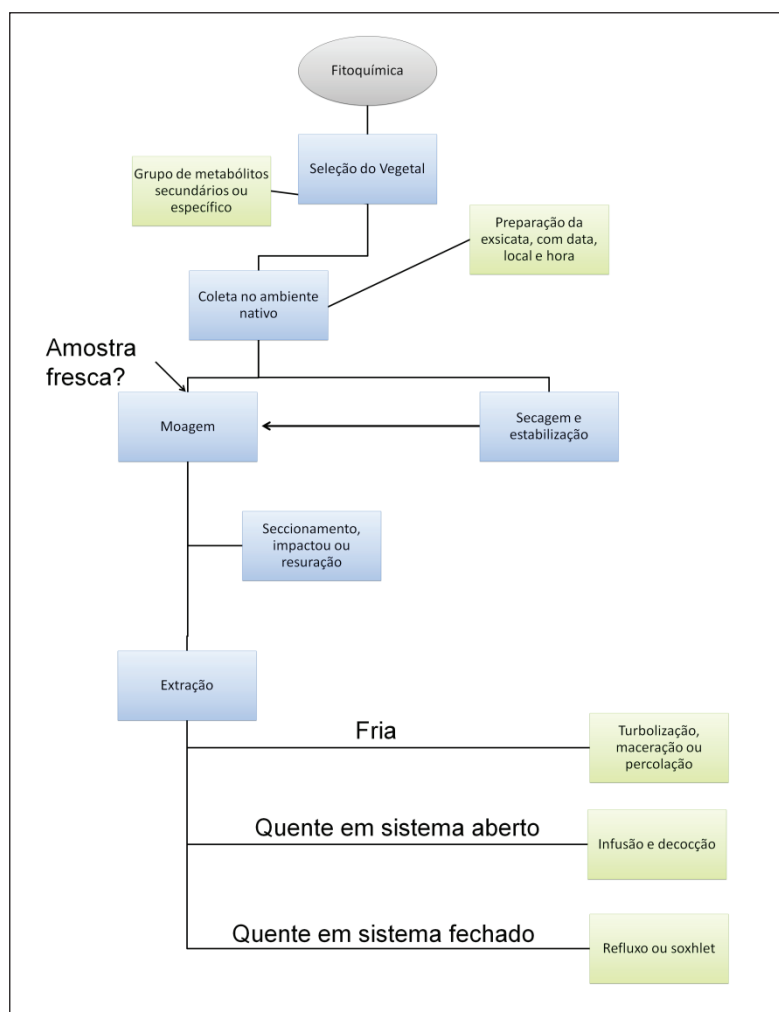


Figura 1 - Esquema do protocolo para o início do estudo da Fitoquímica, da escolha para obter o extrato vegetal. (Autorizada pelos autores Cavalaro, V., Oliveira, C.R.)

Portanto, a cromatografia aplicada à triagem em fitoquímica pode ser resumida como técnicas de separação e isolamento, com abordagens qualitativas e quantitativas, de misturas complexas nas quais elas precisam interagir com uma fase estacionária e através de uma fase móvel que flui continuamente por um determinado tempo controlado

ocorrerá a separação em momentos distintos que variam de acordo com os níveis e tipos de interações do composto com fase estacionária e da fase móvel e, finalmente, os compostos separados, chamados eluidos, são detectados por metodologia de reação (nos casos de TLC) ou por um detector instrumental que varia desde absorção no ultravioleta

até intensidade de íons. (SIMOES et al., 2007)

Assim, se pretende fornecer uma revisão sistemática da literatura com as técnicas de identificação e elucidação de estruturas nos compostos de plantas mais amplamente utilizados abrangendo as técnicas cromatográficas de TLC, CLAE e CG para orientar iniciantes nas ciências farmacognósticas onde a fitoquímica é um dos estágios de grande importância para a descoberta de novos compostos vegetais com atividades biológicas relevantes.

Materiais e Métodos

Uma revisão da bibliografia extensiva foi realizada através da pesquisa de artigos científicos em revistas indexadas nas principais bases de dados, como BIREME, PubMed, Medline, Science Direct e Google Acadêmico, utilizando descritores como fotoquímica e análise, caracterização de extratos de plantas, perfil de metabolismo vegetal e metabólitos secundários das plantas de 2014 a 2018, foram considerados artigos que tratam da demonstração da aplicação de cada técnica e suas vantagens.

Cromatografia da camada delgada, da separação aos estudos de atividade biológica

A cromatografia em camada delgada (TLC) é uma técnica amplamente utilizada na área cromatográfica devido à simplicidade, uma vez que não requer equipamentos complexos e treinamento extensivo dos praticantes bem como a identificação e determinação de compostos em uma amostra, determinação dos melhores solventes para a separação, aceitação de grandes quantidades de amostras, menor tempo de análise e sem necessidade de limpeza exaustiva das amostras, por exemplo, com a aplicação de extratos vegetais em bruto. (KOKO-TKIEWICZ, A. et al, 2018)

Nos últimos anos, uma das principais vantagens da triagem de compostos por TLC foi a possibilidade de verificação de propriedades biológicas por análise de efeito direto (AED), ou seja, a possibilidade de separação de compostos (voláteis ou não voláteis) ligados a um ensaio (TLC -DPPH) é um exemplo, testes antiestrogênicos, antimutagê-

nicos ou antimicrobianos e são geralmente referidos como bioautografia (TLC-B). (CHOMA, I.M., JESIONEK, W., 2014;;JESIONEK, W.; MAJER-DZIEDZIC, B.; CHOMA, I.M., 2015)

Lembrando que, antes da verificação da atividade biológica através da abordagem TLC-B, a eficácia de separação verificada em paralelo, seja por desenvolvimento com luz ultravioleta de comprimento longo ou curto ou por soluções de revelação como Dragendorff. A eficácia da separação cromatográfica será verificada pelo fator de retardamento (FR), pela relação da distância percorrida pelo composto pela distância percorrida pelo solvente (figura 2). (IUPAC, 2016).

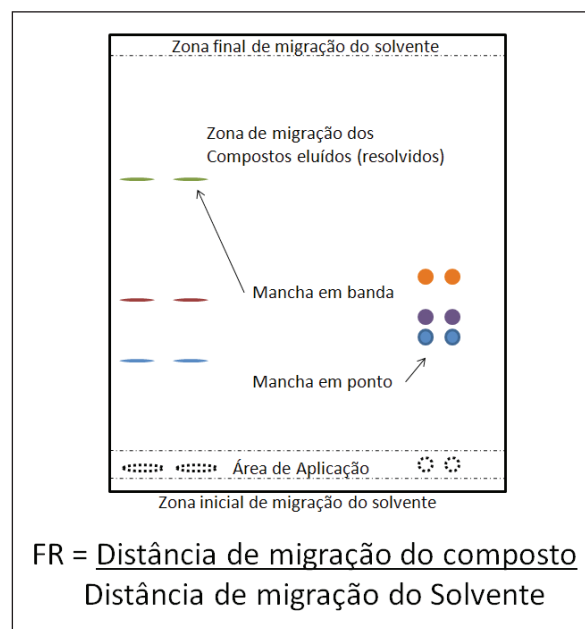


Figura 2 - Esquema de aplicação por mancha em ponto ou mancha em banda e cálculo de RF para TLC realizado antes do ensaio TLC-B. (Autorizada pelos autores Cavalaro, V., Oliveira, C.R.)

A TLC se mostrou ser o método ideal para a hifenização de métodos indicativos de atividade biológica, uma vez que a separação cromatográfica dos componentes ocorre em um sistema aberto, existe a possibilidade de separação de numerosos compostos em paralelo e a evaporação facilitada dos solventes. Dentro das possibilidades do TLC -B, existem três variantes possíveis: (CHOMA, I.; JESIONEK, W., 2014):

a. TLC de bioautografia direta, onde a separação biológica e o ensaio devem ser visualizados diretamente na placa de cromatografia, neste ensaio ocorre a possibilidade de usar TLC-DPHH ou ensaios de redução de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio de brometo (MTT);

b. TLC de bioautografia de contato, a placa de cromatografia com os compostos separados devem ser colocadas contra uma placa de agar previamente inoculada com microorganismos de interesse.

c. TLC de bioautografia de sobreposição, onde a placa de cromatografia com os compostos resolvidos deve ser colocada sobreposta por uma fina camada de Agar contendo microorganismos.

Foi indicado por Choma, Jesionek (2014) e Kokotkeiwicz (2017) que tanto as aplicações por mancha em ponto quanto as aplicações de manchas em banda/traço (Figura 2) foram eficazes contra as diferentes técnicas de TLC-B, onde a técnica pontual se apresentou mais adequada para a verificação da atividade antimicrobiana e aplicações em banda indicadas para verificar a atividade antioxidante e enzimática.

De acordo com Choma e Jesionek(2014), ainda existe a possibilidade de que, após a corrida cromatográfica em TLC, seja necessária a elucidação estrutural das moléculas de interesse através de hifenização em espectroscopia infravermelha (IV) com TLC-IV ou hifenização em espectroscopia de massa (MS) com TLC-MS, sendo necessária a extração das moléculas das partículas de sílica da placa de TLC após raspar as bandas de interesse.

Cromatografia líquida de alta eficiência, do arranjo de fotodiodo à espectrometria massas

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando o detector de absorvância no ultravioleta e visível é amplamente utilizada nos estudos de triagem e quantificação de metabólitos secundários devido à alta velocidade de obtenção dos resultados, identificação e quantificação de substâncias em pequenas concentrações, a grande capacidade de separação de compostos complexos em frações polares e apolares dos extratos vegetais

devido à grande variação das colunas cromatográficas disponíveis no mercado, a possibilidade de isolamento de frações através de técnicas preparativas e a obtenção de perfis ao usar detectores de fotodiodos (PDA) e espectrometria de massa (MS). (Pang, B. et. al., 2016)

A difusão da aplicação da CLAE na fitoquímica deve-se à necessidade de mapeamento, monitoramento e, ao mesmo tempo, quantificação de vários compostos presentes em extratos de plantas, neste nível de estudo o nome de metaboloma é adotado. Além disso, a alta reprodutibilidade da técnica para monitorar e qualificar/quantificar metabólitos secundários já conhecidos, chamados marcadores, garante o uso desta técnica em controles de qualidade, garantindo as quantidades mínimas em cada extrato, ao padronizar os extratos de plantas e garantir as identidades dos extratos, dado que a CLAE permite a separação de uma quantidade diversa de moléculas, dificultando assim a contaminação cruzada ou a falsificação.

Nas análises de CLAE, é possível identificar os compostos eluídos ao avaliar o tempo de retenção de cada composto (TR), avaliar os perfis gerados pelo tempo de retenção relativo (TRR) ao comparar os compostos eluídos com um marcador específico, verificar as diferenças dos espectros UV extraídos gerados por cada composto permitindo identificações e comparações quando a análise ocorre com detectores de fotodiodo (varredura no espectro ultravioleta e visível (UV-Vis)) e quantificação usando um padrão de referência com uma concentração conhecida por realizar da integral das curvas gaussianas (picos) e comparar a área obtida do composto padrão e o composto a quantificar, podendo ser da mesma molécula em análise ou molécula quimicamente semelhante, mas com um tempo de retenção similar. (Pang, B. et. al., 2016; VINAXIA et al., 2016).

A Figura 3 representa um cromatograma obtido com detector de arranjo de diodos (gráfico gerado pelo software de processamento de dados de HPLC, tempo versus a absorvância) representando o perfil dos metabólitos secundários hipotéticos encontrados em um extrato de planta. Cada composto (numerado 1 a 7) aparece como

uma curva gaussiana (pico) em um determinado momento, para o pico 4 foi realizado extração do

espectro UV que identifica a substância. Para os picos 2 e 7 TRR foi calculado como exemplo.

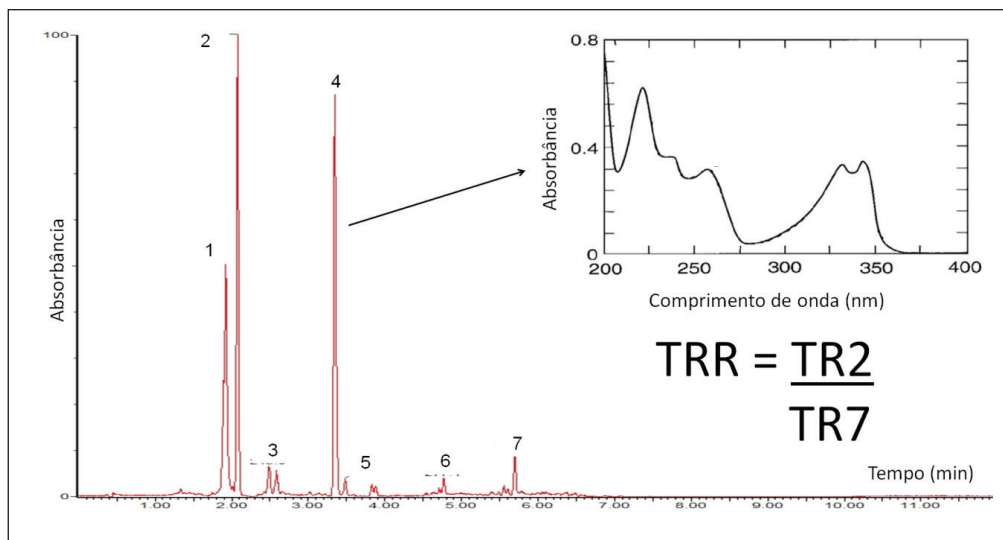


Figura 3 - Cromatograma representativo que ilustra uma análise de extrato de plantas com a separação identificada pelas RTs dos metabolitos secundários por detecção de DAD, com subsequente extração do espectro de ultravioleta para construir um perfil do extrato auxiliando pelo cálculo exemplificado de RRT. (Autorizada pelos autores Cavalaro, V., Oliveira, C.R.)

