

Avaliação da Atividade Antiinflamatória Crônica do Extrato Etanólico de *Bouchea fluminensis* (Verbenaceae)

Simone C. PUPO ¹; Gema PÉREZ DAVISON ²; Gregorio MARTINEZ-SÁNCHEZ ²,
Orlando S. TAKEMURA ³; Aristeu V. SILVA ¹;
Gentil F. GONÇALVES ¹ & Rosemeres H. DELAPORTE ^{3*}.

¹ Departamento de Veterinária, Universidade Paranaense (UNIPAR),
Praça Mascarenhas de Moraes, s/n CEP: 87.502-210 - Umuarama, Paraná, Brasil.

² Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana.
San Lázaro y L. CP.10400. Ciudad Habana. Cuba.

³ Instituto de Ciências Biológicas, Médicas e da Saúde, Universidade Paranaense (UNIPAR),
Praça Mascarenhas de Moraes, s/n CEP: 87.502-210 - Umuarama, Paraná, Brasil.

RESUMO. O emprego de recursos naturais no tratamento de distintas doenças tem ressurgido com intensidade nos últimos anos. Trabalhos anteriores realizados com a espécie vegetal *Bouchea fluminensis*, apontam seu potencial antiinflamatório em processos agudos. O presente trabalho avaliou o efeito do extrato etanólico em modelo de granuloma em ratos. Durante 7 dias, foram administrados por via oral 25, 50 e 100 mg/kg de extrato etanólico de *B. fluminensis*, no grupo controle positivo indometacina 5 mg/kg. Após o período de tratamento, a formação dos granulomas foram avaliados, revelando que o granuloma nos animais tratados com extrato nas concentrações de 50 e 100 mg/kg foram significativamente diminuídos. Adicionalmente, a determinação de produtos avançados da oxidação de proteínas mostrou que em todas as doses testadas do extrato foram significativamente diferentes ao grupo controle (água). A relação dose efeito teve um coeficiente de correlação de 0,97. A concentração efetiva média para *B. fluminensis* foi de 47,26 mg/kg (Min. 40,04 mg/kg; Max. 54,49 mg/kg). A utilização deste marcador para avaliar os efeitos antiinflamatórios do extrato vegetal em modelo de granuloma em ratos se mostrou mais sensível do que o método gravimétrico.

SUMMARY. "Antiinflammatory Activity of the *Bouchea fluminensis* (Verbenaceae) Ethanolic Extract". The use of natural resources in the treatment of different diseases has increased with intensity in the last years. Previous works accomplished with the botanical specimen *Bouchea fluminensis*, had shown the antiinflammatory potential in acute inflammatory processes. The present work evaluated the effect of the ethanolic extract in granuloma test in rats. For 7 days, 25, 50 or 100 mg/kg of ethanol extract of *B. fluminensis* were administered orally in the control positive group indometacina 5 mg/kg was used. After treatment, the granuloma formation was evaluated, revealing that the granuloma in the group of animals treated with plant extract in the concentrations of 50 and 100 mg/kg were significantly decreased. Additionally, the determination of advanced products of proteins oxidation showed that in all the tested doses of the extract were significantly different compared with the control group ($p < 0.01$). The relationship between the dose and effect had a coefficient of correlation of 0.97. The effective concentration of *B. fluminensis* extract was of 47.26 mg/kg (Min. 40.04 mg/kg; Max. 54.49 mg/kg). The use of this marker to evaluate the antiinflammatory effects of the vegetable extract in granuloma model in rats was shown to be more sensitive than traditional gravimetric method.

INTRODUÇÃO

Desde os mais remotos tempos, o ser humano tem procurado na natureza tratamentos para suas moléstias. A experiência mostrou que o reino vegetal é particularmente pródigo, onde muitas plantas são utilizadas empiricamente desde longa data na medicina popular ¹. Atualmente

os fitoterápicos são amplamente utilizados em diversos países. Em alguns países da África, 80% da população dependem do uso desses medicamentos, que representam alternativas mais acessíveis frente ao alto custo dos fármacos sintéticos ². Apesar da maioria dos medicamentos serem de origem sintética, os fármacos provenientes

PALAVRAS CHAVE: *Bouchea fluminensis*, Granuloma, Inflamação, Produtos avançados de oxidação de proteínas.

