

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

SCREENING FARMACOLÓGICO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES ISOLADAS
DE *ENDLICHERIA SP.*

MARCELA REBOUÇAS GOUVEIA, CNPq

MANAUS
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-S/0031/2012

SCREENING FARMACOLÓGICO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES ISOLADAS
DE *ENDLICHERIA SP.*

Bolsista: Marcela Rebouças Gouveia, CNPq
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cinthya Iamille Frithz Brandão de Oliveira

MANAUS
2013

SUMÁRIO

1	RESUMO	4
2	INTRODUÇÃO.....	6
3	JUSTIFICATIVA.....	7
4	OBJETIVOS.....	9
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
6	RESULTADOS.....	13
7	CONCLUSÃO.....	17
8	CRONOGRAMA.....	18
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	19

1. RESUMO

Endlicheria sp. Pertence à família Lauraceae, espécie amazônica muito utilizada na medicina popular. Aos óleos voláteis extraídos desta espécie são relacionadas atividades antifúngica, repelente, antiinflamatória, anticolinesterásica e analgésica. Vários estudos com a família Lauraceae têm sido realizados ao longo dos anos, especialmente do ponto de vista botânico, da agricultura e uso comercial bem como a pesquisa fitoquímica, no entanto pouco se conhece quanto à atividade farmacológica da *Endlicheria* sp, que se adaptou bem ao clima tropical de nossa região amazônica. Este trabalho centra-se na pesquisa dos efeitos farmacológicos gerais de outras frações pouco valorizadas desta espécie, já que estudos de comprovação de atividades farmacológicas ainda são escassos para as mesmas. Com o objetivo de identificar efeitos centrais e/ou periféricos, a triagem farmacológica inicial é um recurso básico para a continuidade desta pesquisa. Nos modelos testados o extrato e a fração todos os animais apresentaram redução da micção e da defecação e apresentaram características de diminuição do estado de vigília e atenção em relação à ação depressiva, observados no campo aberto, no entanto este efeito parece não estar sendo regulado por mecanismo de integração central, já que no modelo da placa quente o extrato e a fração usados não apresentou resposta. Já na atividade exploratória o extrato de *Endlicheria* sp., foi capaz de reduzir os movimentos locomotores e exploratórios dos animais, e ainda, na resposta hipno-sedativa foi capaz de reduzir o tempo de latência na indução o sono porém não foi capaz de manter o tempo total do sono nos animais, diminuindo esta resposta. Estes dados nos levam a crer que *Endlicheria* sp pode reduzir a ansiedade sem alterar o estado de vigília.

Palavras-chave: *Endlicheria*, screening, vigília

2. INTRODUÇÃO

A riqueza da biodiversidade brasileira, na qual se estima existir cerca de 55 mil espécies, está entre os elementos favoráveis ao desenvolvimento de medicamentos a partir de produtos naturais. “Somente a região amazônica cobre 5 milhões de km², com 33 mil espécies de plantas superiores, sendo pelo menos 10 mil destas medicinais, aromáticas e úteis.” (FERREIRA, 1988 *apud* OMENA, 2007).

Há milhares de décadas que o homem vem buscando nas plantas a cura para as mais variadas enfermidades. A busca da cura de doenças pelo uso de ervas, folhas e raízes, provavelmente foi uma das primeiras formas de utilização de produtos naturais. Os efeitos das plantas em determinadas enfermidades foi observado várias vezes, levando à aquisição de conhecimentos empíricos, os quais foram passados de geração em geração (BERTINI et al, 2005). Portanto, as plantas medicinais, como ficaram conhecidas, foram ganhando espaço e tornaram-se uma das fontes mais importantes de medicamentos, comprovando as suas enormes qualidades medicinais para a preservação da saúde humana, e apresentando propriedades inexploradas (HEINRICH, 2003).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as plantas medicinais deveriam ser as melhores fontes de fármacos, devido aos estudos intensivos, realizados nas últimas décadas, voltados para a terapia natural (BERTINI et al., 2005).

A distribuição da família Lauraceae, na qual faz parte a *Endlicheria* sp. que é o nosso foco de estudo, ocorre nas regiões tropicais e subtropicais do planeta sendo representada por 50 gêneros e cerca de 2500 espécies (JUDD *et al.* 1999 *apud* RAGGI, 2008). Após séculos de exploração desordenada na Região Amazônica, as espécies da família Lauraceae produtoras de óleos essenciais continuam tendo interesse comercial, mas com poucos estudos químicos e farmacológicos.