Outra maneira de monitorar o metaboloma presente no extrato, bem como construir o perfil do metabolismo e quantificá-lo via detecção por espectrometria de massa (MS). A técnica de CLAE hifenizada à espectrometria de massa (CLAE-MS) é caracterizada pela abundância relativa na amostra dos metabolitos secundários quando ionizados em relação à sua massa, ou seja, massa / carga (m/z). O detector consiste em: uma fonte de ionização que introduz e ioniza o eluído do CLAE, que é então passado através de um analisador de massa, onde ocorre a separação e seleção das massas de interesse. (POTTERAT; HAMBURGUER, 2014).

O mais comum no mercado, o modelo quadrupolar simples ou Tandem quadrupolo (isto é, permite a fragmentação das moléculas e ajuda na elucidação estrutural) e o tempo de voo (TOF) que separa as moléculas pelo seu tempo de voo de maneira predeterminada. Os primeiros são dispositivos de massa de baixa resolução, ou seja, eles indicam exatidão na decimal (10^{-1}) da m/z verificada e o segundo é um analisador de alta resolução, que pode atingir o décimo de milésimo (10^{-4}) da m/z verificada, com um alto poder de identificação di-

reta de moléculas, pois usa o conceito de defeito de massa, servindo como uma verdadeira impressão digital (*fingerprint*) de moléculas. Após a molécula cruzar os analisadores de massa, a detecção ocorre em um fotomultiplicador que converte o sinal em picos criando cromatogramas também com curvas gaussianas (picos) pela variação de tempo contra a abundância relativa do do íon, portanto é possível a extração dos espectros de massas fragmentadas ou isotópicas (Figura 4).

Foi descrito por Jesionex, Majer-Dziedzic e Choma (2015); Vinaxia, (2016), Keskes (2017) e Potterat e Hambuerguer (2014), que a técnica de CLAE-MS ou CLAE-MS-MS (para detectores com analisadores Tandem ou Tandem-TOF) tem sido de grande importância para garantir a elucidação estrutural e para a confirmação da presença dos metabolitos ou mesmo a identificação de novos metabolitos com potencial biológico. Além disso, com a possibilidade de elucidação estrutural, existe a possibilidade de verificar o metabolismo completo, não apenas o metabolito secundário de interesse, mas também as moléculas progenitoras, auxiliando na compreensão do metabolismo

da planta ou metaboloma. A forma de ionização por ser mais suave garante alta reprodutibilidade

da técnica e, portanto, armazenamento e troca de bases de dados entre laboratórios.

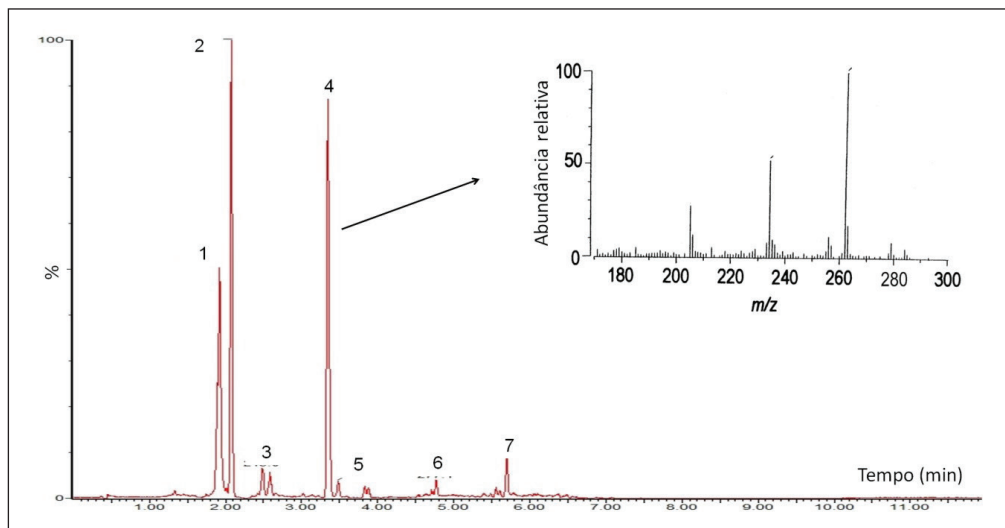


Figura 4 - Cromatograma representativo com extração do espectro de massas fragmentadas do pico 4 para avaliar a elucidação estrutural..(Autorizada pelos autores Cavalaro, V., Oliveira, C.R.)

Cromatografia de gasosa e espectrometria massa

A cromatografia gasosa (GC) é largamente utilizada para a análise de compostos apolares, óleos essenciais, ácidos gordurosos, lipídios e alcalóides que, embora não voláteis, podem ser quali/quantificados com reações de derivação de silano para reduzir o ponto de ebulição, mas se deve ter

em mente que tais reações podem gerar muitos subprodutos, uma vez que ocorrem em extratos de plantas. Além disso, possui grande aplicabilidade no controle de qualidade, como por exemplo, análise de fenóis para vinhos entre outros. (AL-RUBAYE; HAMMED; KADHIM, 2017) A Figura 5 representa um cromatograma típico por análise de GC onde o pico 1 indica a eluição do solvente de diluição da amostra.

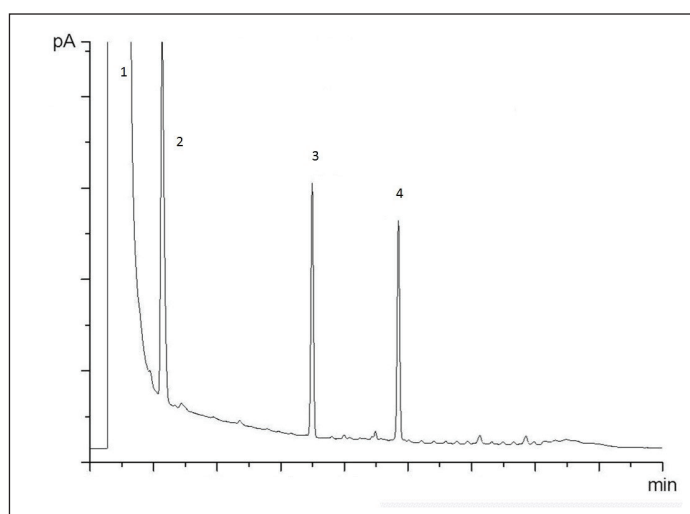


Figura 5 - Cromatograma esquemático de cromatografia em fase gasosa, representando a saída do solvente (1) e outros picos dos metabolitos secundários (2,3 e 4). (Autorizada pelos autores Cavalaro, V., Oliveira, C.R.)

Ao contrário da CLAE, a diversidade das colunas cromatográficas não é abundante no CG e a fase móvel deve ser um gás inerte que limita o potencial de separação uma vez que os compostos devem ter diferentes pontos de ebulição para garantir que os compostos sejam resolvidos além da necessidade de a fase estacionária permanecer em um forno com rampas de aquecimento ou aquecimento constante (técnica com grande tempo de análise) para garantir a separação cromatográfica. Finalmente, existem dois detectores de uso muito comum, como a condutância térmica (TCD) que verifica as diferenças na condutividade térmica do material eluído da separação do forno para interpretação como compostos distintos e é ideal para a separação com detectores de massa, uma vez que não são destrutivos e detectores de ionização de chama (FID), onde o material eluído é ionizado em uma chama de hidrogênio com alta potência redox, criando espécies iônicas (destruição da amostra) que, devido à diferença de carga, geram os sinais interpretados como compostos diferentes em ambos os casos o cromatograma é gerado em relação a intensidade do sinal pelo tempo. Assim, para a construção de perfis de metabolitos secundários e quantificações, se torna necessário usar substâncias de re-

ferência com concentrações conhecidas. Apesar das limitações, esta é uma técnica amplamente difundida, devido às facilidades de instalação e operação de baixo custo. (EL SOHLY et al., 2017, VINAXIA et al., 2016).

A técnica CG tem uma boa perspectiva, uma vez que pode ser facilmente acoplada a um detector de massa, permitindo a criação de perfis de metabolomas vegetais ricos em informações, uma vez que nesta técnica é possível analisar numerosos compostos das fases oleosas, além de CLAE-MS, a possibilidade de agregar informações a partir de bancos de dados disseminados, uma vez que ambas as técnicas foram amplamente utilizadas e descritas na literatura. (VINAXIA et al. 2016; HAMEED, ADNAN E HADHIM, 2015; KESKES et al. 2017 e GALINDO et al., 2017).

No entanto, Vinaxia et al (2016) infere que ao usar espectrometria de massa hifenizada a CG a intensidade de carga elétrica para ionização é mais pesada, cerca de 70 eV, quando comparada à CLAE-MS, sendo assim um processo menos reprodutível quando comparados, gerando erros na interpretação uma vez que substâncias com similaridade espectral a partir da degradação ou envelhecimento da amostra podem criar espécies com m/z similar.

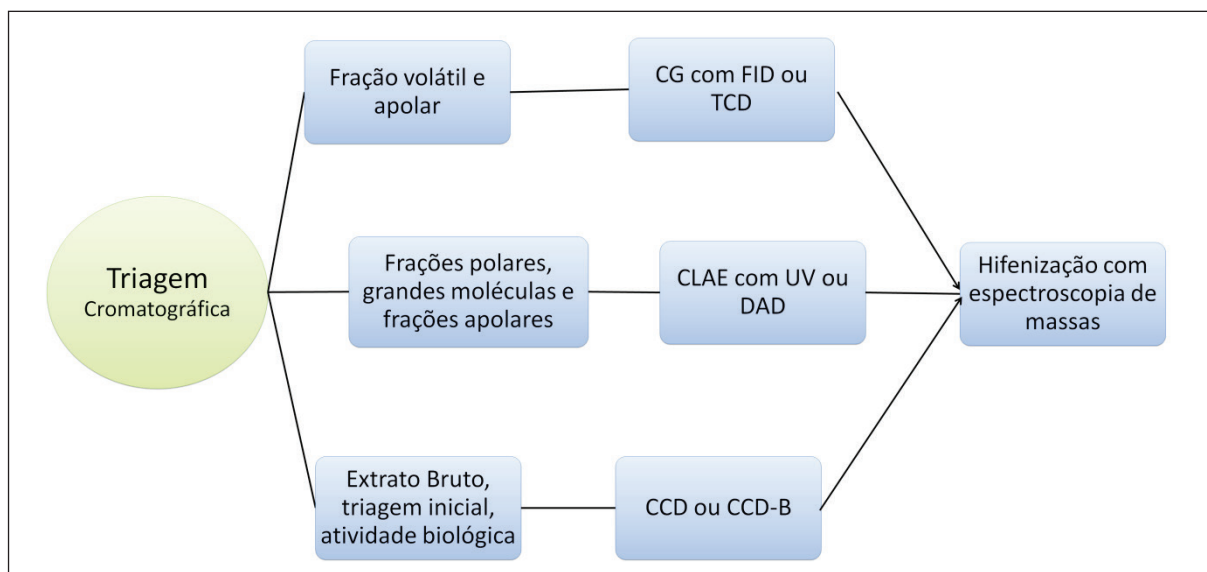


Figura 6 - Resumo esquemático da matriz de decisão para protocolos de teste em fotoquímica com abordagem cromatografia, indicando a necessidade de selecionar a fração de extrato e os testes necessários. (Autorizada pelos autores Cavalaro, V., Oliveira, C.R.)

Conclusão

Portanto, foi possível verificar que a cromatografia foi amplamente utilizada nos estudos de triagem fitoquímico para identificar novos compostos, bem como a confirmação de compostos já conhecidos. Existem possibilidades de verificação da atividade biológica dos metabólitos da planta e a grande importância da elucidação estrutural desses compostos e a elucidação dos metabolomas para uma melhor compreensão da fisiologia das plantas e sua aplicabilidade para fins farmacêuticos, uma vez que é uma área de grande crescimento e importância estratégica. A figura 6 resume as etapas de triagem por cromatografia.

Referências bibliográficas

AL-Rubaye, A.F.; Hameed, I.H.; Kadhim, M.J. A: **Review: Uses of Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Technique for Analysis of Bioactive Natural Compounds of Some Plants.** International Journal of Toxicological and Pharmacological Research, vol.9 issue.1 p. 81-85, mar. 2017.

ANTONIO, Gisele Damian; TESSER, Charles Dalcanale; MORETTI-PIRES, Rodrigo Otavio. **Phytotherapy in primary health care.** Rev. Saúde Pública, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 541-553, June 2014 ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2011. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia. Brasil.

CARVALHO, A.C.B., et al., 2011. **Regulation of herbal medicines in Brazil: Advances and perspectives.** Bras. J. Pharm. Sci. 47, 467 – 474.

CHOMA, I.; JESIONEK, W. **Effects-Directed Biological Detection: Bioautography.** In **Instrumental Thin-Layer Chromatography**; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2014.

GALINDO, J.L.G. et al. **The joint action in the bioactivity studies of Antarctic lichen Umbilicaria Antarctica: Synergic-biodirected isolation in a preliminary holistic ecological study.** Phytochemistry Letters, Elsevier, v. 20, p.433-442, jun. 2017

HAMEED, I.H.; ADNAN, I.; KADHIM, H.

Gas chromatography mass spectrum and Fourier transform infrared spectroscopy analysis of methanolic extract of Rosmarinus officinalis leaves. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy, p.; 90-106, jan. 2015.

IUPAC. União Internacional da Química Pura e Aplicada. **Compendium of Chemical Terminology.** The Gold Book, 1997, 2 ed, 1997. Online Corrected 2016.

MATOS, A. **Farmacopeia Brasileira tem nova atualização.** Disponível em: <<http://far.fiocruz.br/2017/02/farmacopeia-brasileira-tem-nova-atualizacao/>>. Acesso em: 12 Fev. 2018

JESIONEK, W.; MAJER-DZIEDZIC, B.; CHOMA, I.M. **Separation, Identification and Investigation of Antioxidant Ability of Plant Extract Components Using TLC, LC-MS and TLC-DPPH.** Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, Taylor & Francis: V. 38, n.11, p 1147-1153, mar 2015.

KESKES, H.; et al. **LC-MS-MS and GC-MS analyses of biologically active extracts and fractions from Tunisian Juniperus phoenicea leaves.** Pharmaceutical Biology, Taylor & Francis: p. 88-95, dez. 2017.