KEY WORDS: Advanced products of protein oxidation, *Bouchea fluminensis*, Granuloma, Inflammation.

*Author to whom correspondence should be addressed E-mail: delaporte@unipar.br

tes de plantas superiores ocupam um lugar importante na medicina moderna ³. Os produtos naturais podem ainda ser utilizados como protótipos para obtenção de fármacos com atividades terapêuticas semelhantes a dos compostos originais ⁴.

Bouchea fluminensis é uma planta herbácea pertencente à família Verbenaceae, conhecida no Brasil como “gervão de folha grande” ou “falso gervão”. Popularmente, a espécie é utilizada como estimulantes e reguladores do sistema digestivo e como agente antiinflamatório ^{5,6}. Estudos químicos prévios revelaram a presença de iridóides, como o lamiídeo, durantosídeo, verbascosídeo, boucheosídeo ⁶⁻⁹. E, identificaram, o esteróide 3 β -O-glicopiranosídeo ⁸ e os ácidos mirístico e palmítico ¹⁰.

Fenner *et al.* ¹¹ relataram a atividade antifúngica das folhas da espécie, citando o potencial uso no tratamento de úlceras de pele. A atividade antiinflamatória e analgésica do extrato etanólico de *Bouchea fluminensis* foi comprovada por Delaporte *et al.* ^{6,12} e por Costa ¹³, respectivamente. Em modelos experimentais de edema de pata de rato, o lamiídeo mostrou potente atividade, percebida também em ensaios de peroxidação lipídica ⁶.

Assim sendo, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antiinflamatória crônica do extrato etanólico de *Bouchea fluminensis*, com a realização dos ensaios de granuloma em ratos, e realização das provas bioquímicas com os obtidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material botânico e Preparo do extrato

As folhas de *Bouchea fluminensis* foram coletadas no Horto de plantas medicinais da Universidade Paranaense - UNIPAR, no outono de 2006. Um exemplar da espécie se encontra depositada no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá, sob número de registro 4714 HUM. As folhas foram secas em estufa de ar circulante a 35 °C, moídas para a obtenção do extrato etanólico. Para a obtenção do extrato as folhas moídas foram submetidas à extração por Soxhlet com os seguintes solventes: hexano, clorofórmio e etanol (300 g de planta moída e seca). O rendimento do extrato etanólico liofilizado foi de 29,30 g.

Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar (n = 55), com peso entre 250 e 350 g. Divididos em 5 grupos de 11 animais, onde de cada grupo os

granulomas de 6 animais foram utilizados para secagem e pesagem e os granulomas de 5 animais foram utilizados nos testes bioquímicos, os grupos foram divididos em: grupo tratado extrato 25 mg/kg, grupo tratado extrato 50 mg/kg, grupo tratado extrato 100 mg/kg, grupo controle positivo tratado com indometacina 5 mg/kg e grupo controle negativo administrado água. Estes foram mantidos sete dias, e durante o desenvolvimento do estudo, a uma temperatura de 20 \pm 2 °C, e umidade relativa 50-70% em um ciclo de claro e escuro de 12/12 h. Tiveram livre acesso ao alimento (dieta padrão para roedores) e água.

Todos os procedimentos foram realizados seguindo recomendações do Comitê Internacional para os cuidados dos animais e estão em acordo com os regulamentos nacionais estabelecidos para a experimentação animal. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa Animal da Universidade Paranaense - UNIPAR, com protocolo de aprovação N° 10.236/2007.

Implante dos blocos de algodão

Os blocos de algodão com peso aproximado de 50 \pm 5 mg foram secos a 60 °C durante 18 horas em estufa, posteriormente foram anotados os pesos e esterilizados em autoclave.

Utilizando a metodologia descrita por Bailey ¹⁴, os animais foram pesados e em seguida, injetados tiletamina (50 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) por animal, por via IM. A região abdominal do rato foi lavada com sabão, após foi raspada e desinfetada com solução anti-séptica PVPI. Fez-se uma incisão em torno de 6 mm na linha média da zona ventral, posteriormente separou-se cuidadosamente a derme da parede do peritônio e com o auxílio de uma pinça hemostática reta realizou-se túneis até as laterais, de uma amplitude aproximada de 1 cm e longitudinalmente de 5 cm, pela qual se introduziu o bloco de algodão o qual foi colocado dentro de uma seringa hipodérmica plástica de 1 ml, na mesma foi eliminada a região do cone para permitir a saída do bloco de algodão. Uma vez situado o bloco no final do túnel, o mesmo foi fechado com um ponto externo para que o bloco de algodão não se deslocasse. Repetiu-se o procedimento anterior para as quatro extremidades do abdômen do rato, foram implantados quatro blocos de algodão em cada animal. Ao final dos implantes suturou-se a incisão inicial com pontos de seda cirúrgica. Em seguida, aplicou Nitrofurazona (ungüento) para evitar o canibalismo e proteger os animais de possíveis infecções.

