

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIA KEMEL MESSMAR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTI-INFLAMATÓRIA DOS EXTRATOS DAS SEMENTES DE
Persea americana (Mill.) LAURACEAE**



**CURITIBA
2013**

DANIA KEMEL MESSMAR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTI-INFLAMATÓRIA DOS EXTRATOS DAS SEMENTES DE
Persea americana (Mill.) LAURACEAE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof. Dra. Iara José Taborda
de Messias Reason

Curitiba
2013

Messmar, Dania

Avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos das sementes de *Persea americana* (Mill.) Lauraceae / Dania Messmar – Curitiba, 2013.

76 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Iara Messias Reason

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2013.

Inclui bibliografia

1. *Persea americana*. 2. Abacate. 3. Inflamação. 4. Fitoterápico. I. Reason, Iara Messias. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.32

TERMO DE APROVAÇÃO

DANIA KEMEL MESSMAR

Título: **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATORIA DOS EXTRATOS DAS SEMENTES DE *Persea americana***

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.



Profª. Dra. Iara José de Messias Reason
Orientadora



Profª. Dra. Thelma Larocca Skare
Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná



Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 14 de março de 2013.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, por me amar incondicionalmente e estar sempre presente para que eu não desista nos momentos de dificuldade.

À minha orientadora Prof. Dra. Iara Messias, pelo amor, pelo carinho, pela orientação científica e espiritual e por estar sempre ao meu lado em todas as horas.

Ao Prof Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos, que vem me acompanhando há anos e sempre demonstrou muito incentivo e paciência não só a mim, mas a todos aqueles cujos olhos ainda brilham pela ciência.

Ao Prof Dr. Aleksander Zamprônio, por quem tenho enorme admiração profissional e pessoal, e trouxe grande contribuição científica durante os meus anos de mestrado.

Aos colegas do laboratório de Imunopatologia Molecular e Farmacognosia da UFPR, pelo companheirismo, paciência e colaboração de todos.

Ao grande amigo e Prof. MsC Walmes Marques Zeviani, do departamento de Estatística da UFPR, pela amizade, atenção e colaboração na análise estatística dos dados deste trabalho.

Ao meu companheiro, Alessandro Reina, que escolheu se aventurar ao meu lado nesta trajetória que chamamos de vida e a quem amo muito.

À minha grande amiga Fernanda Mattana, a irmã que eu escolhi e que está constantemente me lembrando que nas dificuldades o ser humano se transforma e aprende.

Aos meus irmãos Hassan e Fádía, que mesmo longe, mantiveram nossa família unida e sempre me apoiaram profissionalmente.

Ao meu pai (in memoriam), que me observa de longe e me envia muito amor para que eu também complete aqui a minha jornada.

Aos meus pais, Bahie e Kemel (in memoriam).

“A preocupação com o próprio homem e seu destino deve constituir sempre o interesse principal de todos os esforços técnicos...Nunca se esqueçam disso em meio a seus diagramas e equações.”

Albert Einstein

RESUMO

A busca por novos medicamentos para o tratamento da osteoartrite tem-se tornado cada vez mais necessária devido aos efeitos colaterais produzidos pelos analgésicos e antiinflamatórios utilizados na prática médica atual. Ainda, por ser uma doença de maior prevalência em idosos, as co-morbidades apresentadas por esta população restringem o espectro de opções dos medicamentos analgésicos. Alguns fitoterápicos são indicados para auxiliar o tratamento de doenças reumáticas, mas não existem estudos suficientes que comprovem suas eficácias. O caroço de abacate (*Persea americana* (Mill.) Lauraceae) é utilizado na medicina popular para o tratamento da dor em pacientes que sofrem de doenças reumáticas, como a osteoartrite e a artrite reumatóide. O presente estudo avaliou a ação antiinflamatória e analgésica dos extratos obtidos das sementes de *Persea americana* (Mill.), em diferentes solventes e concentrações, em ensaios *in vitro* e *in vivo*. O ensaio de citotoxicidade *in vitro* (MTT) demonstrou que o extrato das sementes de *Persea americana* não são citotóxicos ($p > 0.05$) nas primeiras 24 horas do experimento nas concentrações 0,1 µg/mL (49.07 ± 2.26 ABS/ 10^6 céls) e 1 µg/mL (47.77 ± 3.05 ABS/ 10^6 céls) em comparação com o grupo controle (48.01 ± 2.45 ABS/ 10^6 céls), tampouco nas 48 horas do experimento ($p > 0,05$) nas concentrações 0,1 µg/mL (54.96 ± 8.01 ABS/ 10^6 céls) e 1 µg/mL (54.24 ± 9.20 ABS/ 10^6 céls) quando comparados ao controle (59.54 ± 10.72 ABS/ 10^6 céls) em células macrofágicas da linhagem RAW 264.7. Outro resultado, obtido no teste de liberação de citocinas pró-inflamatórias utilizando o sobrenadante das células cultivadas no ensaio do MTT, indicou que o extrato de *Persea americana* é capaz de diminuir a liberação das citocinas MCP-1 na concentração de 0,1 µg/mL (não detectável) e 1 µg/mL ($60,25 \pm 1,83$ pg/mL) em comparação com o nível basal desta quimiocina ($297,15 \pm 2,70$ pg/mL). O mesmo aconteceu com a citocina TNF: o extrato foi capaz de diminuir a citocina em questão nas concentrações 0,1 µg/mL ($7,15 \pm 1,60$ pg/mL) e 1 µg/mL ($10,95 \pm 1,46$ pg/mL) no sobrenadante das células RAW 264.7 em relação ao grupo controle ($94,24 \pm 2,26$ pg/mL). No ensaio do edema de pata de camundongo induzido por carragenina, o extrato bruto das sementes de *Persea americana* demonstrou reduzir o edema de pata em 50% (extrato à 100%) e 40% (extrato à 50%) em comparação ao tratamento com diclofenaco que reduziu o inchaço em cerca de 25% (pomada à 10mg/g). Os resultados mencionados acima demonstraram-se promissores, sugerindo a continuidade do estudo para produção e utilização de um fitoterápico a base do extrato das sementes de *Persea americana* poderá auxiliar no tratamento de dores crônicas, incluindo a osteoartrite.

ABSTRACT

Since the analgesics and anti-inflammatory drugs used on daily medicine to treat osteoarthritis are associated with several undesirable side effects, the search for new safe and effective drugs to treat this disorder is necessary. Besides that, the high prevalence of this disease in elderlies restricts the spectrum of medicines that could be used as analgesics and anti-inflammatories due to the presence of comorbidities. Some phytoterapics are indicated for the treatment of rheumatic diseases, although there are no sufficient studies that comprovate their efficacies. Avocado's seeds (*Persea americana* (Mill.) Lauraceae) are used in popular medicine to treat pain related to rheumatic diseases, such as osteoarthritis and rheumatoid arthritis. In this study, the antiinflammatory effects of the extracts obtained from the seeds of *Persea americana*, in different solvents and concentrations, were evaluated using *in vivo* and *in vitro* assays. The citotoxicity *in vitro* assay (MTT) in macrophagic murine cells RAW 264.7 demonstrated that *Persea americana* seed's extract is not citotoxic ($p > 0.05$) in the first 24 hours of the experiment in the concentrations of $0.1 \mu\text{g/mL}$ ($49.07 \pm 2.26 \text{ ABS}/10^6 \text{ cells}$) and $1.0 \mu\text{g/mL}$ ($47.77 \pm 3.05 \text{ ABS}/10^6 \text{ cells}$) compared to the control group ($48.01 \pm 2.45 \text{ ABS}/10^6 \text{ cells}$); neither at the 48h in the concentrations of $0.1 \mu\text{g/mL}$ ($54.96 \pm 8.01 \text{ ABS}/10^6 \text{ cells}$) e $1.0 \mu\text{g/mL}$ ($54.24 \pm 9.20 \text{ ABS}/10^6 \text{ cells}$) when compared to the control group ($59.54 \pm 10.72 \text{ ABS}/10^6 \text{ cells}$). The assay to evaluate the secretion of pro-inflammatory cytokines by macrophagic murine cells RAW 264.7 in culture showed that *Persea Americana* extract is capable of reducing the release of MCP-1 in the concentration of $0.1 \mu\text{g/mL}$ (not detectable) and $1.0 \mu\text{g/mL}$ ($60.25 \pm 1.83 \text{ pg/mL}$) compared with basal levels of this chemokine ($297.15 \pm 2.70 \text{ pg/mL}$, $p < 0.001$). The same effect was observed for the cytokine TNF: the extract was capable of reducing the secretion of this cytokine at the concentrations $0.1 \mu\text{g/mL}$ ($7.15 \pm 1.60 \text{ pg/mL}$) and $1.0 \mu\text{g/mL}$ ($10.95 \pm 1.46 \text{ pg/mL}$) compared to control group ($94.24 \pm 2.26 \text{ pg/mL}$). The Carrageenan induced paw edema *in vivo* assay showed that the *Persea americana* seeds brute extract reduced the paw edema at 50% (extract 100%) and 40% (extract 50%) in comparison to the treatment by diclofenac, which reduced the swelling in 25% (ointment 10mg/g). These results are promising and further studies aiming the development of phytoterapics containing *Persea Americana* seed extract which could be helpful for the treatment of chronic pain, including osteoarthritis, should be encouraged.