KOKOTKIEWICZ, A. et al. **Densitometric TLC analysis for the control of tropane and steroidal alkaloids in Lycium barbarum.** Food Chemistry, Elsevier: v.221, p 535-540, abr. 2017.

PANG, B.; et al. **The Applications and Features of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Traditional Chinese Medicine, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine:** vol. 2016, pages, 2016.

POTTERAT, O.; HAMBURGUER, M. **Combined use of extract libraries and HPLC-based activity profiling for lead Discovery: potential, challenges, and practical considerations.** Planta Medica, E-Thieme, v.80, p. 1171-1181, ago. 2014.

SIMÕES, C.M.O.; et al. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6 eds. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. 1104 p.

VINAIXA, M. et al. **Mass spectral databases for LC/MS- and GC/MS-based metabolomics: State of the Field and future prospects.** Trends in Analytical Chemistry, Elsevier, v. 78, p. 23-25, abr. 2016.

REVISÃO DE MÉTODOS CONVENCIONAIS DE CONTROLE DE QUALIDADE BIOLÓGICO DE BIOFÁRMACOS DE ORIGEM RECOMBINANTE E BIOSSIMILARES E PERSPECTIVAS DE MÉTODOS ALTERNATIVOS

Marcos Luengo-Blanco¹

¹Universidade Cruzeiro do Sul
Contato: marcos.luengo@cruzeirodosul.edu.br

Recebido em: abr. 2018; aceito jun. 2018; publicado out. 2018.

Resumo

A produção de biossimilares ou biofármacos com patentes expiradas pode ser uma oportunidade de crescimento para a indústria biofarmacêutica no Brasil. Entende-se por atividade biológica a habilidade ou capacidade específica do produto em obter um efeito biológico definido. Ela serve a múltiplos propósitos, na avaliação da qualidade do produto, sendo necessária para a caracterização e análise de medicamentos biossimilares, quando de sua comparação com um produto referência. Nessa breve revisão, o principal objetivo é explorar de forma mais crítica o desenvolvimento e padronização de novas metodologias, que possam avaliar a atividade biológica de biofármacos e biossimilares, sob a luz de rever os principais modelos celulares utilizados, para desafiar a potencialidade dessas moléculas de atividade biológica, comparado com os modelos clássicos de células da linhagem murinas ou leveduras. A evolução de estudos bioanalíticos em torno desse assunto poderá contribuir para a disponibilização de testes de atividade biológica de maior precisão, gerando resultados mais conclusivos e seguros para os testes clínicos de fase I, II e III, no processo de regulamentação dos biossimilares. Além disso, futuramente a aplicação de testes de avaliação biológica com mais recursos analíticos, poderão ser indicados também como referência metodológica para classes diversas medicamentosas de biofármacos.

Palavras-chaves: Biofármacos. Biossimilares. Métodos alternativos.

Biotecnologia e medicamentos biotecnológicos

Biotecnologia pode ser definida como o uso dos organismos vivos para solucionar problemas ou desenvolver produtos novos, úteis, processos ou serviços ^[1]. Estes podem englobar tecnologias de diversos níveis, desde uma fermentação para a produção de alimentos e bebidas até tecnologias modernas de manipulação genética que resultem na produção de proteínas com aplicações terapêu-

ticas ^[2]. A biotecnologia moderna surgiu no início dos anos 1970 como resultados de descobertas científicas no campo da engenharia genética e se tornou uma das maiores ferramentas de pesquisa científica. O desenvolvimento de inovação industrial no campo da biotecnologia moderna se apoia na compreensão de princípios científicos fundamentais, e sua base científica foi resultado do desenvolvimento da biologia molecular durante o século XX. Essa tecnologia revolucionou as ciências biológicas sobre tudo a capacidade de clonar

genes humanas em microrganismos, embora esse impacto possa ser percebido em diversas áreas do conhecimento, uma de suas maiores influências foi sentida na área de medicamentos, surgindo a utilização do termo fármaco biotecnologia, para designar a aplicação da biotecnologia em ciências farmacêuticas^[3]. Medicamentos biológicos de origem recombinantes ou medicamentos biotecnológicos são aqueles produzidos a partir de sistemas vivos, que possuem em formulação peptídeos, proteínas ou ácidos nucleicos (DNA e RNA) de ação farmacológica denominados biofármacos. Essas biomoléculas possuem estrutura molecular extensa, complexa e inerentemente heterogênea^[4]. Os primeiros biofármacos surgiram na década de 1980 e vêm ocupando atualmente um espaço cada vez maior no mercado farmacêutico. O Food and Drug Administration (FDA), órgão de administração federal dos EUA, aprovou a insulina humana como o primeiro produto biológico para uso clínico em seres humanos, a qual simboliza um marco na história da revolução farmacobiológica, desenvolvida pela Genentech, mas licenciada pela Eli Lilly, que a produz desde 1982. Naquela época, o produto tinha um mercado de aproximadamente 700 milhões de dólares anuais somente nos EUA. No Brasil esse trabalho foi realizado pelo grupo do professor Spartaco Astolfi Filho, com financiamento da Biobrás, do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico e da FINEP, dentro do convênio UnB/Biobrás e patenteado nos EUA^[5].

Outro exemplo é o caso da Eritropoietina, empregada no tratamento de anemia e coadjuvante no tratamento do Câncer. Atualmente essa substância, que obteve registro em 1989, é o biofármaco mais vendido no mundo, fatura uma receita anual superior a US\$ 10 bilhões. Segundo os biofármacos mais importantes são: Fatores sanguíneos: (Fator VIII e IX) e Agentes tromboembolíticos, Hormônios: (Insulina, Hormônio de Crescimento, Gonadotróficos), Citocinas: (Interferon- α , β , γ , Interleucinas); Fatores de crescimento hematopoiéticos: (Eritropoietina, Fatores estimuladores de colônias hematopoiéticas); Fatores de crescimento: (Fator de crescimento epidérmico); Imu-

nobiológicos: (Soros, Vacinas e Anticorpos monoclonais) e Enzimas terapêuticas: (Asparaginase, DNase, Superóxido dismutase, Lactase). Atualmente, cinco entre os dez medicamentos mais vendidos no mundo já são biológicos e as vendas de medicamentos produzidos por biotecnologia representam 31% das vendas dos 100 medicamentos mais vendidos. Esta proporção deve subir para 40% em 2018, com oito produtos biotecnológicos, dos quais seis anticorpos monoclonais, entre os dez mais vendidos, segundo o boletim da ANVISA em 2017. Os biofármacos atualmente aprovados para comercialização são utilizados para o tratamento ou prevenção de doenças como mal de Alzheimer, apneia do sono, artrite reumatoide, ataques cardíacos, Câncer de mama, câncer renal, dermatite atópica, diabetes, doença de Crohn, esclerose múltipla, fibrose cística, hemofilia, hepatite, enfarte cerebral ou apoplexia, insuficiência cardíaca, hanseníase, leucemia, leucemia linfocítica crônica, linfomas, lúpus e tumores cerebrais^[6].

Medicamentos biossimilares

Medicamentos biológicos chamados de biossimilares ou também "*Follow-On Protein Product*" na Europa é o termo usado para se referir ao biofármaco não inovador, portanto, os biossimilares são cópias de um biofármaco que tiveram sua patente expirada, e que demonstra ter uma eficácia similar e o mesmo perfil de segurança em humanos. O termo medicamento "genérico" é usado para descrever produtos medicamentosos químicos (produtos sintéticos) de pequenas moléculas que são estrutural e terapeuticamente equivalentes a um produto de referência cuja patente e/ou período de proteção de dados tenha expirado. A demonstração de bioequivalência do medicamento genérico com um produto de referência é geralmente adequada e suficiente para inferir a equivalência terapêutica entre o medicamento genérico e o produto de referência. No entanto, a abordagem estabelecida para os medicamentos genéricos não é adequada para o desenvolvimento, avaliação e licenciamento dos medicamentos biossimilares, uma vez que os biotecnológicos consistem de pro-

teínas complexas e relativamente grandes que são difíceis de caracterizar [7,8].

O desempenho clínico dos medicamentos biológicos é muito influenciado pelo processo de fabricação e alguns estudos clínicos também são necessários para sustentar a segurança e a eficácia de um medicamento biossimilar. Como acontece com qualquer programa de desenvolvimento de medicamento, o desenvolvimento de um medicamento biossimilar, envolve uma abordagem gradual que começa com a caracterização e avaliação dos atributos de qualidade do produto, seguido por estudos pré-clínicos e clínicos [9]. Os padrões estabelecidos pelo Comitê de Especialistas para a Padronização Biológica (CEPB) da Organização Mundial da Saúde servem como base para o estabelecimento dos requisitos nacionais para a produção, controle de qualidade e regulação em geral dos medicamentos biológicos. Além disso, os Padrões Internacionais de medida são ferramentas essenciais para o estabelecimento da potência dos medicamentos biológicos em todo o mundo [10,11]. Para testes de potência ou atividade biológica de um medicamento biossimilar, deve ser avaliado a partir de estudos comparativos entre um biofármaco de referência, frente ao produto biológico similar a fim de demonstrar a similaridade em termos de qualidade, segurança e eficácia. O produto biológico de referência deve fornecer a base para o estabelecimento dos perfis de segurança, qualidade e eficácia ao qual o produto biológico similar é comparado. Assim, também se estabelece, a seleção da dose e via de administração, onde esses dados são utilizados para sustentar a solicitação de licenciamento do medicamento similar em teste [12,13].

O delineamento dos estudos de eficácia e segurança, são demonstrados em ensaio(s) clínico(s) devidamente controlado(s), randomizado(s) e com poder estatístico adequado. Os estudos clínicos devem ser preferencialmente do tipo duplo-cego, ou, no mínimo, observador-cego. Na ausência de qualquer fator cego, uma justificativa cuidadosa será necessária para provar que os resultados do estudo estão livres de viés significativo. Em princípio, os desenhos de equivalência (que requerem

limites inferior e superior de comparabilidade) são claramente os preferidos para a comparação de eficácia e segurança do biossimilar comparado ao medicamento referência. Já os aspectos relacionados à qualidade do produto, a diretriz da OMS é clara ao definir que a comparação da qualidade mostrando similaridade molecular entre o produto biológico similar e o produto biológico de referência é indispensável para fornecer justificativas para a previsão do perfil de segurança e eficácia clínica; Pequenas diferenças no processo de fabricação podem afetar a farmacocinética, farmacodinâmica, eficácia e/ou segurança dos produtos biológicos.

Outro aspecto bastante relevante das características de biofármacos, refere-se ao potencial imunogênico dos produtos biotecnológicos. A resposta imune contra um produto biológico é influenciada por muitos fatores, tais como a natureza do princípio ativo (principalmente os proteínicos), impurezas relacionadas ao produto e ao processo, excipientes e estabilidade do produto, via de administração, regime de dose, e fatores relacionados ao paciente, à doença e à terapia. As consequências da imunogenicidade indesejada podem variar consideravelmente, desde clinicamente irrelevante até grave e potencialmente fatal. Portanto, a imunogenicidade dos produtos biológicos deve sempre ser investigada antes do licenciamento. Mesmo que a eficácia e a segurança entre um biossimilar e um produto referência tenham se mostrado semelhantes, a imunotoxicidade pode ainda ser diferente [14].

Controle de qualidade biológica de produtos biotecnológicos

As metodologias aplicadas em controle de qualidade de biofármacos, segue o mesmo perfil de ensaios de um medicamento comum, a maioria dos ensaios de caráter físico-químicos, são realizados utilizando metodologias instrumentais para avaliação quantitativa e qualitativa da natureza proteica de biomoléculas complexas. Para o controle microbiológico são pesquisados praticamente os mesmos parâmetros microbiológicos realizados

em medicamentos que exigem esterilidade ou de não estéreis, com a exceção pesquisa de possíveis contaminações por toxinas microbianas de origem do sistema biológico de produção^[15]. Uma vez que os produtos biotecnológicos de origem recombinante podem possuir variabilidades biológicas características, se faz necessário e obrigatório a realização de ensaios biológicos para garantir a qualidade biológica do processo de desenvolvimento e registro de novo produto biológico referencial ou biosimilar, assim como na rotina de produção, com o objetivo de detectar alterações em sítios específicos da macromolécula que podem repercutir na ineficiência do medicamento. Além de avaliar a ação farmacodinâmica do medicamento biológico, demonstrado em bioensaios baseado em cultivos celulares capazes de detectar a interação das moléculas terapêuticas e receptores específicos através de modelos celulares, possibilitando a medida de potência, assim como avaliar as características biológicas da evolução da célula tratada, tendo em conta os desvios estatísticos. Já para produtos com múltiplas atividades biológicas, esse produto deve atender um conjunto de ensaios funcionais relevantes, que possam atestar sua eficácia, em suas diferentes ações farmacológicas, de acordo, com seu uso clínico^[16]. De forma geral o estudo de qualidade de um medicamento biológico não se restringe somente à atividade biológica, mas sim uma gama de outras metodologias analíticas específicas que devem ser aplicadas no controle de qualidade de biofármacos; Além disso, o ensaio da atividade biológica colabora suplementando os resultados das propriedades físico-químicas devido ao potencial e adequação do método utilizado para confirmar a complexidade estrutural da proteína, (mostrando relação estrutura atividade^[16]). No entanto, a natureza dos ensaios biológicos, podem possuir uma elevada mutabilidade, devido aos agentes vivos utilizados para essas determinações analíticas, que devem ser levadas em consideração de forma rigorosa, principalmente o controle de bancos celulares utilizados para nas metodologias bioanalíticas. Os resultados dos ensaios biológicos deverão ser fornecidos e expresso em unidades de atividade. Calibrados com valores de padrões de

referência internacional ou nacional, de acordo, com suas especificações de fabricação^[17]. E por fim obrigatoriamente os estudos clínicos de fase I, II e III são preconizados tanto para o registro do produto referência como para o produto biosimilar, com o objetivo de apontar as diretrizes para estabelecer critérios de eficácia e segurança desses medicamentos, principalmente frente aos possíveis efeitos tóxicos *in vivo* humano. Portanto, pode ser considerado que um medicamento biológico biosimilar quando a comparado, com o produto farmacêutico de referência, por métodos adequados apresentando exatidão e precisão, mostram diferenças funcionais significativas, promovendo maior segurança da qualidade ao medicamento avaliado^[18].