Diversas espécies da família Lauraceae são empregadas atualmente na medicina popular. Entre as propriedades farmacológicas encontradas em óleos voláteis estão a atividade antifúngica, repelente, antiinflamatória, anticolinesterásica e analgésica. Há relatos do uso de chás de plantas ricas em óleo volátil de espécies desta família para o tratamento de diversas enfermidades. (RAGGI, 2008).

3. JUSTIFICATIVA

Vários estudos com a família Lauraceae têm sido realizados ao longo dos anos, especialmente do ponto de vista botânico, da agricultura e uso comercial bem como a pesquisa fitoquímica, no entanto pouco se conhece quanto à atividade farmacológica da *Endlicheria* sp, que se adaptou bem ao clima tropical de nossa região amazônica.

Esta família apresenta plantas tipicamente lenhosas, de arbustos a árvores de dossel, ou trepadeiras parasitas, praticamente sem folhas e com pouca clorofila (*Cassytha*). Árvores dióicas, maioria menor que 25 m, podendo alcançar até 40 m. Gênero neotropical com centro de diversidade na América do Sul, ocorrendo também na Costa Rica, Guadalupe e Ilhas do Caribe. Possui cerca de 60 espécies, 40 das quais ocorrem no Brasil (Chanderbali 2004) e quatro nos estados de Goiás e Tocantins, *Endlicheria glomerata* Mez, *E. levelii* C.K. Allen, *E. lhotzkyi* (Nees) Mez e *E. paniculata* (Spreng.) J.F. Macbr (MORAES, 2005).

Foram isolados a partir do extrato benzênico de *Endlicheria sericeae* três substâncias: sitosterol, sitostenona, que são fitoesteróis, com a função de diminuir o colesterol total e o LDL-C (LOTTENBER et al., 2002). O sitosterol ainda tem atividade anti-inflamatória e antipirética (GUPTA et al., 1980), tem potencial quimopreventivo contra o câncer de colo (BASKAR, 2010). A última substância isolada foi o manitol, que tem ação osmótica, diurética e também pode levar a redução da pressão intracraniana, por reabsorção do líquido céfalo-raquidiano e hemodiluição. (LIMA, 2012).

A espécie deste estudo, *Endlicheria* sp., tem sido alvo de pesquisa de mestrado e doutorado no curso do PPG em Química e, a equipe do Prof. Jefferson Rocha de Andrade e Silva, têm conseguido isolar várias substâncias ainda não estudadas farmacologicamente e por se tratar de uma espécie que se adapta facilmente ao ambiente amazônico, este estudo pode vir a contribuir com a bioprospecção de fitoterápicos da região norte do país.

Neste estudo analisamos os efeitos farmacológicos nos principais sistemas, como screening farmacológico, do extrato e frações isoladas de *Endlicheria* sp. em modelos experimentais comprovados, utilizando camundongos. Como nenhum estudo farmacológico foi feito anteriormente nessa espécie, começamos primeiramente com um screening inicial para

fornecer um direcionamento para futuras análises mais complexas. Os modelos feitos foram: modelo da placa quente, para avaliar a ação analgésica tanto pelo via central quanto periférica do extrato; campo aberto, utilizado para quantificar movimentos locomotores e exploratórios dos animais; nado forçado, feito para a avaliar o efeito antidepressivo do extrato; e por último o tempo de sono induzido por barbitúrio, realizado para a avaliação de atividades hipnóticas e sedativas do extrato.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos Gerais

- Avaliar os efeitos farmacológicos de frações isoladas de *Endlicheria* sp., em modelos experimentais pré-clínicos.

4.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito farmacológico do extrato da *Endlicheria* sp., nas atividades antinociceptivas, nos modelos da placa quente;

- Avaliar o efeito farmacológico do extrato da *Endlicheria* sp., na atividade motora, no modelo de campo aberto;

- Avaliar o efeito farmacológico do extrato do extrato da *Endlicheria* sp., na atividade antidepressiva, em teste de nado forçado;

- Avaliar o efeito farmacológico do extrato da *Endlicheria* sp., nas atividades hipnóticas e sedativas, em modelo de sono induzido por pentobarbital.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Amostra

O extrato e frações de *Endlicheria* sp foram fornecidos pela equipe do Prof. Dr. Jefferson Silva do Departamento de Química/UFAM.