Após o ato cirúrgico, os animais foram colocados imediatamente em incubadora a 37 °C durante 3 h (recuperação da anestesia). Posteriormente foram colocados no local de permanência nas condições padrão de trabalho. Para evitar infecções foram mantidos em viruta estéril.

Tratamento dos animais

Administrou-se por via oral, através de sonda intragástrica respectivamente durante 7 dias para os grupos tratados com extrato de etanólico de *Bouchea fluminensis* 25 mg/kg, 50 mg/kg e 100 mg/kg, para o grupo controle positivo tratado com indometacina 5 mg/kg e para o grupo controle negativo água, administrando os mesmos volumes em todos os animais.

Extração do granuloma

Sete dias depois da implantação do bloco de algodão, os animais foram novamente pesados, e procedeu-se a eutanásia para a extração dos granulomas. Após serem cuidadosamente extraídos, os mesmos foram lavados com solução fisiológica e colocados em placas de petri. Os granulomas destinados aos testes bioquímicos foram embalados hermeticamente e imediatamente congelados (-80 °C), e os demais granulomas foram secos em estufa de circulação forçada de ar a 60 °C por 18 horas, e em seguida pesados em balança analítica.

TESTES BIOQUÍMICOS

Homogenados de tecidos

Teve como objetivo a preparação e a obtenção de homogenados de tecidos, utilizando para isso um homogenizador Marconi - MA099. O fundamento consiste em avaliar distintos parâmetros enzimáticos e bioquímicos diretamente em tecidos, apresentando a dispersão do mesmo em um meio adequado. Os reativos, preparação e procedimento do método segundo Thielman¹⁵ e Nakamura *et al.*¹⁶.

Determinação de produtos avançados da oxidação de proteínas

O objetivo desta determinação é conhecer a concentração de produtos avançados da oxidação de proteínas em amostras biológicas. Determinou-se seguindo a transformação dos íons iodo a iodo diatômico que provocam os produtos avançados da oxidação de proteínas seguindo a troca de DO a 340 nm. Utilizou-se como padrão cloramina T e os resultados expressaram-se como µM de cloramina por grama de te-

cido. Os reativos, a preparação e procedimento foram segundo Witko-Sarsat¹⁷.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A massa dos granulomas foi expressa em mg, sendo calculada a mediana e os percentis 25 e 75, por grupo, comparados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Os produtos avançados da oxidação de proteínas (PAOP) foram apresentados segundo a concentração de cloramina em (mol/g de tecido, sendo, então, verificada a correlação entre a PAOP e a dose de extrato etanólico de *B. fluminensis* pelo cálculo do coeficiente de correlação não-paramétrico de Spearman, sendo calculado o coeficiente de variação e a mediana de PAOP por grupo, comparados entre si pelo método não paramétrico de Kruskal-Wallis. Em todas as determinações foi considerado um nível de significância de 5%¹⁸.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de frações terapêuticas em modelos experimentais animais constitui um dos caminhos fundamentais para obtenção de fitoterápicos para uma ação eficaz e segura, garantido dessa forma, o uso na terapêutica veterinária e humana.

O tratamento dos animais durante 7 dias levou a uma redução significativa no peso do granuloma nas doses testadas de 50 e 100 mg/kg do extrato de *B. fluminensis*, conforme demonstrados na Tabela 1. Enquanto não foi observada uma diferença significativa entre os extratos em todas as doses testadas do extrato (25, 50 e 100 mg/kg). Nos experimentos realizados, o peso dos granulomas dos animais tratados com indometacina tiveram a menor mediana, quando foi utilizada a dose de 5 mg/kg.