Propostas de métodos alternativos para avaliação biológica de produtos biotecnológicos e seus biossimilares

De acordo com Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os medicamentos biológicos não são completamente caracterizados por análises químicas convencionais. "São necessários ensaios bioquímicos, imunológicos e ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* para avaliar sua atividade". Embora a qualidade dos métodos analíticos para caracterização de proteínas tenha aumentado drasticamente ao longo das últimas décadas, ainda existem obstáculos à completa caracterização de produtos bioterápicos complexos. Esses dados mostram a importância de testes de qualidade biológica mais detalhados e aprofundados, que podem estabelecer padrões de homogeneidade referente à ação biológica desses produtos frente às suas etapas de produção^[19]. Diante disso, através de aplicações biotecnológicas podem ser elaboradas, metodologias que possam ampliar os conhecimentos científicos em controle de qualidade biológico no Brasil, pois a capacitação da mão de obra constitui outro desafio na indústria brasileira. Outro ponto significativo tanto para o desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos, são os modelos celulares utilizados para a realização de metodologias que envolvem sistemas cultivo celular, para a avalia-

ção de atividade biológica, as quais são sempre recomendados por várias farmacopeias como por exemplo: americana, europeia, japonesa e chinesa [20,21,22]. No entanto, o índice de discordância entre os resultados de atividade biológica *in vitro* e *in vivo* utilizando as linhagens celulares oficialmente recomendadas, são bastante significativos. Nesse sentido, existe atualmente uma real necessidade de adaptação e refinamento, dessas metodologias indicadas pelas principais farmacopeias, explorando novos modelos celulares com características fenotípicas mais humanas, já que os principais modelos celulares hoje utilizados são de origem murina. Além disso, a aplicação de outras metodologias complementares que possam avaliar o grau de comprometimento, diferenciação e transdução de sinais promovidos pela ação dos produtos biológicos ou bioequivalentes, através de métodos moleculares mais sensíveis e precisos, permitirão inovações no setor de controle de qualidade de medicamentos, através da implantação e validação de métodos que utilizam biologia molecular analítica, tecnologia de cultura celular e citometria de fluxo. Nesse contexto, essa proposta atende às questões éticas sobre a experimentação animal, implantando ensaios *in vitro* de caráter pré-clínico, que possuem especificidade, produtividade da técnica e menor custo, por serem *in vitro* dispensando o uso de animais, praticando o conceito dos “3Rs” (“replacement, reduction e refinement”), isto é, substituição, redução e refinamento, no que se refere aos animais utilizados em experimentos, preconizando técnicas humanitárias, considerado como uma referência para a ciência contemporânea, de acordo com a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA). Outro aspecto positivo é que esse estudo atende às questões éticas sobre a experimentação animal, implantando ensaios que possuem especificidade, produtividade da técnica e menor custo por serem *in vitro*, dispensando o uso de animais, preconizando técnicas humanitárias, consideradas como referência para a ciência contemporânea [23].

Por fim, a elaboração e validação de metodologias empregadas na avaliação biológica, são de fundamental importância e colaboram com as

Boas Práticas de Fabricação dos produtos bioequivalentes no nosso país e a capacitação da mão de obra constituem um grande desafio na indústria brasileira. Além disso, os bioequivalentes podem ser peça chave para a saúde pública, disponibilizando o mesmo tratamento farmacoterapêutico, com a mesma qualidade do medicamento referencial e com menor custo. Estudos na literatura mostram que bioequivalentes, pré-aprovados em testes pré-clínicos não correspondem à mesma performance em testes clínicos humanos, resultando na exclusão dos processos de aprovação para o registro. A não coerência entre estudos *in vivo* e *in vitro*, segundo o “European regulatory guidelines for bioequivalents”, sugere possíveis falhas nos instrumentos de avaliação que geralmente se dão pela falta de sensibilidade dos métodos *in vitro* utilizados [25].

Conclusão

Diante de todo o exposto, pode-se concluir que apesar dos grandes avanços biotecnológicos no âmbito farmacêutico, além de aumentar a produção de insumos, e disponibilização de novos produtos, no entanto o grande desafio ainda persiste na expansão de desenvolvimento e padronização de métodos bioanalíticos, que possam garantir a qualidade desses novos medicamentos. Portanto, se faz necessário uma revisão crítica de estudos comparativos entre os modelos celulares murinos utilizados para a realização da atividade biológica de biofarmacos, com outras fontes celulares alternativas que possuem características fenotípicas mais próximas de humanos, aproximando mais os métodos *in vitro* ao cenário fisiológico humano. Os estudos de controle de qualidade de um medicamento, devem acompanhar as novas tendências tecnológicas de produção, como é caso dos medicamentos biológicos, os quais possuem perfis e mecanismos de ação mais complexos e suscetíveis a diversos tipos de alterações comprometendo sua eficácia e segurança. Futuramente esses estudos não só disponibilizarão ferramentas analíticas de grande precisão em testes de atividade biológica, como também poderão ser usados para avaliação de efeitos adversos ou como recursos analíticos

para identificação de novos biomarcadores farmacológicos. E por fim, o mercado biotecnológico farmacêutico brasileiro vem aumentando gradativamente, mas esse fato não garantiu a autonomia no desenvolvimento tecnológico, a elaboração e padronização de novos métodos bioanalíticos poderão contribuir para o avanço e desenvolvimento na área de biossimilares nacionais, que possuem elevado impacto nas áreas da saúde e econômica brasileira, bem como o contexto do desenvolvimento, domínio científico e independência tecnológica do país.

Referências Bibliográficas

1. Chooi SS, Katsuyama Y, Bai L, Deng Z, Ohnishi T, Kim ES. **Genome engineering for microbial natural product discovery**. *Curr. Opin. Microbiol.* 2018;(45):53-60.
2. BORZANI, W. et al. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. 1 ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001. v. 2.
3. Korte C, Quadbach J. Formulation development and process analysis of drug-loaded filaments manufactured via hot-melt extrusion for 3D-printing of medicines. *Pharm Dev Technol.* 2018;(9):1-11.
4. Parr MK, Montacir O, Montacir H. **Physicochemical characterization of biopharmaceuticals**. *J Pharm Biomed Anal.* 2016;(130):366-389.
5. Torres-Freire C, Golgher D, Callil V. *Biotecnologia em saúde humana no Brasil: produção científica e pesquisa e desenvolvimento. Dossiê desenvolvimento e inovação*. Novos estud. 2014; CEBRAP nº.98 São Paulo Mar.
6. Rantanen, J, Khinast J. 2015. The Future of Pharmaceutical Manufacturing Sciences. *J. Pharm. Sci.*, 2014; (11), 3612-3638.
7. Savla R, Browne J, Plassat V, Wasan KM, Wasan EK. **Review and analysis of FDA approved drugs using lipid-based formulations**. *Drug Dev Ind Pharm.* 2017; (11):1743-1758.
8. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) no135 de 18 de maio de 2011.
9. Grabowski HG, DiMasi JA, Long G. **The roles of patents and research and development incentives in biopharmaceutical innovation**. *Health Aff (Millwood)*. 2015;(2):302-10.
10. Elder DP, Kuentz M, Holm R. **Pharmaceutical excipients - quality, regulatory and biopharmaceutical considerations**. *Eur J Pharm Sci.* 2016;(87):88-99.
11. World Health Organization WHO Expert Committee on Biological Standardization. 2012;(964):1-228.
12. Bridges SL Jr., White DW, Worthing AB, Gravalles EM, O'Dell JR, Nola K, Kay J, Cohen SB. **The Science Behind Biosimilars: Entering a New Era of Biologic Therapy**. *Arthritis Rheumatol.* 2018;(3):334-344.
13. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RE) no 899, de 29 de maio de 2003.
14. Turecek PL, Bossard MJ, Schoetens F, Ivens IA. **PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs**. *J Pharm Sci.* 2016;(2):460-475.
15. Pinto TJA, Kaneko TM, Pinto AFT. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo, Ateneu, 2015, 7805 p.
16. Brinks V, Hawe A, Basmeh AH, et al. **Quality of original and biosimilar epoetin products**. *Pharm Res.* 2011;28(2):386-93.
17. Walsh G. **Biopharmaceuticals. Biochemistry and Biotechnology**. 2 ed. Chichester: Wiley, 2003. 551 p.
18. Zuñiga L, Calvo B. **Biosimilars approval process**. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2010;(3):374-7.
19. Arakawa H. **Development of Highly Sensitive Analytical Methods for Biologically Relevant Materials and Their Pharmaceutical Applications**. *Chem Pharm Bull.* 2017;12):1099-1112.
20. European pharmacopeia. London: EDQM. 2012; 7 th, 2015-2018.
21. British pharmacopeia. London: HMSO. 2011; v. I e II. (Ph. Eur. Monograph 2206).
22. Chinese Pharmacopoeia English Edition. 2010; 3: 266-269.
23. Cheluvappa R, Scowen P, Eri R. **Ethics of**

animal research in human disease remediation, its institutional teaching; and alternatives to animal experimentation. Pharmacol Res Perspect. 2017;5(4).

24. Grabowski HG, DiMasi JA, Long G. **The roles of patents and research and development incentives in biopharmaceutical innovation.** Health Aff (Millwood). 2015; (2):302-310.

25. Cai XY, Gouty D, Baughman S, Ramakrishnan M, et al. **Recommendations and requirements for the design of bioanalytical testing used in comparability studies for biosimilar drug development.** Bioanalysis. 2011;3(5):535-40.

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO TEA TREE OIL E SUA AÇÃO ANTIMICROBIANA EM BACTÉRIA PROPIONIBACTERIUM ACNES

Caroline dos Santos Fogaça de Andrade¹; Nilo Fuhr Batista¹; Priscila Rodrigues Lasakosvitsch¹; Carlos Rocha Oliveira²; Valéria Maria de Souza Antunes²

¹Graduandos do curso de Farmácia da Universidade Anhembi Morumbi, SP, Brasil.

²Professor da Universidade Anhembi Morumbi.

Recebido em: jan. 2018; aceito ago. 2018; publicado out. 2018.

Resumo

Nos últimos anos, de uma maneira geral, as pessoas estão focadas tanto na saúde como na aparência e veem buscando alternativas naturais de tratamento para diversas doenças e problemas. Uma alternativa que começou a ser explorada é o uso do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, uma planta nativa da Austrália com baixa citotoxicidade e diversas funções, dentre elas uma ação antifúngica, antiviral e antibacteriana contra muitas bactérias, como a *Propionibacterium acnes*, uma bactéria causadora de umas das principais doenças que acometem jovens e adultos que é a acne e a qual não se tem muitos estudos que comprovem essa ação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* em *Propionibacterium acnes* através do método de Mueller Hinton e Pour Plate e sua atividade citotóxica em fibroblastos através do método de determinação do IC₅₀ (método de exclusão por azul de tripan) e Ensaio de redução MTT à formazan e com isso conclui-se que o óleo essencial de *Melaleuca Alternifolia* tem baixa atividade citotóxica e alta atividade antimicrobiana contra a bactéria estudada.

Palavras-chaves: Pele. Óleo essencial de *Melaleuca Alternifolia*. *Propionibacterium acnes*. Citotoxicidade.

Introdução

O crescente desenvolvimento comercial e industrial na área dos óleos essenciais acompanha alterações globais, ocorrendo atualmente a maior produção em países exteriores à Europa tais como o Brasil (29%), a Índia (26%), os Estados Unidos (17%) e a China (9%). No entanto, o consumo e a preocupação com o controle de qualidade e com os aspectos relacionados com a saúde humana são particularmente significativos na Europa (MARTINS, *et al*, 2011). Devido à despreocupação de alguns países, a adulteração de óleos essenciais tem

sido uma prática constante e a determinação dos índices físico-químicos de densidade, rotação óptica e índice de refração são de extrema importância para detectar adulterações, muito comuns na comercialização dos óleos essenciais (SANTOS, *et al*, 2009). Por isso a normalização dos óleos essenciais tem posto em evidência os seus benefícios, mesmo em mercados onde juntamente com a intensificação da procura, a adulteração e a deficiência de controle são por vezes fatores críticos (MARTINS, *et al*, 2011).

A *Melaleuca alternifolia* Cheel, conhecida comumente como Tea Tree, é uma planta da famí-

lia Myrtaceae nativa da costa subtropical nordeste australiano (SILVA, 2001). Seu óleo é obtido das folhas (SIMÕES *et al.*, 2002) e sua cor vai de incolor a amarelo pálido (WHO, 1999). O óleo é composto principalmente por Hidrocarbonetos (Monoterpenos e Sesquiterpenos), Álcoois (Monoterpenóides e Sesquiterpenóides) e Óxidos. (SILVA, 2004).

Recentemente ganhou uma reputação como antisséptico seguro, eficaz e natural sendo atualmente incorporado como antimicrobiano principal ou como conservante natural em produtos farmacêuticos e cosméticos de uso externo (COX, *et al.*, 2000).

Apesar de sua popularidade como agente antimicrobiano, há poucos estudos que comprovam sua eficácia na diminuição de *Propionibacterium acnes*, que faz parte da biota natural da pele sendo o principal microrganismo envolvido na etiopatogenia da acne vulgar, uma doença dermatológica que acomete a saúde em seu completo estado de bem-estar físico, mental e social e comumente afeta jovens e adultos em todo mundo. Para garantir seu uso tópico é necessário ter conhecimento sobre a pele, o maior órgão do corpo humano, que tem como suas principais camadas, a derme e a epiderme, que se assentam em uma terceira camada, chamada hipoderme, além disso, deve ser

estudado se há atividade citotóxica do óleo contra as células desse órgão.