5.2 Animais e considerações de ética:

Foram utilizados camundongos Swiss, machos e fêmeas, pesando entre 20-30g, oriundos do biotério da Universidade Federal do Amazonas. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polietileno e mantidos sob temperatura média de 22°C, em ciclos claro/escuro de 12/12 horas, recebendo ração padrão e água à vontade. Todos os protocolos seguiram estritamente as normas internacionais de cuidados com animais de laboratório. O projeto seguiu as normas e orientações de cuidados de acordo com o COBEA e foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em animais/UFAM sob o número 0051/2011.

5.3 Modelos experimentais:

Os seguintes grupos foram utilizados, sendo o número total de animais para cada grupo igual à 6, exceto para o teste da placa quente onde o n=10:

1. Grupo Controle: recebeu tratamento pela via intraperitoneal, i.p., de solução salina (NaCl 0,9% + 3 gotas Twenn 80; 10mL/Kg);
 2. Grupo fração bruta de *Endlicheria* sp.
 3. Grupo fração hexânica MCC
- } receberam tratamento, i. p., das respectivas frações, na concentração de 100 mg/kg.

Todos os animais foram, antes de qualquer teste, marcados e pesados, recebendo via intraperitoneal, a quantidade da fração de acordo com o peso de cada um. Os grupos controles

receberam somente solução salina com 10 gotas de Tween e os grupos testes receberam a fração MCC e *Endlicheria* bruta, todos numa dose de 300mg/ml.

5.3.1. Triagem farmacológica inicial

Foram divididos em três grupos de 3 cada (1 grupo controle e 2 grupos teste). Após tratamento dos grupos como descrito anteriormente, foram observados nos tempos 0, 5, 10, 15, 30, 60 e 90min. As respostas exibidas pelos animais, como: catatonía, analgesia, resposta ao toque, perda de reflexo corneal, tônus muscular, permitiram uma avaliação preliminar dos efeitos farmacológicos da espécie em teste.

5.3.2. Placa quente

Camundongos foram divididos em três grupos de 10 cada (1 grupo controle e 2 grupos teste). Realizado para avaliar a ação analgésica, tanto pela via central quanto periférica do extrato. Os camundongos após tratados como descrito foram colocados em placa aquecida (55 ± 2 °C) e observado o tempo de resposta ao calor pelos animais (lamber as patas e/ou saltar), nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 min, não deixando ficarem mais de 25 segundos. (RODRIGUES et al. 2010).

5.3.3 Campo Aberto

Nesse modelo os animais foram divididos em 3 grupos de 6 (1 grupo controle e 2 grupos teste). Ele foi utilizado para quantificar movimentos locomotores e exploratórios dos animais (MACHADO, B.B et al., 2006). Em uma caixa de acrílico, de 30X30X15 cm, com fundo dividido em 9 quadrantes iguais, os camundongos, após tratados, foram observados por 6 minutos quanto à sua movimentação espontânea (número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões do campo), o número de comportamentos de autolimpeza (“grooming”) e de levantar (“rearing”). O primeiro minuto na caixa foi para ambientação ao local.

5.3.4 Nado forçado

Nesse teste os animais foram divididos em 3 grupos de 6 (1 grupo controle e 2 grupos teste). Esse modelo foi feito para a avaliação do efeito antidepressivo do extrato. Camundongos, tratados conforme descrito, foram colocados, individualmente, num cilindro de plástico (40X25 cm), com 15 cm de água em temperatura ambiente, por um período de 6 minutos, no qual foi registrado o tempo total de imobilidade para cada animal. A imobilidade do animal é considerada quando este faz apenas os movimentos necessários para manter sua cabeça acima do nível da água. Primeiro minuto no cilindro foi para ambientação. (BORSINI, F.; 1988).