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1– EFEITO CITOTÓXICO DOS EXTRATOS DAS SEMENTES DE <i>Persea americana</i> NAS CONCENTRAÇÕES 0.1µg/mL e 1.0 µg/mL COMPARADOS AO GRUPO CONTROLE E SAPONINA	56
GRÁFICO 2– CONCENTRAÇÃO DA CITOCINA TNF EM pg/mL NO SOBRENADANTE DE CÉLULAS MACROFÁGICAS MURINAS (RAW 264.7) TRATADAS COM EXTRATO DAS SEMENTES DE <i>Persea americana</i> NAS CONCENTRAÇÕES 0.1µg/mL e 1.0 µg/mL	59
GRÁFICO 3– CONCENTRAÇÃO DA CITOCINA MCP-1 EM pg/mL NO SOBRENADANTE DE CÉLULAS MACROFÁGICAS MURINAS (RAW 264.7) TRATADAS COM EXTRATO DAS SEMENTES DE <i>Persea americana</i> NAS CONCENTRAÇÕES 0.1µg/mL e 1.0 µg/mL	60
GRÁFICO 4– EFEITO DO EXTRATO DAS SEMENTES DE <i>Persea americana</i> NAS CONCENTRAÇÕES DE 50% E 100% EM COMPARAÇÃO COM UM ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO (DICLOFENACO DEA) SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA	67

LISTA DE FOTOGRAFIAS

FOTOGRAFIA 1– COLETA DOS FRUTOS DE <i>Persea americana</i> (Mill.) NO <i>campus</i> CENTRO POLITÉCNICO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	34
FOTOGRAFIA 2– FRUTOS DE <i>Persea americana</i> (Mill.) COLETADOS NO <i>campus</i> CENTRO POLITÉCNICO DA UFPR (A). SEMENTES DE <i>Persea americana</i> (Mill) <i>IN NATURA</i> (B). SECAGEM DAS SEMENTES MOÍDAS DE <i>Persea</i> <i>americana</i> (Mill.) EM ESTUFA A 35 ⁰ C (C).....	34
FOTOGRAFIA 3– EXTRATO BRUTO DAS SEMENTES DE <i>Persea americana</i> (Mill) APÓS RETIRADA DO SOLVENTE EXTRATOR (ÁLCOOL ETÍLICO ABSOLUTO) E POSTERIOR LIOFILIZAÇÃO	37
FOTOGRAFIA 4– CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS EXTRATOS DE <i>Persea americana</i> (Mill) UTILIZANDO COMO SOLVENTES: ETANOL (A), ACETONA:ÁGUA (7:3)(B), ACETATO DE ETILA (C) E METANOL:ÁGUA (7:3) (D).FASE MÓVEL: CLOROFÓRMIO:TOLUENO: METANOL (7:2:1) FASE ESTACIONÁRIA: SÍLICA	48
FOTOGRAFIA 5– EXTRATOS DE <i>Persea americana</i> (Mill) OBTIDOS POR MACERAÇÃO, COM E SEM SONICADOR	50

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1– FISIOPATOLOGIA DA OSTEOARTRITE	23
FIGURA 2– JOELHO DE UM PACIENTE DE 63 ANOS COM OSTEOARTRITE (À ESQUERDA). RAIO-X DE UM PACIENTE DEMONSTRANDO OSTEOARTRITE BILATERAL (À DIREITA).....	24
FIGURA 3– ARTICULAÇÃO DE JOELHO SAUDÁVEL (A) E ARTICULAÇÃO DE INDIVÍDUO COM OSTEOARTRITE DE JOELHO (B).	24
FIGURA 4– PROTOCOLO DE TRATAMENTO PARA PACIENTES COM OSTEOARTRITE, ESTABELECIDO PELO COLÉGIO AMERICANO DE REUMATOLOGIA EM 1995.....	28
FIGURA 5– ÁCIDOS ABSCÍPICOS GLUCOSILADOS ISOLADOS DAS SEMENTES DE <i>Persea americana</i> (Mill)	32
FIGURA 6– ILUSTRAÇÃO DO PRINCÍPIO DO TESTE DO KIT BD CYTOMETRIC BEAD ARRAY (CBA) MOUSE INFLAMMATION KIT® DEMONSTRANDO A FORMAÇÃO DO COMPLEXO ESFERA- ANALITO-REAGENTE DE DETECÇÃO NO SOBRENADANTE DAS CÉLULAS ANALISADAS (RAW 264.7	42
FIGURA 7– EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA.....	45
FIGURA 8– PAQUÍMETRO DIGITAL UTILIZADO PARA MEDIR A ESPESSURA DA PATA DE ANIMAIS EXPERIMENTALMENTE.....	46

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1– ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROCEDIMENTO PARA CÁLCULO DE MASSA SECA BASEADO NA FARMACOPÉIA BRASILEIRA	35
ESQUEMA 2– ILUSTRAÇÃO DOS MATERIAIS BIOLÓGICOS UTILIZADOS PARA O ENSAIO DE SECREÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E CITOTOXICIDADE IN VITRO (MTT).....	41
ESQUEMA 3– ESQUEMA DE PREPARO DO MIX DE ESFERAS DE CAPTURA DE CITOCINAS (BEADS) UTILIZADO PARA ANÁLISE DO SOBRENADANTE DE CÉLULAS RAW 264.7	44
ESQUEMA 4– ESQUEMA ILUSTRATIVO DO TESTE DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS UTILIZANDO O KIT BD CYTOMETRIC BEAD ARRAY (CBA) MOUSE INFLAMMATION (SIGMA®).....	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1– DROGAS E REAGENTES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS.....	39
TABELA 2– CÁLCULO DA MASSA SECA DOS EXTRATOS DE <i>Persea Americana</i> OBTIDOS COM O USO DO SONICADOR E NA AUSÊNCIA DESTE	50
TABELA 3– MASSA DAS CÁPSULAS DE PORCELANA E DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Persea americana</i> PARA OBTENÇÃO DA MASSA SECA DO EXTRATO BRUTO	51
TABELA 4– TEOR DE MASSA SECA NO EXTRATO DE <i>Persea americana</i> APÓS LIOFILIZAÇÃO	53
TABELA 5– VIABILIDADE CELULAR EM ABS/10 ⁶ CÉLULAS DOS GRUPOS SAPONINA, CONTROLE, EXTRATO 0.1 µg/mL E EXTRATO 1.0 µg/mL EM DIFERENTES TEMPOS (24h e 48h) DURANTE ENSAIO DE CITOTOXICIDADE AVALIADO PELA REDUÇÃO DO SAL DE TETRAZÓLIO (MTT)	54
TABELA 6- COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS EXPERIMENTAIS DO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE IN VITRO (MTT) EM DIFERENTES TEMPOS (24h e 48h)- SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA ENTRE GRUPOS (VALOR DE p)	55
TABELA 7– CONCENTRAÇÃO DE TNF EM pg/mL NO SOBRENADANTE DE CÉLULAS RAW 264.7 SEM TRATAMENTO (CONTROLE) E TRATADAS COM EXTRATO DE <i>Persea americana</i> a 0,1µg/mL e 1µg/mL	58
TABELA 8– CONCENTRAÇÃO DE MCP-1 EM pg/mL NO SOBRENADANTE DE CÉLULAS RAW 264.7 SEM TRATAMENTO (CONTROLE) E TRATADAS COM EXTRATO DE <i>Persea americana</i> a 0.1µg/mL e 1.0 µg/mL	60
TABELA 9– DIFERENÇA NA ESPESSURA DA PATA DE CAMUNDONGOS DURANTE ENSAIO DE EDEMA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM COMPARAÇÃO À ESPESSURA BASAL DA PATA	64
TABELA 10- COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS EXPERIMENTAIS DO ENSAIO DE EDEMA DE PATA DE CAMUNDONGO INDUZIDO POR CARRAGENINA , 2 HORAS APÓS INJEÇÃO INTRAPLANTAR DO AGENTE FLOGÍSTICO- SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA ENTRE GRUPOS (VALOR DE p)	65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABS- absorbância