Aspectos botânicos

A *Melaleuca alternifolia* Cheel, conhecida comumente como tea tree, é uma planta da família Myrtaceae nativa da costa subtropical nordeste australiana (SILVA, 2001). O termo - tea tree, aparentemente, foi dado pelo Capitão James Cook em sua viagem exploratória pela Austrália em 1770, quando encontrou um arbusto de Myrtaceae, possivelmente uma espécie de *Leptospermum* sp., cujas folhas eram usadas pelos marinheiros em substituição ao chá de *Camellia sinensis*. (MAIDEN e BETCHE, 2013).

Essa árvore pode atingir até sete metros de altura, têm uma casca fina e folhas longas e pontiagudas que, quando partidas, emitem um aroma forte (SIMÕES, 2002). A cor do óleo dessa planta vai de incolor a amarelo pálido (WHO, 1999). A descrição olfativa de seu aroma pode ser: fresco, amadeirado, herbal, balsâmico e pungente (SILVA, 2001) e suas flores são amarelas ou púrpuras e naturalmente crescem em áreas pantanosas, porém já foram adaptadas a outros ambientes pelo homem (WALTERS, 2000). Na figura 1, estão representados arbustos de *Melaleuca alternifolia*, folhas e flores.



Figura 1: Fotografias de *Melaleuca alternifolia*. A) Planta inteira. B) Destaque para as flores Fonte: A) *Melaleuca alternifolia* (Cheel.), 2008a e B) *Melaleuca alternifolia* (Cheel.), 2008b.

Constituintes

O óleo, que é obtido das folhas (SIMÕES *et al.*, 2002), é composto principalmente por Hidro-

carbonetos (Monoterpenos e Sesquiterpenos); Álcoois (Monoterpenóides e Sesquiterpenóides) e Óxidos. (SILVA, 2004). Dentre esses compostos, pode conter quantidades variadas de terpe-

nos (pineno, terpineno e cimeno), terpinenol (terpinen-4-ol), sesquiterpenos e cineol, que são os constituintes mais importantes relacionados à atividade antimicrobiana (SIMÕES *et al*, 2002). Além destes componentes, a *melaleuca* apresenta pelo menos 48 componentes orgânicos, alguns dos quais raramente foram encontrados em outras plantas (CORAZZA, 2002). A concentração

de cineol depende da época em que a melaleuca é colhida; no inverno há um aumento da concentração deste composto, época ideal para colheita, pois poderia aumentar a propriedade antimicrobiana, em oposição ao verão, onde a concentração está diminuída (VADEMÉCUM, 2003). O Quadro 1 demonstra componentes da *Melaleuca alternifolia*.

Classe		Constituintes Principais	Composição %
Hidrocarbonetos	Monoterpenos	Alfa – pineno	0,8-3,6
		Beta – pineno	0,1-1,6
		Terpinoleno	3
		Alfa – tuieno	0,1-2,1
		Limoneno	0,4-2,77
		Para – cimeno	0,4-12,4
		Alfa – felandreno, sabineno	Traços – 3,2
		Alfa – terpineno	4,6-12,8
		Gama – terpineno	9,5-28,3
		Mirceno	0,1-1,8
	Alfa e beta – felandrano	Traços – 1,9	
	Sesquiterpenos	Beta – cariofileno	1
		Aromadendreno	0,1-6,6
		Delta – cadineno	0,1-7,5
		Allo – aromadendreno	0,3
		Alfa – muuroleno	0,1
		Viridifloreno	0,3-6,1
		Biciclogermacreno	0,1
		Alfa – gurjuneno	0,2
Calameno	0,1		
Alcoóis	Monoterpenóides	Terpinenol-4	29,4-44,9
		Alfa – terpineol	3,5-5
		Beta – terpineol	Traços
		p-cimeno-8	1
		Cis –tuianol-e e trans-tuianol-4	Traços
	Sesquiterpenóides	Globulol	0,1-3
		Viridiflorol	0,1-1,4
		Cubenol	0,1
Óxidos	1,8-cineol	0,5-18	
	Epóxicariofileno	Traços	
	1,4-cineol	Traços	

Quadro 1: Composição do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*. Fonte: SILVA, 2004.

O padrão exigido para a comercialização internacional do óleo essencial de melaleuca é definido por duas instituições: Standards Association of Australian (AS 2782-85) e a International Standard Organization (ISO - 4730, 1996). Ambas as normativas estabelecem a qualidade comercial pelas concentrações dos seus compostos majoritários, o terpinen-4-ol e 1,8-cineol, o primeiro responsável pela atividade antimicrobiana sendo que sua concentração no óleo essencial deve ser no mínimo 30% e o segundo componente, 1,8 cineol, que possui propriedades irritantes à pele, deve ter uma concentração máxima de 15% (CASTELO, 2013).

O óleo essencial das folhas da *Melaleuca alternifolia*, tem uma longa história como antisséptico de uso tópico. Recentemente ganhou uma reputação como antisséptico seguro, eficaz e natural. Isso gerou um ressurgimento de sua popularidade e atualmente é incorporado como antimicrobiano principal ou como conservante natural em produtos farmacêuticos e cosméticos de uso externo (COX, *et al.*, 2000). Além disso, o óleo reduz a taxa de reprodução de patógenos (bactérias, fungos, vírus), e intensifica a resistência contra esses agentes agressores, por esse motivo é útil nas afecções do couro cabeludo, como a caspa, e de pele, como a acne grau I e grau II (TESKE; TRENTINI, 2001). Com outras ações, o óleo essencial de melaleuca também reduziria a inflamação local talvez por diminuir a liberação de histaminas (KOH *et al.*, 2002). As propriedades anti-inflamatórias contribuem com a cura de feridas crônicas e são baseadas na supressão da produção de mediadores inflamatórios pela ativação dos monócitos (FINLAY-JONES *et al.*, 2001; HART *et al.*, 2000).

É amplamente indicado em casos de acne, onicomicoses, candidíase, herpes labial entre outros (HAMMER *et al.*, 2003) e tem incrível capacidade bactericida tanto nas espécies gram-positivas quanto nas gram-negativas, além de sua atividade antifúngica potente (SILVA, 2001). O uso de um gel para acne com óleo essencial de melaleuca a 5% demonstrou menos efeitos colaterais quando comparada ao uso de loção com peróxido de benzoíla a 5%, embora o início da ação de produto seja mais lento (BASSETT *et al.*, 1990). O efeito do pe-

róxido de benzoíla não é tão intenso e duradouro como o da melaleuca e causa maior intolerância ao produto (ALONSO, 1998). A concentração ideal para uso da melaleuca em cosméticos é de 2 a 5 % para que este seja usado com segurança (CARVALHO e ALMANCA, 2003).

Ação antibacteriana

A quantificação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é indispensável na exploração de sua aplicação. Eles, tal como outros agentes antimicrobianos podem exercer os mais variados efeitos sobre a célula microbiana, quer na sua estrutura, quer no seu funcionamento. (BURT 2004, LAHLOU 2004).

Em muitos casos, a propriedade antimicrobiana se dá pela ação de constituintes monoterpenos que causam danos à membrana celular do microrganismo (COX *et al.*, 2000). O mecanismo de ação bactericida consiste no comprometimento da integridade da membrana celular, conseqüente perda de material intracelular, incapacidade de manter a homeostase e inibição da respiração (CARSON *et al.*, 2006).

Segundo COX *et al.* (2000), a ação antimicrobiana do óleo essencial de melaleuca pode resultar da habilidade de destruir a barreira permeável das estruturas da membrana celular de bactérias, este é um modo de ação similar aos conservantes como derivados de fenol, clorexidina e derivados do ácido parabenzóico e de desinfetantes ativos contra a membrana celular. Contudo, por possuir cerca de 100 componentes, existe a possibilidade de não ter sido pesquisado todo o potencial de atuação. Sendo assim é possível que outros elementos, ainda não avaliados, contribuam para a atividade antimicrobiana com mecanismo de ação diferente daquele já encontrado (HAMMER *et al.*, 2003).

Dentre os componentes do óleo o componente Terpinen-4-ol está presente em 30-40% da composição (CARSON *et al.*, 2006), sendo o que detêm a principal atividade antimicrobiana. O 1,8-cineole, considerado irritante da pele, pode aumentar a permeabilidade da membrana facilitando a entrada de outros agentes antimicrobianos e por

isso alguns autores o consideram como detentor de efeito antimicrobiano marginal. (OLIVEIRA, *et al.*, 2011).

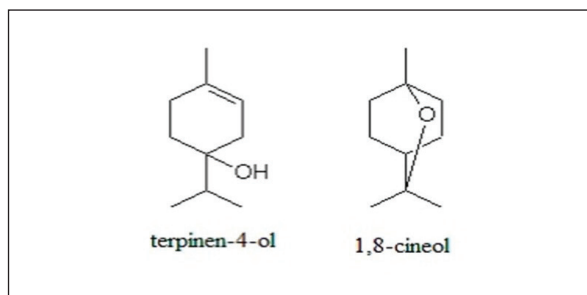


Figura 2: Principais componentes com ação antimicrobiana.

Fonte: OLIVEIRA, *et al.*, 2011.

Dados recentes mostram que o óleo de melaleuca possui amplo espectro de ação antimicrobiano, possuindo efeito bactericida *in natura* e bacteriostático em baixas concentrações (Wilkinson & Cavanagh, 2005; Kwiecinski *et al.*, 2008; Vuuren *et al.*, 2009).

Material e Método

Óleo essencial: O Ativo utilizado foi o óleo essencial puro de *Melaleuca alternifolia*, lote: 0043/13, fabricado em: 01/13 e vencimento em: 01/16, produzido pela empresa WNF (World's Natural Fragrance).

Método

O presente Trabalho de Conclusão de Curso foi desenvolvido no laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células da Escola de Ciências da Saúde da Universidade Anhembi. A linhagem de fibroblastos L929 foi submetida ao tratamento com diferentes concentrações do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*. Após os tratamentos foi realizada uma avaliação da viabilidade celular do composto testado frente à linhagem L929.

Cultura celular

As células da linhagem L-929 foram cultiva-

das em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 IU/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células foram mantidas em frascos de 25 cm² (1 × 10⁵ cells/mL) em estufa úmida com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Em todos os experimentos as culturas de fibroblastos foram submetidas ao teste de viabilidade celular utilizando o corante azul de tripano e realizado a leitura em câmara hemocitométrica por microscopia óptica. Todos os experimentos descritos foram realizados quando a viabilidade celular for igual ou superior a 95%.

Avaliação da citotoxicidade (determinação do IC₅₀)

Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial de *Melaleuca Alternifolia* foi realizada pelo método de incorporação do corante azul de tripano, onde após 48 horas de incubação o conteúdo de cada poço das culturas de fibroblastos foi recolhido em tubos de 15 mL, e centrifugados a 1500 rpm por 8 minutos. Os *pellets* foram ressuspensos em 1mL de meio RPMI. Após isso, as soluções de células foram diluídas (1:2) em corante de azul de tripano e a contagem das células viáveis e inviáveis foi realizada em câmara hemocitométrica por microscopia óptica. A soma da contagem de células totais (viáveis e inviáveis de cada poço) foi considerada como 100% de células, sendo realizados os cálculos para verificar as porcentagens correspondentes às células viáveis e as inviáveis analisadas no experimento.

Ensaio de redução MTT à formazan.

O teste de redução MTT ([3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazólio]) é usado com grande sucesso para estimar o número de células viáveis em um *screening* inicial de fármacos. Sua interpretação serve de indicativo da atividade metabólica celular, e o local de ocorrência das reações redox inclui tanto mitocôndrias como o citosol. A redução do sal de MTT à formazan é realizada principalmente pela enzima succinato-desidrogenase, e resulta em cristais de formazan

insolúveis na cor violeta. A intensidade da coloração é utilizada para medir a atividade mitocondrial e conseqüentemente a viabilidade celular (MOSMANN et al., 1983). Assim, às células foram tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e na concentração 5×10^4 células por poço, foram adicionados 10 μ l da solução de MTT 5mg/ml (Sigma-Aldrich) em cada poço. Após 4 horas, a placa foi centrifugada,

o sobrenadante de cada poço descartado e o pellet com os cristais formado no fundo da placa, dissolvido com 100 μ l de etanol puro e em seguida homogeneizado em agitador de placas por 15 minutos. A densidade óptica foi medida pelo leitor de microplacas (FlexStation® 3 multimode benchtop reader) em 540 nm. A percentagem de sobrevivência celular na presença dos compostos em estudo foi calculada da seguinte maneira:

$$\% \text{ Células viáveis} = \frac{\text{Absorbância por poço (com droga)} \times 100}{\text{Absorbância do controle (sem droga)}}$$

Teste de determinação de apoptose através da avaliação da integridade das moléculas de DNA

Para a análise qualitativa de fragmentos de DNA resultante de clivagem internucleossomal, 5×10^5 de células/mL da linhagem L929, tratada com diferentes concentrações de *Melaleuca alternifolia*, foram submetidas à extração de ácidos nucleicos segundo Sambrook & Russel, 2001. Após a extração do DNA genômico, as amostras e os padrões de bandas de DNA foram analisados por eletroforese em gel de agarose em concentração de 0,8% e 1,5%, corados com brometo de etídio. Os géis foram visualizados e fotografados sobre luz ultravioleta usando um fotodocumentador com sistema de captura digital de imagem.

Avaliação da ação antimicrobiana

Meio de Cultura Mueller - Hinton

Cepa teste

Foi utilizada uma cepa teste de *Propionibacterium acnes* ATCC 11827, gentilmente cedida pela empresa PROBAC do Brasil, conservada em meio Tioglicolato e repicada em meio BHI para enriquecimento. A suspensão da cepa foi realizada em solução salina (NaCl a 0,85% p/v), a qual foi padronizada de acordo com o tubo 0,5 da escala McFarland correspondendo à concentração de aproximadamente 108 UFC/mL (técnica adaptada de BAUER et al., 1966).