5.3.5 Tempo de sono induzido por barbitúrio

Nesse teste os animais foram divididos em 3 grupos de 6 (1 grupo controle e 2 grupos teste). Realizado para a avaliação de atividades hipnóticas e sedativas do extrato. Camundongos, tratados conforme descrito, receberam, após 30 minutos, pentobarbital (60mg/kg, i.p.). Observou-se o tempo de latência e tempo total de sono nestes animais (BATISTA, 1993 *apud* OMENA, 2007). O tempo de indução do sono (latência) é o período decorrido da administração do barbitúrio até a perda do reflexo de endireitamento postural. O tempo de duração do sono foi considerado como sendo o intervalo de tempo entre a perda e a recuperação desse reflexo.

5.4 Análise Estatística

Os níveis de significância entre os grupos experimentais e o controle serão feitos utilizando-se o ANOVA. Os valores serão considerados significativos quando $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, e expressos como média \pm erro padrão da média. O programa estatístico utilizado para estas análises foi o Graphpad Prism, versão 4.0.

6. RESULTADOS

No teste do campo aberto os resultados mostram que as amostras testadas diferem estatisticamente, em relação ao controle salina. Esses resultados demonstram que as substâncias testadas reduzem os movimentos locomotores e exploratórios nos animais em testes. Em comparação aos animais do grupo controle que apresentam motilidade preservada, podemos pensar que a planta testada pode reduzir a ansiedade no animal.

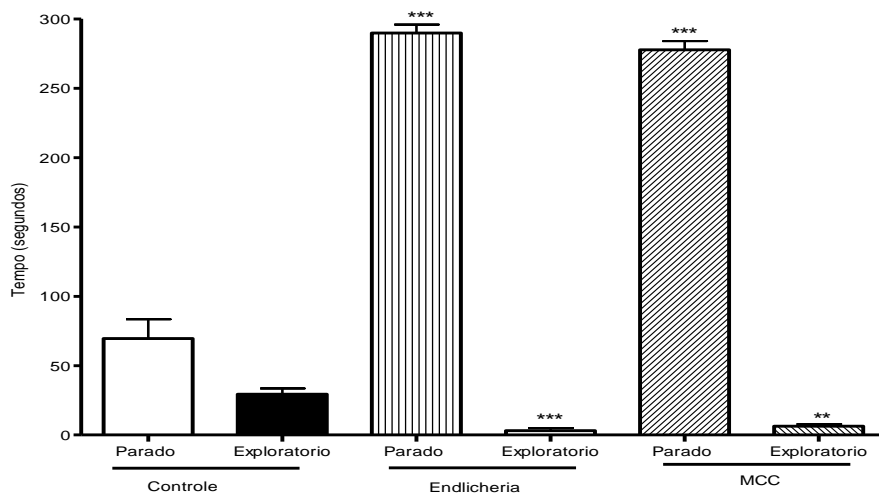


Fig. 1. Atividade das frações de *Endlicheria* no modelo do campo aberto, em relação à atividade exploratória. ** $p < 0,01$ vs Controle; *** $p < 0,001$ vs Controle (ANOVA seguida por Teste de Newman-Keuls).

Tabela 1. Atividade das frações de *Endlicheria* no modelo do campo aberto, em relação às ações exploratórias e de conforto.

Grupo / Atividade	Número de vezes				
	Movimentação na periferia do campo	Movimentação no centro o campo	Auto-limpeza	Levantar-se	Excreção
Controle	26,67±3,84	2,67±0,88	5,2±0,58	12,83±3,98	0,67±0,49
Endlicheria (bruta)	3,17±1,78***	0,0±0,0	5,33±0,71	0,5±0,22***	0,0±0,0
MCC	6,00±1,46	0,33±0,21	3,17±0,91	0,83±0,48***	0,33±0,21

*** $p < 0,001$ vs Controle (ANOVA seguida por Teste de Newman-Keuls).

No teste da placa quente não houve diferença estatística entre os grupos testados, portanto não há participação de resposta de integração central envolvida nas ações desta espécie vegetal.

Tabela 2. Avaliação da atividade antiinflamatória das frações de *Endlicheria* via resposta de integração central pelo modelo da Placa Quente.

Grupo	Tempo de observação de resposta após administração (em minutos)				
	0	15	30	60	90
Controle	15,78±0,93	12,71±0,89	14,00±1,11	14,00±0,96	14,86±1,20
Endlicheria (bruta)	17,60±0,94	11,70±0,67	14,44±0,84	15,70±0,88	14,78±0,62
MCC	11,78±1,35	13,29±1,04	13,13±0,88	14,80±0,92	13,10±0,94

(ANOVA seguida por Teste de Newman-Keuls).