AINE- anti-inflamatório não- esteroide

CCD- cromatografia em camada delgada

CFA- coadjuvante completo de Freund

CIA- artrite induzida por colágeno

COX-2- ciclooxigenase 2

Diclofenaco DEA- diclofenaco dietilamonio

DPPH- 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

ELISA- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

UFPR- Universidade Federal do Paraná

INPI- Instituto Nacional de Propriedade Industrial

MCP-1- Proteína quimiotática de monócitos

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

WHO- World Health Organization

® - Marca Registrada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. JUSTIFICATIVA E IMPORTÂNCIA DO ESTUDO	18
1.1. OBJETIVO GERAL.....	21
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1. OSTEOARTRITE.....	22
2.2. TERAPIA MEDICAMENTOSA DA OSTEOARTRITE	25
2.3. CONTEXTO DE FITOTERÁPICOS NO BRASIL	29
2.4. <i>Persea americana</i> (Mill) LAURACEAE	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 MATERIAL BOTÂNICO	33
3.2 PREPARO DOS EXTRATOS DE <i>Persea americana</i> (Mill.)	35
3.2.1. Uso de sonicador (ultra-som)	36
3.2.2. Utilização de diferentes solventes	36
3.2.3. Preparo do Extrato Alcoólico Bruto das sementes de <i>Persea americana</i> (Mill.).....	37
3.3. ANIMAIS.....	38
3.4. DROGAS E REAGENTES	39
3.5. ENSAIOS BIOLÓGICOS	40
3.5.1. Citotoxicidade <i>in vitro</i> –Redução do sal de tetrazólio (MTT)	40
3.5.2. Liberação de citocinas pró-inflamatórias no sobrenadante de células macrofágicas RAW 265.7	41
3.5.3. Ensaio do edema da pata do camundongo induzido por carragenina	45
3.6. Análise estatística dos resultados	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1. UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES SOLVENTES	48
4.2. UTILIZAÇÃO DE ULTRA-SOM DURANTE MACERAÇÃO	49
4.3. CÁLCULO DA MASSA SECA DO EXTRATO DE <i>Persea americana</i>	51
4.4. CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE <i>Persea americana</i> - RENDIMENTO EM MASSA SECA.....	51
4.5. TEOR DE MASSA SECA DO EXTRATO LIOFILIZADO DE <i>Persea americana</i>	52
4.6. . ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DE REDUÇÃO DO SAL DE TETRAZÓLIO (MTT)	53
4.7. EFEITO IMUNOMODULADOR DO EXTRATO DE <i>Persea americana</i> NO ENSAIO DE SECREÇÃO DE CITOCINAS POR MACRÓFAGOS RAW 264.7.....	57
4.8. ENSAIO DO EDEMA DA PATA DO CAMUNDONGO INDUZIDO POR CARRAGENINA	61
5. CONCLUSÃO	69
6. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1. INTRODUÇÃO

As primeiras substâncias utilizadas como medicamentos na história da humanidade são aquelas classificadas atualmente como plantas medicinais. Seu uso remete a civilizações antigas cujos primeiros registros se devem aos egípcios, que obtinham como única alternativa os recursos naturais para a cura ou tratamento de doenças.

Há diversos registros do uso de plantas medicinais, como a papoula (*Papaver somniferum*), maconha (*Cannabis sativa*), babosa (*Aloe vera*), dentre outras, há milhares de anos antes de Cristo. Contudo, foi somente no século XIX que se iniciou a procura pelos princípios ativos presentes nas plantas medicinais, criando assim, os primeiros medicamentos com as características que nós conhecemos atualmente (CALIXTO,2001).

Entretanto, a utilização caseira de plantas na prática medicinal, não somente da população que carece de recursos financeiros, mas também de populações tradicionais, como a indígena e a chinesa, é uma realidade ainda bastante atual. Estas populações utilizam as plantas para o preparo de chás, infusões, macerados caseiros ou qualquer outra forma que possibilite extrair os princípios ativos das plantas e utilizá-los na prevenção ou cura de doenças.

No Brasil, a utilização de fitoterápicos e plantas medicinais na terapêutica médica atual se deve principalmente ao contexto sócio-econômico da população. Diferentemente dos países orientais, o Ocidente não tem por costume a busca preferencial por produtos naturais quando em situações de enfermidades, mas em diversas regiões do Brasil faz-se o uso de plantas sem qualquer padronização química ou biológica para tratar inúmeras doenças.

Existem dois motivos principais para este fato: a extensa e exuberante flora brasileira que disponibiliza diversas espécies de plantas que podem ser empregadas para tratar diferentes enfermidades, baseadas em indicações populares, e o difícil acesso da população a medicamentos industrializados, devido a condições financeiras precárias e falta de políticas sociais e de saúde.

Devido a este fato, o governo federal criou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio do Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006, que estabelece diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações pelos diversos parceiros em torno de objetivos comuns voltados à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos em nosso país, ao desenvolvimento de tecnologias e inovações, assim como ao fortalecimento das cadeias e dos arranjos produtivos, ao uso sustentável da biodiversidade brasileira e ao desenvolvimento do Complexo Produtivo da Saúde (Ministério da Saúde, 2006).

Este documento trata da utilização de algumas plantas nativas brasileiras na cura, prevenção e tratamento de diversas doenças.

Apesar da criação deste documento, o Brasil ainda dá os primeiros passos quando se trata do desenvolvimento de novos fitoterápicos, uma vez que a falta de investimento financeiro neste setor ainda é uma realidade.

Assim, novos projetos de incentivo à pesquisa e desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos dentro das universidades nacionais seria uma alternativa para modificar o atraso do Brasil neste contexto. Definitivamente, se este incentivo fosse adotado haveria um maior interesse e parceria com as indústrias farmacêuticas nacionais.

1.1. JUSTIFICATIVA E IMPORTÂNCIA DO ESTUDO

Atualmente, muitos pacientes com doenças crônicas fazem uso de fitoterápicos como terapia alternativa para tratamento de suas enfermidades. Uma das razões para a utilização de fitoterápicos é que o uso constante de medicamentos aloterápicos para o tratamento destas doenças pode provocar efeitos colaterais graves e muitas vezes, irreversíveis. Assim, o paciente crônico procura fazer uso da fitoterapia, uma vez que medicamentos à base de plantas têm apresentado menos efeitos colaterais que medicamentos alopáticos (SCHULZ, 2001).

Na medicina popular, uma das indicações fitoterápicas que se tem conhecimento é a utilização do macerado caseiro do caroço de abacate (*Persea sp.*) para o tratamento da osteoartrite (ALONSO, 2004). A osteoartrite é uma doença articular crônica de alta prevalência em idosos e cuja terapia medicamentosa está frequentemente associada a efeitos adversos (COIMBRA, 2002; LEDERMAN, 1997)

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o Brasil ocupa segundo lugar no ranking de incidência de osteoartrite (OA) no mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos (EUA) (OMS, 2011). Porém, são poucos os dados epidemiológicos sobre a incidência desta doença, uma vez que seu diagnóstico é dificultado pela difícil correlação entre sintomas da osteoartrite e achados radiográficos, além da dificuldade de detectar a doença precocemente (WOOLF, 2003).

Estima-se que, mundialmente, 9,6% dos homens e 18% das mulheres, ambos acima de 60 anos, apresentam sintomas de osteoartrite, sendo que a

maior parte destes sintomas estão relacionados à região articular do joelho (MURRAY,1996). Os fatores preditivos para o desenvolvimento desta doença incluem obesidade, atividades de impacto nas articulações (atletas), fumo, sexo e idade (DAVIS,1990).

Uma vez que a terapia medicamentosa dos pacientes com osteoartrite tem sofrido algumas mudanças nos últimos tempos, o setor industrial pouco investe em medicamentos de baixo custo, acessíveis à população de modo geral. As novas alternativas incluem moduladores biológicos e até novos fitoterápicos em cápsulas, todos de custo elevado e cujos fabricantes retêm suas patentes.

Ainda, deve-se considerar que a osteoartrite é uma doença de difícil tratamento pois a resposta de cada paciente à terapia medicamentosa é bastante singular. Em muitos casos, o paciente abstém-se de determinados medicamentos devido aos efeitos colaterais produzidos por estes.