Avaliação da Atividade

Foi utilizado um disco contendo o antibiótico Clindamicina (controle), que é considerado o mais potente para acne devido à supressão da proliferação da bactéria *Propionibacterium acnes* nos folículos pilosos afetados, com redução da inflamação local. Seu uso é tópico e a concentração utilizada está entre 1 a 2% (COSTA e BAGATIN, 2013). Utilizaram-se discos embebidos com 25 μ l, 50 μ l e 75 μ l do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* brutos e em seguida, colocados em placas de Petri estéreis contendo ágar Muller-Hinton inoculado com a suspensão bacteriana descrita anteriormente, com o auxílio de “swabs” estéreis, o teste foi feito em triplicata. Após isso houve incubação das placas a 37°C por 24 horas e foram observados os halos de inibição sobre a cepa bacteriana ensaiada. Os resultados foram expressos em milímetros dos diâmetros dos halos formados ao redor dos discos (Adaptado de OLIVEIRA et. al., 2006).

Pour-plate

O objetivo da técnica de semeadura em profundidade é obter colônias isoladas. Nesta técnica 1,0 mL de suspensão de microrganismo e diferentes concentrações do ativo (25 μ l, 50 μ l e 75 μ l) foram adicionados em placas estéreis e em seguida 15 a 20 mL de ágar TSA fundido foi adicionado por cima. Essa técnica foi feita em triplicata. As placas foram suavemente submetidas a movimentos ro-

tatórios, visando uma perfeita mistura da cultura com o ágar. Nesta técnica tomou-se cuidado para não adicionar o meio em temperatura elevada sobre o inóculo, pois isto poderá matar os microrganismos.

Detalhamento da Técnica

Isolamento de micro-organismos: homogeneização e diluição seriada; junto à chama do bico de Bunsen, transferiu-se 1,0 g da amostra complexa coletada para um frasco contendo 9,0 ml de solução salina esterilizada; agitou-se vigorosamente a suspensão preparada no passo anterior e deixou por 10 minutos sob agitação de 150 rpm, de modo a obter uma suspensão homogênea da amostra, facilitando a suspensão da maior parte das células dos micro-organismos adsorvidas nas partículas da amostra;

junto à chama do bico de Bunsen, transferiu-se 1,0 mL da suspensão original (preparada acima – diluição 10^{-1}) para tubos de ensaio contendo 9,0 ml de solução salina estéril, de modo a obter a diluição 10^{-2} ; foi feita diluições sucessivas até 10^{-4} (1:10000). Foi homogeneizada a amostra em suspensão (utilizando vortex) em cada nova diluição realizada; foram realizadas placas controle em triplicata, contendo 1,0 ml de cada diluição e o meio TSA. Nas placas teste, foram plaqueados 1,0 mL de cada diluição, adicionado às concentrações de ativo em triplicata e adicionou-se o meio TSA; As placas foram incubadas a 35°C de 2 a 3 dias. Foi realizada a contagem.

Análise estatística

Os dados foram analisados através do teste estatístico “Análise de Variância (ANOVA)” e posteriormente o teste de comparação múltipla de Tukey, com significância de $p < 0.05$, para a comparação entre os grupos. Foi utilizado o Software GraphPad-Prism V3.02.

Resultados

Os resultados obtidos nos ensaios realizados

laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células da Escola de Ciências da Saúde da Universidade Anhembi, estão descritos abaixo.

Teste da avaliação de citotoxicidade

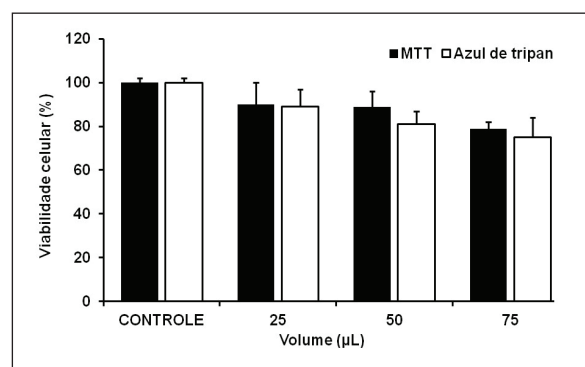


Figura 3: Viabilidade de fibroblastos L-929 obtida após tratamento com óleo essencial de melaleuca depois de 72 h de exposição. Testes realizados: teste de redução do MTT e viabilidade por azul de tripan. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e estão representados pela média e desvio padrão. Os dados foram analisados através do teste estatístico “Análise de Variância (ANOVA)” e posteriormente o teste de comparação múltipla de Tukey.

Teste de determinação de apoptose

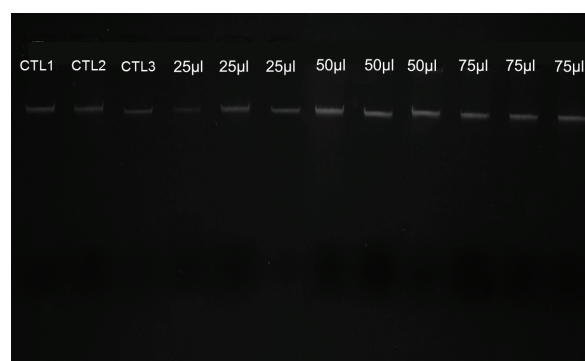


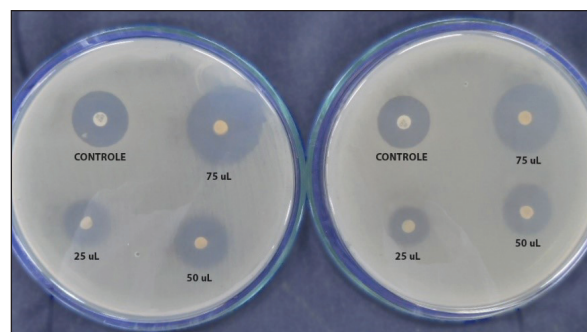
Figura 4: Corrida de eletroforese em gel de agarose para determinação da integridade das moléculas de DNA.

Teste antimicrobiano pela técnica de Mueller-Hinton

<i>P.acnes</i>	Controle	25µL	50µL	75µL
1	15 mm	14mm	17mm	19mm
2	17mm	11mm	15mm	22mm
3	13mm	12mm	11mm	18mm
Média ±	15,0 mm ± 2,0	12,3 mm ± 1,5	14,3 mm ± 3,0	19,6 mm ± 2,1

Tabela 1: Susceptibilidade de cepa de *P. acnes* frente à ação do óleo essencial de melaleuca (resultados expressos em diâmetro dos halos de inibição do crescimento microbiano em mm).

Figura 5: Foto ilustrativa mostrando o resultado do teste de sensibilidade utilizando o meio de cultura Mueller – Hinton.

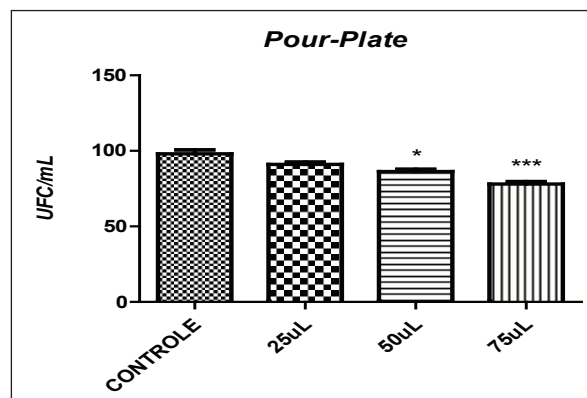


Teste antimicrobiano pela técnica de pour-plate

Cepa	UFC – Controle	25uL	50uL	75uL
<i>Propionibacterium acnes</i>	93	94	86	78
	102	90	89	75
	99	89	84	81
Média e DP (±)	98 ± 4,5	91,0 ± 2,6	*86,3 ± 2,5	***78 ± 3,0

Tabela 2: Susceptibilidade de cepa de *P. acnes* frente à ação do óleo essencial de melaleuca (resultados expressos pela média e desvio padrão de unidades formadoras de colônia - UFC).

Figura 6: Susceptibilidade de cepa de *P. acnes* frente à ação do óleo essencial de melaleuca (resultados expressos pela média e desvio padrão de unidades formadoras de colônia - UFC). Os dados foram analisados através do teste estatístico “Análise de Variância (ANOVA)” e posteriormente o teste de comparação múltipla de Tukey.



Discussão

De acordo com os resultados obtidos podemos sugerir que o óleo essencial de melaleuca apresenta potencial antimicrobiano e praticamente não se mostrou citotóxico. Neste sentido, o teste de sensibilidade ao óleo essencial de melaleuca realizado através do meio Mueller Hinton, mostrou que o óleo essencial de melaleuca foi efetivo contra a cepa *Propionibacterium acnes*, mesmo não apresentando diferenças significativas em relação ao controle (clindamicina), que como dito anteriormente é um potente antibiótico com ação na *Propionibacterium acnes* (Tabela 1). Esses resultados corroboram os estudos realizados por Raman, Weir e Bloomfield em 1995, que mostraram atividade antimicrobiana contra *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*; e Simões et al., em 2002, que mostraram resultados que indicam ampla ação contra uma gama de bactérias Gram positivo/negativas e contra diferentes fungos, entre eles, *C. albicans*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum gypsum*. Por fim, podemos citar o trabalho de Carson et al. em 1995, onde foi testada a atividade *in vitro* do óleo essencial de melaleuca contra 66 cepas de *S. aureus*, sendo 64 delas resistentes a metilicina e observaram que todas as cepas foram sensíveis e apresentaram Concentração Inibitória Mínima de 0,312% e Concentração Bactericida Mínima de 0,625%.

Com o objetivo de verificarmos, através de outra técnica, o potencial antimicrobiano do óleo essencial de melaleuca, também foi realizado a metodologia *Pour-Plate*, e os resultados apresentados, ao contrário do teste de sensibilidade, mostraram redução significativa no número de UFC após realizarmos o tratamento com o óleo essencial de melaleuca. Vale ressaltar que o primordial no óleo essencial de Melaleuca é o teor de 1,8 cineol mais baixo possível e o de terpineol-4 mais alto possível. Pela ISO com 3% de cineol e 36% de terpineol-4 já está ótimo, sendo que o óleo estudado se enquadrado na qualidade KBA que é a máxima qualidade de Tea Tree.

Em relação à citotoxicidade, os testes realizados indicaram que as concentrações do óleo essencial de melaleuca utilizadas no trabalho não foram citotóxicas, uma vez que nem a técnica de azul de tripan e nem o MTT mostraram redução significativa na viabilidade de células L-929 (figura 3). Além disso, podemos observar na figura 4, que a extração de DNA mostrou integridade, indicando que não houve ativação de morte celular pela ausência de fragmentação do material genético. Neste sentido, alguns trabalhos mostram que a melaleuca apresenta toxicidade dose dependente, como demonstrou Söderberg e colaboradores em 1996 e Loughlin *et al*, em 2008. Deste modo, não podemos desconsiderar variáveis que podem justificar nossos resultados de citotoxicidade, como por exemplo, o tempo de exposição, que em alguns autores citados acima foi de 24h, mas com doses bem maiores do que as testadas neste trabalho. Além disso, a própria toxicidade dose-dependente deve ser levada em conta.

Conclusão

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* apresentou uma ação antimicrobiana satisfatória sobre o *Propionibacterium acnes*, ao mesmo tempo em que não se mostrou citotóxico nas células L-929, nas concentrações testadas.

Referências Bibliográficas

- BASSETT, I. B.; PANNOWITZ, D. L.; BARNETSON, R. S. **A Comparative Study Of Tea-Tree Oil Versus Benzoylperoxide In The Treatment Of Acne**. Med. Aust., vol. 153, 1990. Pág 455.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. **Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method**. American Journal of Clinical Pathology, Washington, v. 45, 1966. Pág 493-496.
- BURT, S. **Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods - A Review**. International Journal of Food Microbiology, 2004. Pág. 223, 253.

CARVALHO, J. C. J.; ALMANCA, C. C. J. **Formulário de Prescrição Fitoterápica**. São Paulo: Atheneu, 2003. Pág 115, 117.

CARVALHO, G. H.; LEAL, P. F.; MEIRELES, M. A. A. **Destilação por Arraste a Vapor de Alecrim, Camomila, Erva-Baleeira e Erva Doce: Estudo da Cinética de Extração**. XVI Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, 2008.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. **Melaleuca Alternifolia (Tea Tree) Oil: A Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties**. Clinical Microbiology Reviews, v.19, 2006. Pág 50, 62.

CASTELO, A.V.M.; AFONSO, S.R.; MELO, R.R.; DEL MENEZZI, C.H.S.; CAMILO, J.; VIEIRA, R.F. **Rendimento e Composição Química do Óleo Essencial de Melaleuca alternifolia Cheel, na Região do Distrito Federal**. Revista Brasileira de Ciências Agrárias. 2013.

CORAZZA, S. **Aromacologia – Uma Ciência de Muitos Cheiros**. São Paulo: Editora SENAC, 2002. Pág 243, 412.

COSTA, C. S.; BAGATIN, E. **Evidências sobre o Tratamento da Acne**. Centro Cochrane do Brasil e Departamento de Dermatologia da Escola Paulista de Medicina — Universidade Federal de São Paulo (EPM-Unifesp), 2013. Pág. 10.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. **O Modo de Ação Antimicrobiana do Óleo Essencial de Melaleuca Alternifolia (Tea Tree)**. Journal of Applied Microbiology. 2000. Pág 170, 175.

FINLAY-JONES, J.; HART, P.; RILEY, T. **Anti-inflammatory Activity of Tea Tree Oil**. Netherlands, Australia: Rural Industries Research and Development Corporation, 2001.

HART, P.H.; BRAND, C.; CARSON, C.F. et al. **Terpinen-4-Ol, The Main Component of The Essential Oil of Melaleuca alternifolia (Tea Tree Oil) Suppresses Inflammatory Mediator Production by Activated Human Monocytes**. Inflammation Research, v. 49, 2000. Pág 619.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. **Antifungal Activity of the Components of Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil**. Appl. Microbiology. 2003. Pág 853.

KWIECINSKI, J.; EICK, S.; WÓJCIK, K. Ef-

fects of Tea Tree (Melaleuca alternifolia) Oil on Staphylococcus aureus in Biofilms and Stationary Growth Phase. International Journal of Antimicrobial Agents, vol.33, 2008. Pág. 342 - 347.