No teste do nado forçado os grupos testes diferiram do controle, elevando o tempo de permanência parado nos animais testados, sugerindo uma possível ação depressora, no entanto, o desvio padrão deste teste foi muito elevado, necessitando aumentar o *n* da amostra a fim de se obter um resultado mais fiel.

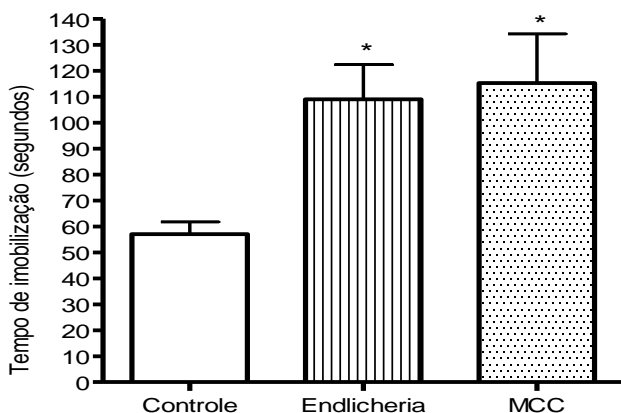


Fig. 2. Avaliação da atividade antidepressiva das frações de *Endlicheria* no modelo do nado forçado. * $p < 0,05$ vs Controle (ANOVA seguida por Teste de Newman-Keuls).

Tabela 3. Avaliação da atividade antidepressiva das frações de *Endicheria* no modelo do nado forçado.

Grupo	Tempo de imobilidade (em segundos)
Controle	57,00±4,76
Endicheria (bruta)	109,5±13,31*
MCC	115,2±18,99*

* p<0,05 vs Controle (ANOVA seguida por Teste de Newman-Keuls).

No teste de tempo de sono induzido por barbitúrio os resultados mostram que as amostras testadas diferem estatisticamente, tanto na latência quanto no tempo total de sono neste modelo em relação ao controle salina. Estes resultados demonstram que as substâncias testadas reduzem a latência na indução o sono e o tempo total do sono nos animais do teste. Em comparação ao modelo do nado forçado, em que os animais apresentaram um tempo de mobilização maior, podemos pensar que a planta testada tende a reduzir a ansiedade sem alterar o sistema de vigília.

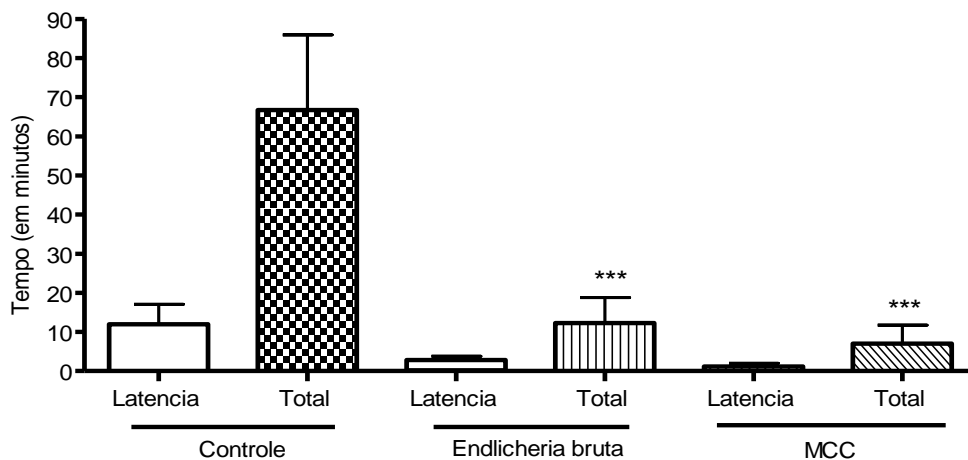


Fig. 3. Avaliação da atividade hipno-sedativa das frações de *Endicheria* pelo modelo do tempo de sono induzido por pentobarbital. ***p<0,001 vs Controle (ANOVA seguida por Teste de Newman-Keuls).

Tabela 4. Avaliação da atividade hipno-sedativa das frações de *Endicheria* pelo modelo do tempo de sono induzido por pentobarbital.