Atualmente, no Brasil, apenas um medicamento fitoterápico é de fabricação nacional (Acheflan®), realidade bastante díspar quando se analisa a variedade da flora nativa brasileira. Muitos estudos com extratos de plantas têm demonstrado um excelente potencial anti-inflamatório, porém seu emprego como base para novos medicamentos não têm-se desenvolvido no Brasil.

O presente estudo teve como objetivo comprovar a eficácia do extrato das sementes de *Persea americana* (Mill.) na atividade anti-inflamatória através de experimentos *in vivo* e *in vitro* e avaliar o potencial do extrato desta planta como uma nova opção na terapia medicamentosa em pacientes com osteoartrite. Para isso, admite-se que o projeto em questão deverá assumir continuidade para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica adequada

com a incorporação do extrato de *Persea americana* baseado em análises farmacocinéticas, farmacodinâmicas e farmacotécnicas, objetivando desenvolver um novo fitoterápico para o tratamento da osteoartrite.

1.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade biológica dos extratos das sementes de *Persea americana* (Mill.), Lauraceae, em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o melhor extrato (etanólico, metanólico) e a melhor concentração/dose do extrato de *Persea americana* (Mill) Lauraceae objetivando desenvolver um novo fitoterápico para o tratamento adjuvante da osteoartrite.
- Avaliar a citotoxicidade do extrato frente a células macrofágicas murinas (RAW 264.7) nas concentrações 0,1µg/mL, 1 µg/mL, através do ensaio de redução do sal de tetrazólio (MTT).
- Avaliar os efeitos do extrato bruto de *Persea americana* na liberação de citocinas pró-inflamatórias no sobrenadante de células macrofágicas murinas (RAW 264.7) como dado complementar ao conjunto de experimentos que o classificarão como um extrato com propriedades anti-inflamatórias.
- Avaliar a capacidade anti-flogística do extrato bruto de *Persea americana* (Mill) no ensaio de edema de pata induzido por carragenina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. OSTEOARTRITE

A osteoartrite é uma doença crônica articular, de causa multifatorial e de alta prevalência na população geral idosa. Segundo dados do Colégio Americano de Reumatologia, aproximadamente 27 milhões de indivíduos adultos apresentam atualmente diagnóstico de osteoartrite nos EUA (ACR, 2012). A OMS estima que mais de 40% da população mundial acima de 70 anos tem diagnóstico de osteoartrite de joelho (OMS,2011). No Brasil, não há dados epidemiológicos exatos sobre a incidência desta doença, mas sabe-se que nosso país é vice-líder mundial em incidência da osteoartrite (OMS,2012).

A definição correta de osteoartrite, estabelecida pelo Colégio Americano de Reumatologia em 1994, é “*uma doença com envolvimento global da articulação (osso subcondral, ligamentos, cápsula articular, membrana sinovial e músculos periarticulares)*”. Os fatores de risco da doença envolvem: idade, sexo feminino, predisposição genética, obesidade, deficiências nutricionais, fraqueza muscular, além de alterações estruturais intra-articulares (TREVISANI, 2009).

Por um mecanismo ainda não esclarecido, os componentes da matriz cartilaginosa sofrem alterações em sua composição e estrutura, prejudicando o funcionamento normal da articulação. O teor hídrico diminui, as fibras colágenas, bem como as proteínas da matriz, sofrem mudanças estruturais e a produção de condrócitos é comprometida (FIGURA 1).



FIGURA 1- FISIOPATOLOGIA DA OSTEOARTRITE. Nota: demonstração do espessamento da cápsula articular oriundo da produção de um fluido composto por agentes pró-inflamatórios. É possível notar também uma diminuição do espaço articular e a cartilagem sendo substituída por uma espécie de fibrilação cartilaginosa. Outra observação é a ocorrência de osteofitose (formação de osteófitos) devido ao excesso de osteoblastos decorrente do desequilíbrio entre formação e degradação de células condrais.

FONTE: www.osteoartrose.com.br (Acesso em 2011)

A osteoartrite é caracterizada por uma intensa abrasão da cartilagem articular, esclerose, formação de cistos sob a superfície óssea e osteófitos nas superfícies das juntas (FIGURA 2). Embora usualmente classificada como uma desordem articular degenerativa, a osteoartrite apresenta um importante mecanismo inflamatório no seu curso. O número de leucócitos detectado no líquido sinovial pode encontrar-se abaixo dos limites padrões característicos de doenças inflamatórias ($2.000 \text{ células/mm}^3$), porém, o envolvimento de importantes citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) está bem definido no mecanismo fisiopatológico da doença (SELLAM, 2010).

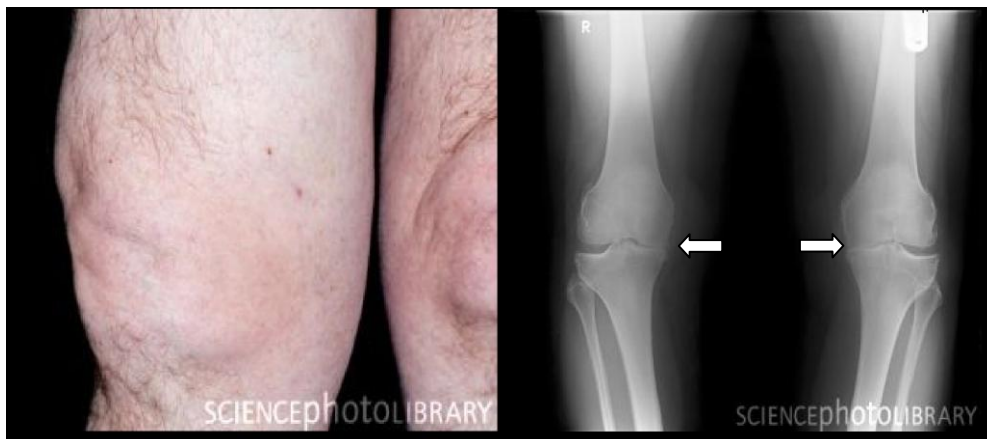


FIGURA 2- JOELHO DE UM PACIENTE DE 63 ANOS COM OSTEOARTRITE (À ESQUERDA). RAIO-X DE UMA PACIENTE DEMONSTRANDO OSTEOARTRITE BILATERAL (À DIREITA). Nota: na fotografia da esquerda, o inchaço é proveniente do acúmulo de fluido na articulação do joelho devido ao processo degenerativo articular relacionado à fisiopatologia da osteoartrite. À direita, o espaço articular sofreu estreitamento (indicado com setas) e ocorreu o aparecimento de osteófitos nas superfícies das juntas.

FONTE: Adaptado de SCIENCE PHOTO LIBRARY (Acesso em 2011).
Créditos: Dr. P. Marazzi

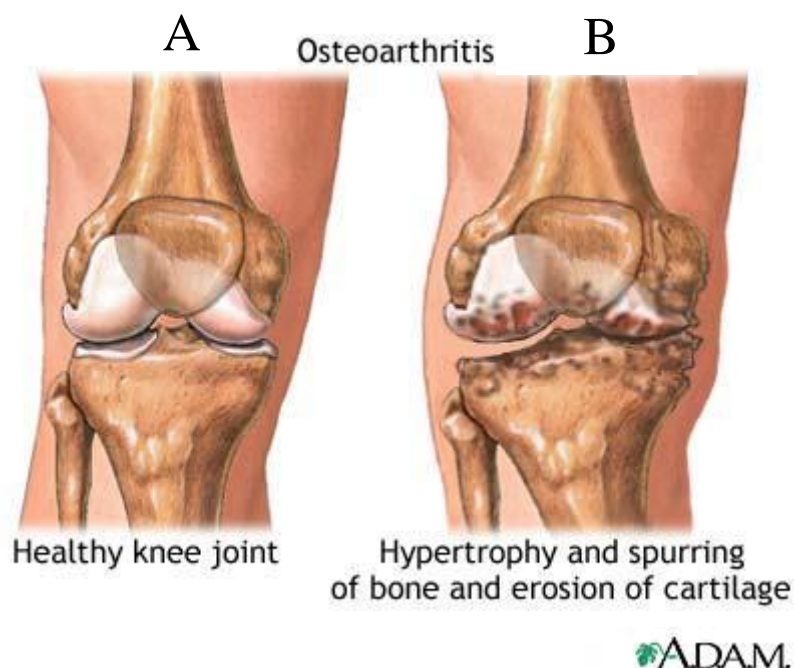


FIGURA 3- ARTICULAÇÃO DE JOELHO SAUDÁVEL (A) E ARTICULAÇÃO DE INDIVÍDUO COM OSTEOARTRITE DE JOELHO (B). Nota: a figura B representa uma articulação com cartilagem desgastada e hipertrofia óssea (formação de osteófito)