KOH, K. J. *et al.* **Tea Tree Oil Reduces Histamine-Induced Skin Inflammation**. British Journal of Dermatology, Austrália, vol. 147, 2002. Pág 121.

LOUGHLIN, R.; GILMORE, B. F.; MCCARRON, P. A.; TUNNEY, M. M. **Comparison of The Cidal Activity of Tea Tree Oil and Terpinen-4-Ol Against Clinical Bacterial Skin Isolates and Human Fibroblast Cells**. Journal compilation - The Society for Applied Microbiology, 2008. Pág 428.

MAIDEN & BETCHE. **Melaleuca alternifolia Cheel**. Plants For a Future, 2013.

MARTINS, A. P.; NOGUEIRA, M. T.; COSTA, M. C.; SALGUEIRO L. **Requisitos de qualidade em óleos essenciais: a importância das monografias da Farmacopeia Europeia e das normas ISSO**. Revista de Fitoterapia, 2011. Pag. 36 e 39.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA-FILHO, R.N. **Estudo da Interferência de Óleos Essenciais Sobre a Atividade de Alguns Antibióticos Usados na Clínica**. Rev. Bras. Farmacogn., João Pessoa, v. 16, 2006. Pág 77, 79.

OLIVEIRA, A.C.M.; FONTANA, A.; NEGRI, T.C.; NOGUEIRA, M.N.M.; BEDRAN, T.B.L.; ANDRADE, C.R.; SPOLIDORIO, L.C.; SPOLIDORIO, D.M.P. **Emprego do Óleo de Melaleuca alternifolia Cheel (Myrtaceae) na Odontologia: Perspectivas Quanto à Utilização como Antimicrobiano Alternativo às Doenças Infeciosas de Origem Bucal**. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.13, 2011. Pág 492, 499.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SANTOS, A.; PADUAN, R. H.; GAZIN, Z. C.; JACOMASSI E.; D' OLIVEIRA, P. S.; CORTEZ, D. A. G.; CORTEZ, L. E. R. **Determinação do Rendimento e Atividade Antimicrobiana do Óleo Essencial de Cymbopogon Citratus (DC.) Stapf em Função de Sazonalidade e Consorciamento**.

SciELO - Revista Brasileira de Farmacognosia, 2009.

SILVA, A.R. **Aromaterapia em Dermatologia Estética**. São Paulo: Roca, 2004. Pág 299, 324-5

SILVA, A. R. **Tudo Sobre Aromaterapia: Como Usa-Lá Para Melhorar sua Saúde Física, Emocional e Financeira**. 2. ed. São Paulo: Ed. Roca, 2001. Pág 302.

SIMÕES, R. P. *et al.* **Efeito do Óleo Essencial de Melaleuca Alternifolia Sobre a Infecção Estafilocócica**. Rev. Lecta, Bragança Paulista. 2002. Pág 143, 152.

SODERBERG, T. A.; JOHANSSON, A.; GREFC, R. **Toxic Effects of Some Conifer Resin Acids and Tea Tree Oil on Human Epithelial and Fibroblast Cells**. Elsevier Science Ireland Ltd., 1996. Pág 99.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Herbário Compêndio de Fitoterapia**. 4. ed. Curitiba: Herbarium Lab. Bot. Ltda., 2001.

VADEMÉCUM.; **Prescripción**. 4. ed. Barcelona: Masson, 2003. Pág 354.

VUUREN, S.F.; SULIMAN, S.; VILJOEN, A.M. **The Antimicrobial Activity of Four Commercial Essential Oils in Combination with Conventional Antimicrobials**. Letters in Applied Microbiology, vol. 48, 2009. Pág. 440 - 446.

WALTERS, C. **Aromaterapia: Para uma Vida Saudável**. São Paulo: Könermann, 2000. Pág 90 e 91.

WILKINSON, J.M.; CAVANAGH, H.M.A. **Antibacterial Activity of Essential Oils from Australian Native Plants**. Phytotherapy Research, v.19, 2005. Pág. 643 - 646.

WHO. **Monographs on selected medicinal plants**. Department of Essential Drugs and Medicines Policy, World Health Organization. 1999.

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA HEMOLINFA DE LARVAS DE ZOPHOBAS MORIO FABRICIUS (COLEOPTERA: TENEOBRIEDAE) EM FIBROBLASTOS HUMANOS.

Larissa Loponte Feijó; Gustavo de Jesus¹; Francieli Marinho Carneiro¹; Daniel Gonsales Spindola¹; Carlos Rocha Oliveira.

¹Escola de Ciências da Saúde, Universidade Anhembi Morumbi, São Paulo/SP, Brasil.

²Professor da Universidade Anhembi Morumbi, São Paulo, Brasil.

Recebido em: nov. 2017; aceito ago. 2018; publicado out. 2018.

Resumo

O aparelho digestivo dos insetos é formado basicamente por um longo tubo que percorre seu corpo no sentido longitudinal, desde a boca até o ânus, denominado canal digestivo ou alimentar. O espaço entre o canal alimentar e a paredes do corpo é chamado hemocele ou cavidade geral, e é grandemente ocupado por sangue (hemolinfa). Neste sentido, estudos apontam que a hemolinfa de alguns insetos, por conta da presença de substâncias com potencial farmacológico, apresenta potencial antibacteriano, antiviral, antifúngico, entre outros. Neste trabalho, avaliamos o efeito citotóxico da hemolinfa obtida, a partir da criação em laboratório, de larvas de *Zophobas morio* Fabricius (Coleoptera:Tenebrionidae), sobre fibroblastos dérmicos humanos (CCD1072Sk – ATCC), através dos ensaios de captação do corante Tetrazolium – MTT, método de exclusão do azul de tripano, quantificação de células nas diferentes fases do ciclo celular, através de citometria de fluxo e do ensaio *wound healing*, onde acompanhamos em tempo real a proliferação de fibroblastos. Os resultados obtidos mostraram que a hemolinfa de *Zophobas morio* Fabricius, não se mostrou citotóxica sobre a linhagem celular testada. Ao invés disso, na concentração de 10%, a hemolinfa se mostrou capaz de induzir proliferação dos fibroblastos ($P < 0,05$).

Palavras-chave: hemolinfa; citotoxicidade, *Zophobas morio* Fabricius.

Introdução

Com a crescente demanda por novos produtos oriundos de fontes naturais para a utilização em tratamentos alternativos a diversas doenças, surge a necessidade de buscar aplicações em outras fontes de origem vegetal ou animal. Dentre as fontes animais, testes recentes realizados no ano de 2013 no Instituto Butantã, São Paulo, utilizando-se do fluido da hemocele encontrada em lagartas da espécie *Lonomia obliqua*, têm demonstrado fortes propriedades antivirais, onde estudos revelam

que algumas proteínas e peptídeos possuem ação antiviral por conta da sua capacidade de ligação à glicoproteínas encontradas na membrana celular, ou seja, quando essas células são expostas ao vírus, podem ocorrer interações de peptídeos e/ou proteínas com a membrana glicoproteica, impedindo assim a adsorção viral¹. A proteína Lactoferrina (proteína ligante ao ferro), encontrada na hemolinfa, por conta de suas propriedades antivirais, antibactericidas, antitumorais, antifungicidas, imunoreguladoras e anti-inflamatórias², fez com que a replicação do vírus da Herpes simples se tor-

nasce 1 milhão de vezes menor^{1,3}. Já em lagartas da família *Megalopygidae*, tornou 2 mil vezes menor a replicação do Picornavírus (parente do vírus da Poliomielite) e 750 vezes menor a replicação do vírus do Sarampo, além de ter neutralizado o H1N1, da Influenza⁴.

Com função semelhante à do sangue, em invertebrados, a hemolinfa efetua a troca de produtos químicos com os órgãos, conduz hormônios, alimento elaborado e produtos de excreção, regula a pressão interna do corpo, ventila o sistema traqueal e reserva água, além de uma composição química é bastante diferente e é basicamente constituída por água, sais e compostos orgânicos⁵.

Ainda em relação à composição da hemolinfa, observa-se grande concentração de proteínas, lipídeos, aminoácidos livres e alta concentração de íons inorgânicos como Cl⁻, Na⁺, K⁺ e Mg⁺⁺, sendo que todos esses componentes aparecem em diferentes insetos e em diferentes quantidades de acordo com as fases do ciclo de vida, contribuindo para a manutenção do pH e da pressão osmótica do plasma⁶.

Estudos sugerem que a hemolinfa de insetos apresenta substâncias farmacologicamente ativas, e a isto, associa-se potencial antibacteriano⁷, antiviral³, imunoregulador⁸, fungicida⁹ e anticongelante¹⁰, tornando-se assim, um potencial para o surgimento de novas ferramenta terapêuticas.

Sendo assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a citotoxicidade da hemolinfa obtida de larvas de *Zophobas morio* Fabricius, através de métodos que envolvem a avaliação da viabilidade celular e de ensaios que possam indicar proliferação celular.

Materiais e Métodos

Cultura celular

As células da linhagem CCD - 1072Sk foram cultivadas em meio ISCOVE'S com 10% de soro fetal bovino, 0,292 g/L de L-glutamina, 1,0 g/L de D-glicose, 2,2 g/l de NaHCO₃, 10.000UI de Penicilina e 0,060 g/l de Estreptomina. As células foram mantidas em frascos de 25 cm² (1 × 10⁵ cells/mL)

em estufa úmida com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Em todos os experimentos as culturas de fibroblastos foram submetidas ao teste de viabilidade com o corante azul de tripano e foi realizada a leitura em câmara hemocitométrica por microscopia óptica. Todos os experimentos descritos foram realizados quando a viabilidade celular foi igual ou superior a 95%.

Extração da hemolinfa

Para a extração da hemolinfa realizou-se uma pequena incisão na região dorsal anterior do primeiro segmento torácico, próximo à cabeça da larva, utilizando um bisturi descartável nº 12, com o intuito de atingir o vaso dorsal que passa pela região. A hemolinfa que extravasa pela incisão foi coletada em pequenas porções de 5 mm³ com o auxílio de micropipeta, sendo diluída imediatamente em meio de cultura Iscove's, até atingir a concentração desejada para o teste.

Ensaio de viabilidade celular pelo método de exclusão do Azul de Tripano

A avaliação da viabilidade das células na presença das diferentes concentrações de hemolinfa foi realizada através do método de exclusão de azul de tripano em fibroblastos. Assim, após incubação das células (1 × 10⁵ células/mL) com diferentes diluições a hemolinfa (1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10%) por 24 horas, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em meio ISCOVE'S, suplementado em 20% com

Soro Fetal Bovino (SFB). Após isso, as células foram diluídas (1:10) em corante de azul de tripano e a contagem das células inviáveis foi realizada em Câmara Hemocitométrica (Câmara de Neubauer) utilizando microscópio óptico 400x.

Ensaio da viabilidade celular pelo método de redução do MTT

Para avaliar a viabilidade celular após tratamento com diferentes diluições da hemolinfa, foi utilizado o método colorimétrico do MTT. Para

o teste do MTT, 1×10^5 de células foram semeadas em microplacas de 96 poços na ausência ou presença da hemolinfa (1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10%), por 24 horas e incubadas em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO₂. Ao final do período de incubação, foi adicionado aos poços da microplaca 10 µL de MTT na concentração de 5 mg.mL⁻¹, e após 4 h de incubação com o MTT, foram acrescentados 50 µL SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) a 10% diluído em HCl/0,01N. A quantificação da densidade óptica (DO) será medida em espectrofotômetro. O valor de IC₅₀ (concentração em µM.L⁻¹ que inibe 50 % da viabilidade celular) foi determinada por meio da curva dose resposta utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 4.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Ensaio de incorporação do iodeto de propídeo (PI)

Foram realizados ensaios de incorporação do iodeto de propídeo (PI) para avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo. Resumidamente, as células foram plaqueadas em placas de vinte e quatro poços (densidade inicial em células/poço, de 2×10^5) e a elas foi adicionada a solução fluorocrômica hipotônica (HFS – 0,1% p/v de citrato de sódio trissódico, 0,5% p/v de Triton-X 100 e 50 µg/ml de iodeto de propídeo). Após período de incubação de quatro horas, a 4°C e ao abrigo da luz, as células e o sobrenadante foram recolhidos e analisados. Foi utilizado o citômetro de fluxo FACScan, o programa CELLQuest e os dados obtidos, considerando-se 20.000 eventos por análise em cada ensaio, serão analisados no programa WinMDI 2.8.

Wound healing

Para a realização do ensaio *wound healing*, os fibroblastos foram semeados em microplacas de 6 poços e cultivadas conforme item 2.1 até o surgimento da monocamada confluenta.

As monocamadas de células foram cuidadosamente “riscadas” com a ponta de uma pipeta estéril, lavadas com solução salina e tampão fosfato.

Em seguida, as células foram incubadas a 37 °C com meio de cultura, sem soro fetal bovino (carenciamento) e com 10,0 % de hemolinfa. Os pontos de referência perto da fenda foram marcados para garantir a mesma área de aquisição de imagem. Estas foram obtidas em diferentes períodos por uma câmera digital acoplada ao microscópio e a porcentagem de fechamento foi calculada com o software IMAGEJ (NIH, EUA).

Análise estatística

Para a análise dos dados foram utilizados a Análise de Variância (ANOVA) e posterior o teste de comparação múltipla de Tukey, com significância de $p < 0.05$, para a comparação entre os grupos¹¹. Foi utilizado o Software GraphPad-Prism V3.02. Para todos os grupos consideraram-se estatisticamente significativos valores de p menores que 0.05 ($p < 0.05$).

Resultados e Discussão

O teste de incorporação do azul de tripan permite detectar células inviáveis, que incorporam o corante por apresentarem danos na membrana corando-se em azul; enquanto que as células viáveis, por apresentarem membrana íntegra, bloqueiam a passagem do corante. Assim, após o tratamento com a hemolinfa, observamos uma tendência linear de proliferação dos fibroblastos testados. A figura 1 mostra a representação gráfica desse resultado e ainda indica que a maior concentração estudada (10%) apresentou aumento estatisticamente significativo em comparação ao controle (células sem tratamento).