Grupo	Tempo de latência (minutos)	Tempo total de sono (minutos)
Controle	11,97±5,11	66,73±19,18
Endicheria (bruta)	2,81±0,97	12,24±6,53 ***
MCC	1,19±0,79	7,34±4,72 ***

***p<0,001 vs Controle (ANOVA seguida por Teste de Newman-Keuls).

7. CONCLUSÃO

Com os testes aplicados podemos observar que o extrato da planta *Endlicheria* sp. reduz os movimentos locomotores e exploratórios dos animais, e ainda demonstra reduzir a latência na indução o sono e o tempo total do sono nos animais, nos levando a acreditar que ele pode reduzir a ansiedade sem alterar na vigília.

Por ser uma planta pouco estudada, mas que pode ser de grande benefício, a *Endlicheria* sp. é merecedora de ser estudada mais profundamente com testes mais específicos na área de ansiedade.

8. CRONOGRAMA

Nº	Descrição	2012					2013						
		Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Ma r	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Pesquisa bibliográfica	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
2.	Treinamento e testes Piloto dos modelos			R	R	R	R						
3	Obtenção de drogas e animais					R	R	R	R	R	R		
4	Modelos de experimentação in vivo									R	R	R	R
5	Análise de resultados									R	R	R	
6	Elaboração do Resumo e Relatórios Parcial e Final					R	R					R	R
7	Preparação da Apresentação Final para o Congresso											R	R

Índice:

R: Realizado P: Previsto

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASKAR, A. A.; IGNACIMUTHU, S.; PAULRAJ, G. M.; NUMAIR, K. S. A. Chemopreventive potential of β -Sitosterol in experimental colon cancer model - an In vitro and In vivo study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10:24. 2010.
- BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, E. A.; et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do Nordeste do Brasil. *Infarma*; 17: 314, 80p. 2005.
- CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 238 – 245, 2002.
- GUPTA, M. B.; NATH, R.; SRIVASTAVA, N.; SHANKER, K.; KISHOR, K.; BHARGAVA, K. P. Anti-Inflammatory and Antipyretic Activities of β -Sitosterol Planta ; 39: 157-163. 1980.
- HEINRICH, M. Ethnobotany and natural products: the search for new molecules new treatments of old diseases or a better understanding of the indigenous cultures? *Current topics in Medicinal Chemistry*; 3: 29-42. 2003.
- LADEIRA, A. M. Plantas medicinais com oleos essenciais. Governo do Estado de Sao Paulo. Secretaria de Estado do Meio Ambiente. Instituto de Botanica. 2002.
- LIMA, M. A. Manitol e o controle da pressão intracraniana. Medscape. 2012. Disponível em: <<http://www.medcenter.com/medscape/content.aspx?id=3515&langtype=1046>>. Acesso em: 10 abr 2012.
- LOTTENBERG, A. M. P.; NUNES, V. S.; NAKANDAKARE, E. R.; NEVES, M.; BERNIK, M.; SANTOS, J. E.; QUINTÃO, E. C. R. Eficiência dos Ésteres de Fitoesteróis Alimentares na Redução dos Lípides Plasmáticos em Hipercolesterolêmicos Moderados. *Arq Bras Cardiol*, volume 79 (nº 2), 139-42. São Paulo. 2002.
- MACHADO, B. B.; SILVA, J. A.; GONÇALVES, W. N.; PISTORI, H.; SOUZA, A. S. Topolino: Software Livre para Automatização do Experimento do Campo Aberto. XV Seminário de Computação - SEMINCO, Blumenau, Novembro 20-22, 2006.
- MORAES, P. L. R. SINOPSE DAS LAURÁCEAS NOS ESTADOS DE GOIÁS E TOCANTINS, BRASIL. *Biota Neotropica*, v5 (n2). 2005.
- OMENA, M. L. R. A. Ensaio etnofarmacológico de espécies vegetais com ação no sistema nervoso central, originários do bioma caatinga. *Saúde & ambiente em revista*, Duque de Caxias, v.2, n.2, p.92-107, jul-dez 2007.
- RAGGI, L. Estudo da composição química e das atividades biológicas de óleos voláteis de espécies de Lauraceae, em diferentes épocas do ano. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. São Paulo. 2008.

RODRIGUES, E.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PIRES, J. M. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicas. Parte I. Revista Brasileira de Farmacognosia. 20(6): 981-991, Dez. 2010.