FONTE: Adaptado de ADAM®

A cartilagem articular é um tecido avascularizado, com alto teor hídrico (66 a 80% de água), constituído por fibras de colágeno tipo II, proteoglicanos e glicosaminoglicanos ligados ao ácido hialurônico, além de uma linhagem celular denominada condrócito. No tecido adulto normal, há um equilíbrio entre a formação e a degradação dos componentes da matriz cartilaginosa, cujo processo é controlado por fatores de crescimento e citocinas. (UCHOA, 2000). Fatores de crescimento como IGF-1 e TGF- β são responsáveis pela síntese de proteoglicanos e colágeno, enquanto que a IL-1, IL-6 e TNF- α estimulam a degradação da matriz cartilaginosa. A IL-1 é considerada o primeiro agente que atua na degradação da matriz, uma vez que estimula a síntese e a secreção de várias enzimas que degradam a cartilagem, como metaloproteinases, além de inibir a síntese da matriz extracelular. Ainda, a IL-1 leva à produção de prostaglandina E2 (PGE2) pelos sinoviócitos que resulta em dor e inflamação (UCHOA, 2000).

2.2.TERAPIA MEDICAMENTOSA DA OSTEOARTRITE

Embora não haja cura medicamentosa para a osteoartrite, o tratamento da doença com analgésicos e anti-inflamatórios pode reduzir consideravelmente a dor e manter ou até melhorar os movimentos das articulações comprometidas (ACR, 2000). A terapia medicamentosa dos pacientes com osteoartrite é tema de muita discussão, uma vez que estes indivíduos fazem uso do medicamento prescrito por um longo período de tempo, provocando diversos efeitos colaterais (COIMBRA, 2002; LEDERMAN, 1997)

A maioria dos pacientes inicia o tratamento analgésico com acetaminofeno, cujas doses podem ser ajustadas com a progressão da doença. Em 1995, o Colégio Americano de Reumatologia propôs um algoritmo para o tratamento dos pacientes com osteoartrite (FIGURA 4). Em 2000, este algoritmo foi atualizado, tendo um perfil mais condizente com a prática médica (ACR, 2000). De acordo com este protocolo, os pacientes devem iniciar a terapia medicamentosa com acetaminofeno, cujas doses e posologia variam de acordo com cada paciente.

Outra classe de medicamentos são os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINE) seletivos para COX-2. Estes costumam ser bastante eficazes, mas apresentam efeitos cardiovasculares graves quando utilizados a longo prazo (RAY, 2002). Também utiliza-se anti-inflamatórios não-esteroidais (AINE) associados a misoprostol ou a algum medicamento inibidor da bomba de prótons, uma vez que os AINE costumam produzir sérios problemas gastrointestinais como sangramento, gastrite e úlcera (BJARNASON, 1986; LAPORTE, 1991).

Ainda, outras alternativas para o tratamento têm sido sugeridas, como a utilização de medicamentos opióides. Dentre estes, os mais utilizados são o tramadol e a codeína, sendo bastante prescritos para pacientes que não respondem aos AINE ou que não podem utilizá-los devido a co-morbidades associadas, como hipertensão, problemas cardíacos, gastrite, úlcera etc.

Em associação aos medicamentos prescritos acima, os pacientes com osteoartrite podem ainda fazer uso de medicamentos tópicos, como a capsaicina e diclofenaco. São alternativas interessantes uma vez que podem aliviar a dor e evitar que os pacientes aumentem a dose dos medicamentos

administrados por via oral, diminuindo as chances de efeitos colaterais indesejáveis.

Através dos algoritmos, protocolos e literatura científica, nota-se que existe uma dificuldade no tratamento dos pacientes que sofrem de dores e comprometimento articular ocasionados pela osteoartrite. Por serem pessoas acometidas de idade avançada e apresentarem co-morbididades agravadas pela restrita variedade de analgésicos disponíveis, faz-se necessário o estudo de novos fármacos de eficácia semelhante aos analgésicos existentes que possam ser utilizados com segurança por estes pacientes, ou seja, como o mínimo possível de efeitos colaterais.

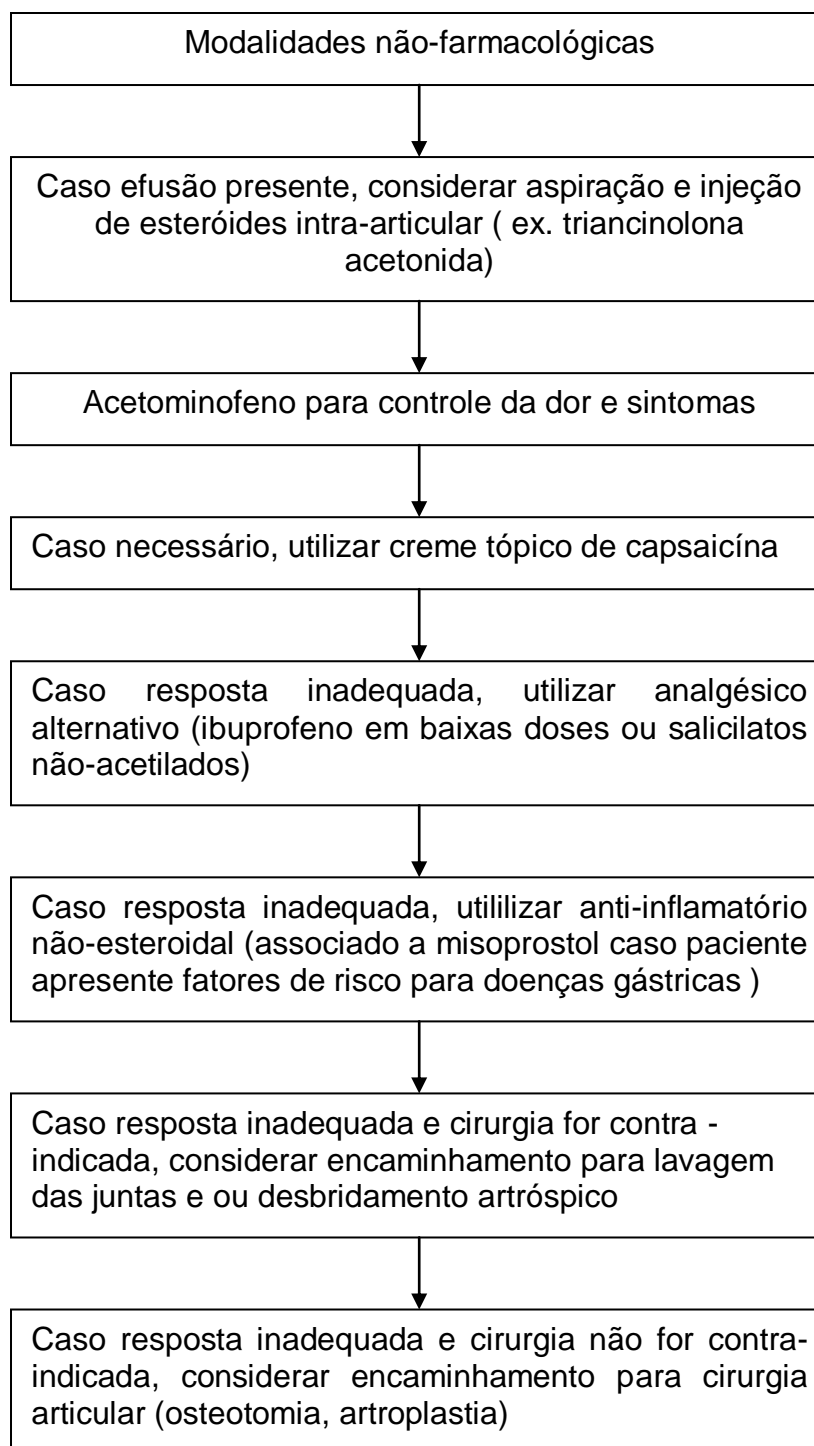


FIGURA 4- PROTOCOLO DE TRATAMENTO PARA PACIENTES COM OSTEOARTRITE, ESTABELECIDO PELO COLÉGIO AMERICANO DE REUMATOLOGIA EM 1995.

FONTE: Adaptado de Journal of the American College of Rheumatology, Vol.38, Nº11, Novembro, 1995.