O modelo de granuloma em ratos tem sido utilizado para avaliação da reação inflamatória crônica e pode ser utilizado de maneira crônica ou sub-crônica na investigação de substâncias anti-artríticas¹⁹. Este modelo avalia tanto a fase transudativa quanto a fase proliferativa da inflamação crônica. Substâncias antiinflamatórias como MAINES e também a dexametasona interferem no processo de formação do granuloma suprimindo a fase inicial de infiltração de neutrófilos no granuloma¹⁴.

No ensaio de avaliação da redução da concentração de produtos avançados da oxidação de proteínas, percebeu-se um significativo efeito de dose-dependência em todas as concentrações de extrato de *B. fluminensis* testadas

Grupo	Mediana	P25	P75
Água	177,50 ^c	139,00	216,00
BF 25 mg	122,00 ^{bc}	88,00	235,00
BF 50 mg	119,00 ^b	89,00	122,00
BF 100 mg	110,00 ^b	88,00	204,00
Indometacina	93,00 ^a	81,00	99,00

Tabela 1. Efeito do extrato etanólico de *B. fluminensis* na formação de granuloma em ratos. Mediana, percentil 25 e percentil 75 da massa (mg) de granulomas obtidos de ratos tratados com 25, 50 ou 100 mg de extrato de *Bouchea fluminensis* (BF), com indometacina ou água. Valores de mediana seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, para um nível de significância $\alpha=0,05$.

(Tabela 2). A relação dose efeito para este indicador teve um coeficiente de correlação de 0,97. A concentração efetiva média para *B. fluminensis* segundo este efeito foi de 47,26 mg/kg (Min. 40,04 mg/kg; Max. 54,49 mg/kg).

Os Produtos Avançados da Oxidação de Proteínas (PAOP) são os resultados dos processos de fragmentação, entrelaçamento e agregação das proteínas após sua oxidação. Tem sido demonstrado que PAOP presentes no soro humano são capazes de ativar monócitos em sistemas *in vitro*, e a magnitude da ativação é proporcional a concentração de PAOP. As concentrações de PAOP se correlacionam com as de ditiosina (DT) e carbonilas, mas também são resultados do entrelaçamento proteico, dado que DT purificada não origina ativação de monócitos²⁰.

Os PAOP são marcadores recentes do dano oxidativo à proteína. E este trabalho é provavelmente o primeiro a utilizar esta metodologia na caracterização bioquímica do modelo de granuloma. Pode-se apreciar as diferenças altamente significativas ($p < 0,01$) entre o grupo controle negativo e o grupo controle positivo (indometacina). Por outro lado, este indicador foi também significativamente diferente ($p < 0,01$) entre todos os grupos tratados com diferentes doses de *B. fluminensis*.

A utilização deste indicador atribui uma grande sensibilidade ao método, e foi apartir destes dados que a dose efetiva média foi calculada. O método gravimétrico baseado no peso seco do granuloma pode induzir a um erro maior.

Os PAOP originam-se basicamente por cloração das proteínas, esta cloração somente é possível por ação de células polimorfonucleares que contém a enzima mieloperoxidase. Este é o

Grupo	Mediana	Coefficiente de variação (%)
Água	573,84 ^a	20,44
BF 25 mg	392,94 ^c	11,13
BF 50 mg	239,62 ^d	14,36
BF 100 mg	96,42 ^e	21,72
Indometacina	46,14 ^b	18,26

Tabela 2. Concentração de Produtos Avançados de Oxidação de Proteínas em granuloma dos grupos em estudo (μmol de cloramina/g de tecido). Valor de mediana seguido de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, para um nível de significância $\alpha=0,01$.

motivo que PAOP é um marcador muito seletivo do processo inflamatório e da migração de polimorfos ao sítio inflamado. PAOP tem sido acrescentado em numerosas desordens inflamatórias em seres humanos, como pacientes HIV²¹, em uremia^{22,23}, diabetes tipo 2²⁴ e outros transtornos inflamatórios²⁵.

Os PAOP não são somente derivados da oxidação de proteínas, assim como, tem atividade biológica e esta atividade potencia o processo inflamatório e faz possível a síntese de citoquinas e a perpetuação da reação inflamatória²⁰.