Já em relação ao teste de proliferação MTT, método descrito por Mosmann (1983)¹² que consiste em medir a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas, a tendência de proliferação da hemolinfa sobre os fibroblastos testados, também foi observada. Contudo, ao contrário do teste de incorporação do azul de tripan, o qual indicou apenas uma concentração com sendo capaz de aumentar a proliferação de modo significativo, a figura 2 indica que não ape-

nas a concentração de 10% conseguiu aumentar significativamente o percentual de fibroblastos em comparação ao controle (células sem tratamento), mas também as concentrações de 5,0 e 7,5%.

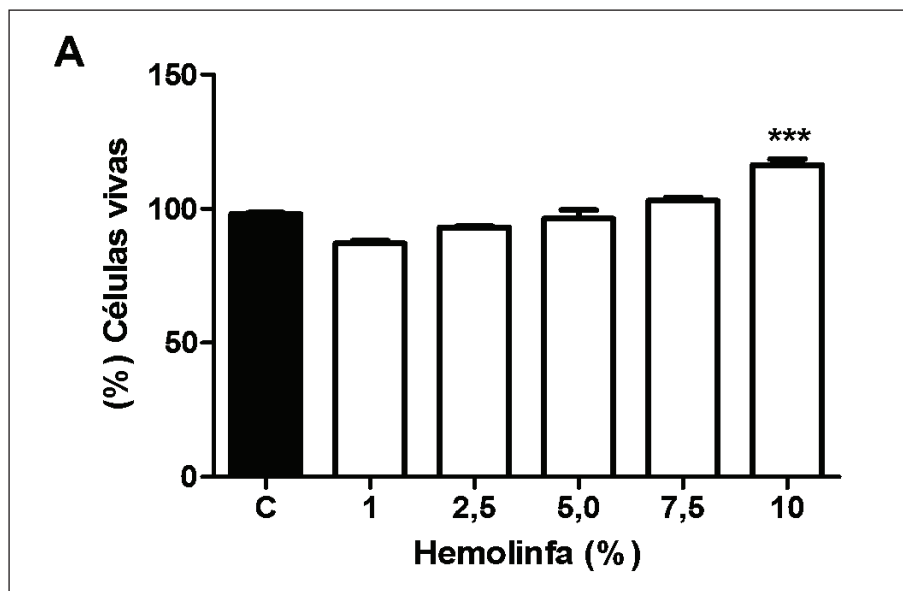


Figura 1. Resultados da viabilidade celular através da técnica azul de trypan após 24 horas de exposição com diferentes concentrações de hemolinfa. Antes do início dos testes, as células foram carenciadas de soro fetal bovino. (***) $P < 0,001$ - significativo em relação ao controle, ANOVA, Tukey, GraphPad PRISM v5.0.

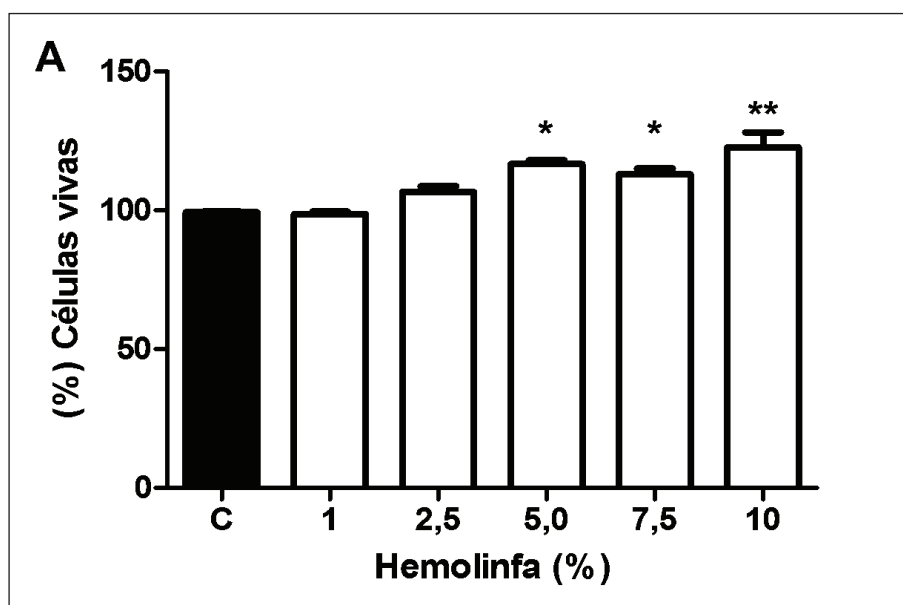


Figura 2. Resultados da viabilidade celular através da técnica de MTT após 24 horas de exposição com diferentes concentrações de hemolinfa. Antes do início dos testes, as células foram carenciadas de soro fetal bovino. (*) $P > 0,05$ - significativo em relação ao controle. (**) $P > 0,01$ - significativo em relação ao controle, ANOVA, Tukey, GraphPad PRISM v5.0.

A diferença dos resultados obtidos nos testes de MTT e azul de tripano podem ser explicadas ao menos em parte, pela diferença entre os princípios dos métodos, pois no caso do MTT, algumas células poderiam estar inviáveis quando observadas ao microscópio óptico (azul de trypan), mas ainda poderiam ter mitocôndrias capazes de reduzir o sal de MTT à formazan (princípio do método de MTT).

Como a atividade citotóxica foi praticamente descartada a partir dos resultados observados acima, onde observamos uma clara relação dose-dependente de proliferação dos fibroblastos, partimos para a verificação da atividade proliferativa da hemolinfa através da quantificação das fases do ciclo celular de fibroblastos tratados como a concentração de 10% de hemolinfa, cuja resposta proliferativa foi estatisticamente significativa em relação ao controle (células não tratadas) nos dois testes realizados anteriormente. Deste modo, a figura 3A, mostra a representação gráfica do percentual de células tratadas com diferentes concentrações de hemolinfa e que estão nas fases S-G2-M do ciclo celular quando comparadas ao controle não tratado.

Por fim, após verificarmos que a concentração de 10% da hemolinfa foi capaz de induzir a proliferação dos fibroblastos, realizamos o ensaio *wound*

healing, com o objetivo de monitorar em tempo real, a proliferação dos fibroblastos mediante ao tratamento com 10% de hemolinfa (Figura 4).

Considerações finais

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a hemolinfa possui característica proliferativa, capacitando assim o crescimento e a viabilidade celular. Nenhum dos testes realizados foi capaz de observar citotoxicidade às células, inclusive em concentrações elevadas como a de 10%. Além disso, os métodos de redução do MTT e de exclusão pelo corante azul de trypan mostraram relação dose-dependente na proliferação dos fibroblastos. Também, verificamos que as células tratadas com 10% de hemolinfa, apresentaram percentual de células em fases S-G2-M, maior do que as células não tratadas (controle) e que no monitoramento em tempo real (*wound healing*) os fibroblastos tratados também conseguiram ocupar a área livre de modo significativamente maior do que células não tratadas.

Por fim, novos testes devem ser realizados para esclarecer os mecanismos proliferativos da hemolinfa a fim de que possam auxiliar na busca por novas formas de auxílio terapêutico.

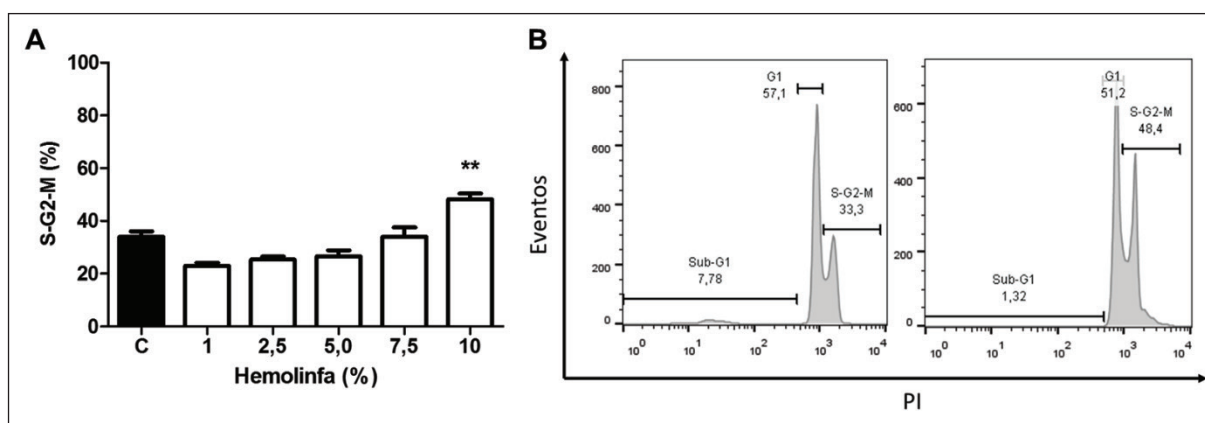


Figura 3. (A) Percentual de células em fase S-G2-M obtidos após exposição por 24 horas de diferentes concentrações de hemolinfa sobre linhagem de fibroblastos humanos. Antes do início dos testes, as células foram carentes de soro fetal bovino. (***) $P > 0,05$ - significativo em relação ao controle, ANOVA, Tukey. GraphPad PRISM v5.0. (B) Histograma representativo da concentração com significância estatística (10%), Flow Jov 10.0.

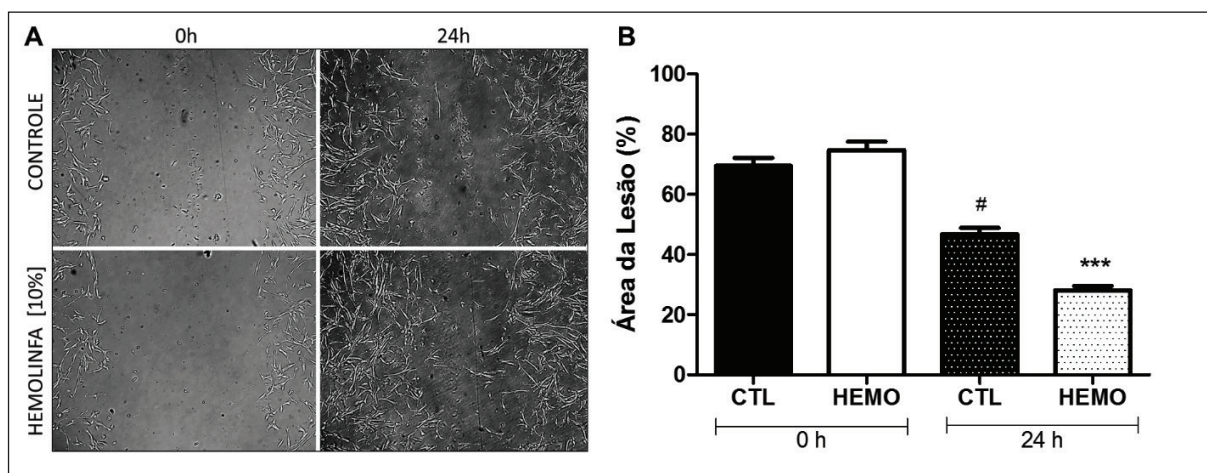


Figura 4. (A) Representação fotográfica das amostras *in vitro* submetidas à simulação de lesão e expostas por 24 horas a hemolinfa na concentração de 10%. (B) Gráfico representativo do percentual da área da lesão nos tempos de 0h e 24h após mesmo tratamento. Antes do início dos testes, as células foram carentes de soro fetal bovino. (#) $P > 0,05$ - significativo em relação ao grupo controle 0h. (***) $P > 0,05$ - significativo em relação ao grupo 0h tratado com hemolinfa, Teste t de Student, GraphPad PRISM v5.0.

Referências bibliográficas

1. Andersen, JH; Jenssen, H; Sandivik, K; Gutteberg, TJ.; **Anti-HSV activity of lactoferrin and lactoferricin is dependent on the presence of heparan sulphate at the cell surface**; Journal of Medical Virology, Vol. 74, 2004.
2. Vogel, HJ; Schibli, DJ; Jing, W; Lohmeier-Vogel, EM; Epanand, RF; Epanand, RM.; **Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides**; Biochem Cell Biol. 2002.
3. Greco, KN.; **Estudo de Proteínas obtidas da Hemolinfa de *Lonomia obliqua* com ação antiviral**; Universidade de São Paulo, 2009, pag 23.
4. IPDFarma ; **Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Produtos Farmacêuticos, Vacina de Lagarta, 2013**; Disponível em: <http://www.ipd-farma.org.br/noticias/pagina/568/Vacina-de-lagarta>
5. Lara, FM.; **Princípios de Entomologia**; 3ªEd., São Paulo, Ícone, 1992. Pags83,84.
6. Rafael, JA; Melo GAR; Carvalho, CJB; Casari, AS; Constantino, R.; **Insetos do Brasil- Diversidade e Taxonomia**; 2012, pags 65.
7. Zhu S; Li W; Jiang D; Zeng X.; **Evidence for the existence of insect defensin-like peptide in scorpion venom**; IUBMB Life, 2000.
8. Jones, G; Manczak, M; Horn, M.; **Hormonal regulation and properties of a new group of basic hemolymph proteins expressed during insect metamorphosis**; The Journal of Biological Chemistry, 1993.
9. Martins, LM.; **Efeito de uma proteína antiapoptica obtida da hemolinfa da *Lonomia obliqua* sobre as mitocôndrias de células Sf-9**; Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, 2011, pags 16,17, 25.
10. Peters, ID; Rancourt, DE; Davies, PL; Walker, VK.; **Isolation and characterization of an antifreeze protein precursor from transgenic *Drosophila*: evidence for partial processing**; Department of Biochemistry, Queen's University, Kingston, Canadá, 1993.
11. Callegari-Jacques, SM.; **Bioestatística: Princípios e Aplicações**; Porto Alegre, Artmed, 2003, pags 157, 158 e 159.
12. Mosmann, T.; **Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays**; Journal of Immunological Methods, 1983.