2.3. CONTEXTO DE FITOTERÁPICOS NO BRASIL

Atualmente, os fitoterápicos constituem importante fonte de inovação em saúde, sendo objeto de interesses empresariais privados e fator de competitividade do Complexo Produtivo da Saúde. Esse contexto impõe a necessidade de uma ação transversal voltada ao fortalecimento da base produtiva e de inovação local e à competitividade da indústria nacional.

No Brasil, estima-se que 25% dos US\$ 8 bilhões do faturamento da indústria farmacêutica, no ano de 1996, foram originados de medicamentos derivados de plantas (CALIXTO, 2001).

Apesar da nossa extensa e exuberante flora brasileira, a maior parte dos fitomedicamentos consumidos no Brasil são produzidos em outros países. Isso acontece pois apesar de as empresas farmacêuticas brasileiras possuírem capacitação tecnológica suficiente para produção de fitoterápicos, ainda somos deficientes em investimento na área de pesquisa e desenvolvimento capaz de gerar inovações de forma contínua. Esta condição poderia ser revertida com a parceria entre empresa privada e universidades (KLEIN, 2009).

O relatório da Associação da Indústria Farmacêutica de Pesquisa (InterFarma) comprova que não só há pouco incentivo acadêmico na área de pesquisa por produtos inovadores, como uma dificuldade burocrática extensa na produção de patentes brasileiras. Grande parte dos depósitos de patentes enfrentam uma longa lista de espera devido ao baixo contingente de funcionários especializados na correção de patentes do INPI. Além disso, uma pesquisa de Ibope de 2009 realizada pela Federação das Indústrias do Estado de São Paulo relatou que a maioria dos parlamentares brasileiros não considera o fator da propriedade intelectual como fundamental para o

desenvolvimento brasileiro (Interfarma, 2010). Com a falta de apoio governamental e incentivo à pesquisa, o Brasil acaba sofrendo as consequências da negligência do Estado e paga mais caro para obter um medicamento à base de plantas disponíveis na nossa própria flora.

2.4. *Persea americana* Mill. LAURACEAE

Conhecida popularmente como abacate, a *Persea americana* pertence à família Lauraceae e é nativa da América Central (México, Guatemala, Honduras). A árvore de *Persea americana* mede de 10 a 15 metros, possui córtex aromático e caule lenhoso. Suas folhas são lisas, ceriáceas, de cor verde escura, formato oval-oblongas, de margens inteiras, mais ou menos onduladas (CARVAJAL, 2006; FARM. BRAS., 2010, Vol II).

A origem do nome abacate vem de “*ahuacatl*”, que significa testículo, devido ao formato de suas sementes. Os povos mesoamericanos acreditavam que o consumo do fruto de *Persea americana* aumenta a fertilidade masculina (CARVAJAL, 2006).

O abacate fez parte da dieta dos povos da América Central na época pré-hispânica devido a sua riqueza nutricional e até hoje é utilizado por estes povos para o preparo do famoso “guacamole” (CARVAJAL, 2006). É bastante conhecido pelas propriedades nutricionais dos seus frutos, ricos em proteína e gordura, contendo ainda fósforo que auxilia na formação de ossos e dentes e evita a fadiga mental.

Outra utilização desta planta é na medicina popular. O uso de plantas medicinais é uma prática secular, baseada em conhecimentos populares e

transmitida por diversas gerações. O extrato das sementes do abacate (*Persea americana*) é indicado popularmente para tratar algumas enfermidades como úlcera, gota, artrite (ALONSO,2004).

Para utilização de *Persea americana* no tratamento da dor crônica em casos de artrite recomenda-se o preparo caseiro do extrato etanólico da semente. Utiliza-se também as folhas do abacateiro para curar afecções da boca, estomatite e ânsia. A semente é moída é usada para tratar disenterias e problemas renais (ALONSO, 2004).

Já existem estudos sobre a correlação entre a fração aquosa das folhas de *Persea americana* e atividade anti-edema, sendo esta evidenciada através de testes como da carragenina, teste da formalina, dentre outros (ADEYEMI, 2002).

Estudos químicos realizados com as sementes de abacate identificaram diversas classes de produtos naturais como fitosteróis, triterpenos (WERMANN, MOKADY et al., 1990; LOZANO, DHUIQUE MAYER et al.,1993), ácidos graxos com ligações eloifínicas e acetilênicas (Kashman, Neeman et al., 1969), ácidos furanóicos (FARINES, SOULIER et al., 1995), dímeros de flavonoides e proantocianidinas oligoméricas (VALERI E GIMENO, 1953; GEISSMAN E DITTMAR, 1965; THOMPSON, JACQUES et al., 1972). Mais recentemente, foram isolados dois ácidos abscísicos glucosilados (substâncias 1 e 2 – Figura 5), com estrutura sesquiterpênica (RAMOS, JERZ et al., 2004).

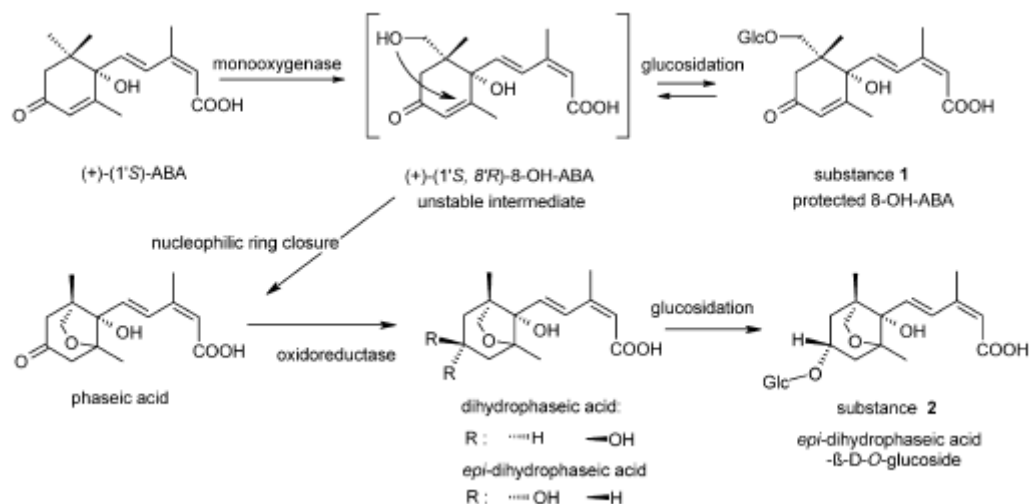


FIGURA 5- ÁCIDOS ABCÍSCICOS GLUCOSILADOS ISOLADOS DAS SEMENTES DE *Persea americana*. (RAMOS, JERZ *et al.*, 2004)

Embora diversas classes de compostos tenham sido encontradas na espécie, nenhum trabalho justifica suas atividades biológicas e usos pela população. Em etapas futuras do projeto, o estudo químico de frações ativas poderá contribuir para a elucidação das suas atividades.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL BOTÂNICO

Os frutos de *Persea americana* foram coletados no campus Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná em julho de 2011 e 2012 (FOTOGRAFIA 1). O material foi identificado pelo MsC. Fabrício Schmidt Meyer do Departamento de Botânica da UFPR em 2010 e um exemplar da mesma espécie está catalogado no herbário deste departamento, sob o número UPCB 70.014.

A parte utilizada para o estudo é a semente (caroço) da planta, sendo esta retirada do abacate e desidratada em estufa a 35°C por 48h. As sementes secas foram pulverizadas utilizando-se um moinho de facas para obtenção da forma mais cominuída possível (FOTOGRAFIA 2).



FOTOGRAFIA 1- COLETA DOS FRUTOS DE *Persea americana* (Mill.) NO *campus* CENTRO POLITÉCNICO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (AV. CEL. FRANCISCO H. DOS SANTOS, 210- CURITIBA/PR).

FONTE: o autor.