CONCLUSÃO

Com foi demonstrado, a fração etanólica de *B. fluminensis* possui um significativo efeito anti-inflamatório no modelo de inflamação crônica. A potência comparada com a substância de referência (indometacina 5 mg/kg) foi baixa, mas deve-se levar em consideração que o extrato é uma mistura de princípios ativos e não uma substância pura. Por outro lado, é provável que os efeitos adversos deste extrato natural sejam muito menores que os reportados para a indometacina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Valente, F.L.S. (2002) "Segurança alimentar e nutricional: transformando natureza em gente" (Cortez, ed.), São Paulo, Vol. 1, págs. 272.
2. Aschwanden, C. (2001) *Bull. W.H.O.* **79**: 691-2.
3. Gragg, G.M., D.J. Newman & K.M. Snader (1997) *J. Nat. Prod.* **60**: 52-60.
4. Robers, J.E.; M.K. Speedie; V.E. Tyler (1996) "Pharmacognosy and pharmacobiotechnology" (Willians & Wilkins, ed.), Baltimore, Vol 1, págs. 1-14.

5. Pio Corrêa, M. (1984) *“Dicionário de plantas úteis do Brasil. Ministério da Agricultura”*, Rio de Janeiro, Vol. 3, pág. 395.
6. Delaporte, R.H., G.M. Sánchez, A.C. Cuellar, A. Giuliani & J.C.P. Mello (2002) *J. Ethnopharmacol.* **82**: 127-30.
7. Rimpler, H. & H. Sauerbier (1986) *Biochem. Syst. Ecol.* **14**: 307-10.
8. Matilda, A.K., M.H. Rossi, E.E.A. Blumenthal, I.T.A. Schuquel, A. Malheiros & G.J. Vidotti (1996) *Anais da Assoc. Bras. Química* **46**: 147-51.
9. Schuquel, I.T.A., A. Malheiro & M. Sarragiotto (1998) *Phytochemistry* **49**: 2409-11.
10. Delaporte, R.H., Martinez, M.M., Mello, J.C.P., Sanchez, G.M. & Mellecchi, M.I.S. (2001) *Rev. Cub. Farm* **1**: 35:7.
11. Fenner, R., A.H. Betti, L.A. Mentz & S.M.K.P. Rates (2006) *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* **42**: 3-9.
12. Delaporte, R.H., G.M. Sánchez., A.C. Cuellar & J.C.P. Mello (2001) *Acta Farm. Bonaerense* **20**: 39-46.
13. Costa, V.B., C.S. Coube, M.E. Marinho, S.G. Matheus & P.D.F. Leitão (2003) *Fitoterapia* **74**: 364-71.
14. Bailey, P.J. (1982) *Biochem. Pharmacol.* **31**: 1213-8.
15. Thielman K (1973) *Principios de metodología en Bioquímica Clínica*. Leipzig. RDA., págs. 31-3.
16. Nakamura, H., Jilka, R.L., Boland, R. & Martonosi, A.N. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**: 5414-23.
17. Witko-Sarsat V., M. Friedlander, T. Nguy-Khoa, C. Capeillere-Blandin & A.H. Nguyen (1998) *J. Immunol.* **161**: 2524-32.
18. Triola, M.F. (2005) *“Introdução à Estatística”* (LTC, ed.), Rio de Janeiro, Vol. 1, págs. 282-333.
19. Spector, W.G. (1969) *Intern. R. Exp. Phatol.* **8**: 1-55.
20. Martínez-Sánchez, G., A. Giuliani, G. Pérez-Davison & O.S. León-Fernández (2005a) *Redox Report* **10**: 174-84.
21. Witko-Sarsat V, T. Nguyen-Khoa, P. Jungers & Drueke & B. Descamps-Latscha (1999) *Nephrol. Dial. Transplant.* **14**: 76-8.
22. Witko-Sarsat V, V. Gausson & B. Descamps-Latscha (2003) *Kidney Int. Suppl.* **84**: S11-4.
23. Yuan F, X. Liu & J.W. Tian (2004) *Di Yi Jun Da Xue Xue Bao* **24**: 1350-2.
24. Martínez-Sánchez G, S.M. Al-Dalain, I. Popov, S. Menendez, A.Guiliani & O.S. León. (2005) *Acta Farm Bonaerese* **24**: 197-203.
25. Yazici C, K. Kose, M. Calis, M. Delmlr, M. Kirnap & F. Ates (2004) *Br. J. Dermatol.* **151**: 105-11.