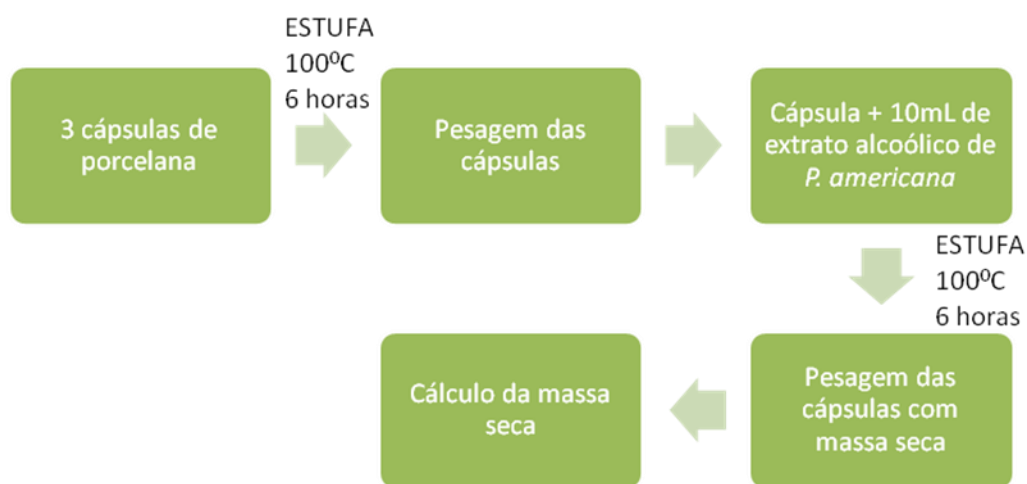


FOTOGRAFIA 2- FRUTOS DE *Persea americana* (Mill.) COLETADOS NO *campus* CENTRO POLITÉCNICO DA UFPR (A). SEMENTES DE *Persea americana* (Mill.) in natura (B). SECAGEM DAS SEMENTES MOÍDAS DE *Persea americana* (Mill) EM ESTUFA A 35 °C .

FONTE: o autor

3.2.PREPARO DOS EXTRATOS DE *Persea americana* (Mill.)

A metodologia utilizada para obtenção do extrato foi basicamente por maceração. Nesta, algumas variações foram empregadas para obtenção do extrato com maior desempenho da ação farmacológica desejada e menos tóxico. Estas variáveis incluíram: utilização de diferentes solventes durante a extração, variação no tempo de duração da maceração, utilização de ultra-som (sonicador), agitação periódica dos extratos, dentre outros fatores. Para avaliar a condição ideal na obtenção do melhor extrato, foram realizadas análises cromatográficas e de doseamento de massa seca. O cálculo de massa seca foi realizado conforme descrito na Farmacopéia Brasileira (Farm. Bras. 5ª Ed., Vol II, 2010) (ESQUEMA 1).



ESQUEMA 1- PROCEDIMENTO PARA CÁLCULO DE MASSA SECA BASEADO NA FARMACOPÉIA BRASILEIRA (Farm. Bras., 5ª Ed., Vol II)

FONTE: o autor

3.2.1. Uso de sonicador (ultra-som) durante maceração

O princípio do aparelho baseia-se na emissão de ondas sonoras que, quando em contato com o líquido processado, gera vibrações mecânicas. O aparelho de ultra-som (sonicador) tem uma ampla utilização no laboratório, podendo ser empregado quando deseja-se acelerar o tempo de extração, provocar reações químicas na amostra, formar nanoemulsões etc.

Neste caso, o sonicador foi utilizado a fim de verificar se é possível diminuir o tempo de maceração do extrato obtendo um mesmo rendimento com relação à massa seca ou se algum outro componente possa vir a ser extraído com o uso deste aparelho, ou seja, se há alguma variação quantitativa e qualitativa durante a extração.

.

3.2.2. Utilização de diferentes solventes

Um estudo envolvendo caroço de *Persea americana* avaliou o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos extratos utilizando acetato de etila, metanol:água (7:3) e acetona:água (7:3) como solventes extratores durante processo macerativo (JAVIER, 2011). Para comparar os extratos já descritos na literatura com os do presente estudo, as mesmas condições experimentais foram reproduzidas e avaliadas por cromatografia em camada delgada (CCD).

3.2.3. Preparo do Extrato Alcoólico Bruto das sementes de *Persea americana* (Mill.)

A maceração foi realizada adicionando-se 700g do caroço de *Persea americana* em pó em 1,5 litros de álcool etílico. A mistura foi mantida por 72h, agitando-se periodicamente. Após este período, o extrato foi filtrado e quantificado em relação ao teor de massa seca, conforme descrito na Farmacopéia Brasileira.

Em seguida, o extrato foi submetido à evaporação do álcool etílico em rotaevaporador à uma temperatura de 35⁰C e pressão reduzida, seguido de liofilização. Após este procedimento, calculou-se novamente o teor de massa seca, uma vez que o liofilizado não obteve uma consistência seca, mas oleosa (FOTOGRAFIA 3).



FOTOGRAFIA 3- EXTRATO BRUTO DAS SEMENTES DE *Persea americana* (Mill.) APÓS RETIRADA DO SOLVENTE EXTRATOR (ÁLCOOL ETÍLICO ABSOLUTO) E POSTERIOR LIOFILIZAÇÃO. Nota: O extrato adquire uma consistência dura e com aspecto de cera, diferentemente de outros extratos que após processo de liofilização encontram-se na forma de pó.

FONTE: o autor

3.3. ANIMAIS

Para o ensaio de edema de pata induzido por carragenina foram utilizados camundongos da linhagem SWISS, machos, pesando entre 25-35g, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram transferidos para a sala de experimentação uma hora antes do ensaio para adaptação e mantidos em condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e umidade durante todo o experimento.

3.4. DROGAS E REAGENTES

As drogas e reagentes utilizados nos experimentos e ensaios do projeto encontram-se na TABELA 1.

TABELA 1- DROGAS E REAGENTES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS

PRODUTO	MARCA DO FABRICANTE	PROCEDÊNCIA
Xilazina 2%	Syntec®	Hortolândia/SP- Brasil
Quetamina 10g/100mL	Vetnil®	Louveira/SP- Brasil
Carragenina	Sigma Aldrich® Co.	Steinheim- Alemanha
Diclofenaco DEA 10mg/g	Medley®	Campinas/SP- Brasil
Óleo mineral	Farmácia Bula Verde®	Curitiba/PR- Brasil
Álcool Etílico	Proquímios®	Rio de Janeiro/RJ- Brasil

FONTE: o autor

3.5. ENSAIOS BIOLÓGICOS

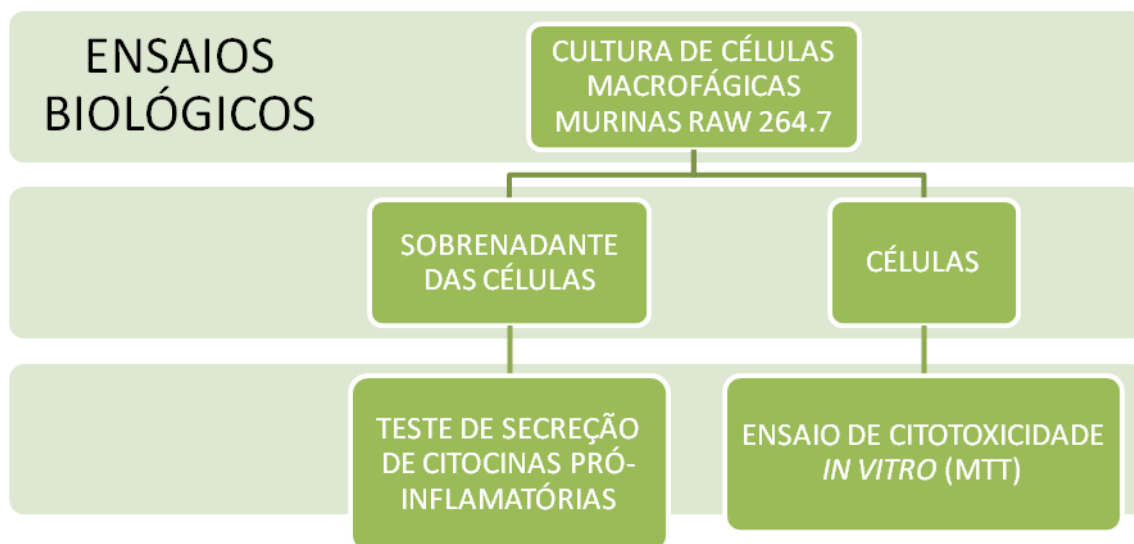
3.5.1. Citotoxicidade *in vitro* – redução do sal de tetrazólio (MTT)

O ensaio de citotoxicidade utilizado para este experimento foi baseado na metodologia descrita por Mosmann, 1983. O método consiste em medir indiretamente a viabilidade celular através da atividade enzimática mitocondrial das células vivas. Quando as células estão vivas, as desidrogenases mitocondriais são capazes de agir sobre substratos como o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolium, levando à quebra desta molécula e à sua redução, formando assim o azul de formazan. Quanto maior o número de células viáveis na amostra, mais azul de formazan é formado. A leitura da quantidade de azul de formazan formado é feita através de um espectrofotômetro utilizando filtro de interferência de 540nm.

Para este ensaio, o extrato liofilizado de *Persea americana* foi diluído em DMSO nas concentrações 0,1µg/mL e 1 µg/mL.

As células da linhagem RAW 264.7 (10^6 células) foram utilizadas para este experimento e plaqueadas em placas de 96 poços, mantidas em incubadora de CO₂ “*overnight*”. Em seguida, as células foram tratadas com o extrato de *Persea americana* nas concentrações de 0,1µg/mL e 1 µg/mL por 24h e 48h. Três horas antes de completar o tempo de tratamento as células do grupo controle positivo foram submetidas a 100 µl de saponina 0,01%, e todas as células foram expostas a 20 µl de solução de MTT (5mg/ml). As placas foram lidas em leitora de microplaca a 550 nm.

O sobrenadante destas culturas foi utilizado para quantificação de citocinas pró-inflamatórias, como descrito a seguir.



ESQUEMA 2- ILUSTRAÇÃO DOS MATERIAIS BIOLÓGICOS UTILZADOS PARA O ENSAIO DE SECREÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E CITOTOXICIDADE *IN VITRO* (MTT)

3.5.2. Liberação de citocinas pró-inflamatórias no sobrenadante de células macrofágicas (RAW 264.7)

A secreção das citocinas IL-6, IL-10, MCP-1, Interferon- γ (IFN- γ), Fator de necrose tumoral (TNF) e IL-12p70 foi avaliada no sobrenadante das mesmas células RAW 264.7 utilizadas no ensaio de citotoxicidade, as quais foram tratadas com o extrato bruto das sementes de *Persea americana* nas concentrações 0,1 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$.

Para a quantificação das citocinas, utilizou-se o Kit BD CYTOMETRIC BEAD ARRAY (CBA) MOUSE INFLAMMATION KIT (BD Biosciences®- San Diego/CA- EUA) o qual detecta simultaneamente, quantitativamente e qualitativamente as seguintes citocinas: Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10

(IL-10), Interleucina-12p70 (IL-12p70), Proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α).

A detecção das citocinas é semelhante ao método imunoenzimático ELISA sanduíche (LUTTMANN, 2006). Para isso são utilizadas pequenas esferas de captura (beads) que estão conjugadas com anticorpos específicos para as citocinas em questão. Quando estas esferas entram em contato com a amostra analisada, forma-se um complexo esfera-analito-reagente de detecção (FIGURA 6) que emite um sinal fluorescente numa intensidade proporcional à concentração do analito presente. Este complexo pode ser detectado por citometria de fluxo, permitindo uma análise qualitativa e quantitativa da amostra em relação à presença e concentração das citocinas mencionadas.

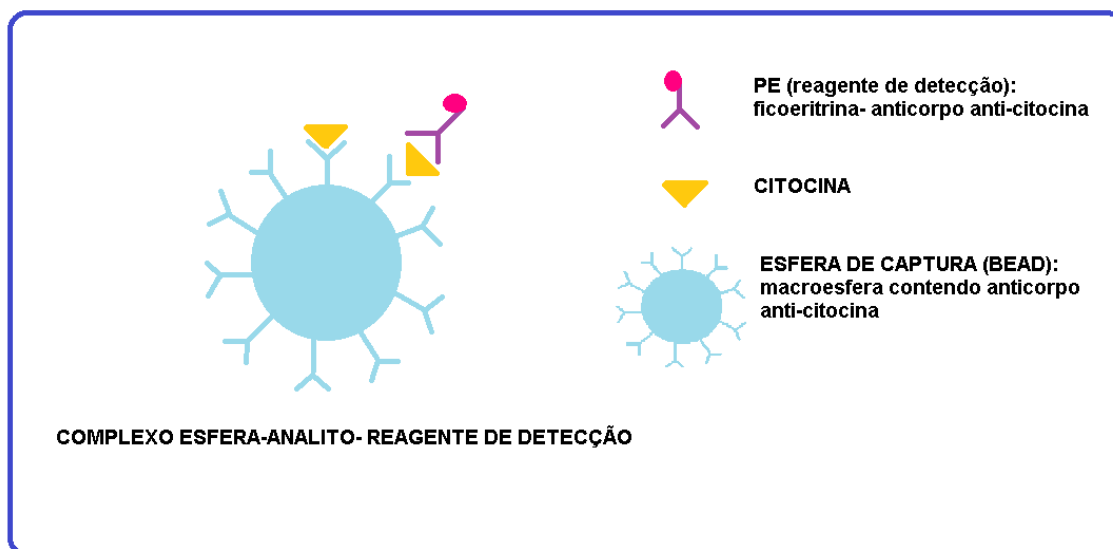


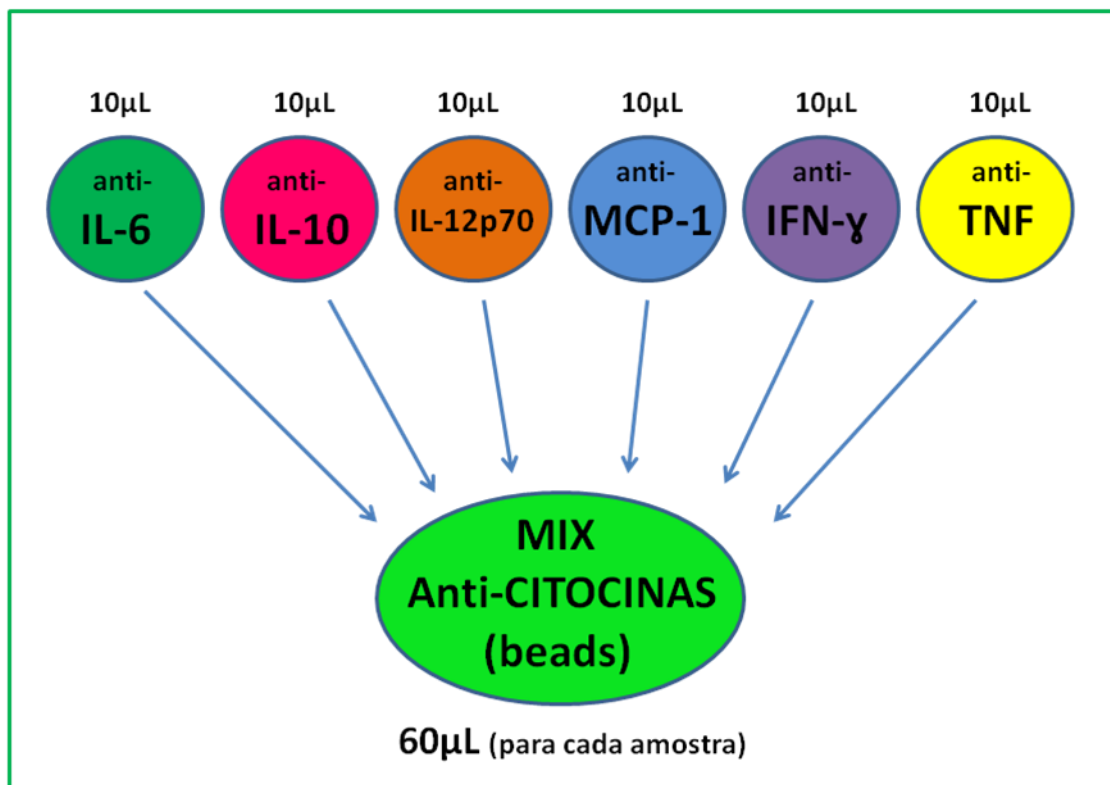
FIGURA 6- ILUSTRAÇÃO DO PRINCÍPIO DO TESTE DO KIT BD CYTOMETRIC BEAD ARRAY (CBÁ) MOUSE INFLAMMATION KIT® DEMONSTRANDO A FORMAÇÃO DO COMPLEXO ESFERA-ANALITO-REAGENTE DE DETECÇÃO NO SOBRENADANTE DAS CÉLULAS ANALISADAS (RAW 264.7)

FONTE: o autor

No teste, preparou-se um mix com todas as citocinas a serem analisadas (ESQUEMA 2) e a estas foram adicionadas um anticorpo anti-citocina marcado com ficoeritrina, fornecido pelo fabricante (PE-Detection Reagent). Este emite um sinal fluorescente detectável pelo citômetro de fluxo na mesma proporção da concentração da citocina à que este reagente encontra-se ligado. Após a adição do reagente de detecção, acrescentam-se os sobrenadantes das células RAW 264.7.

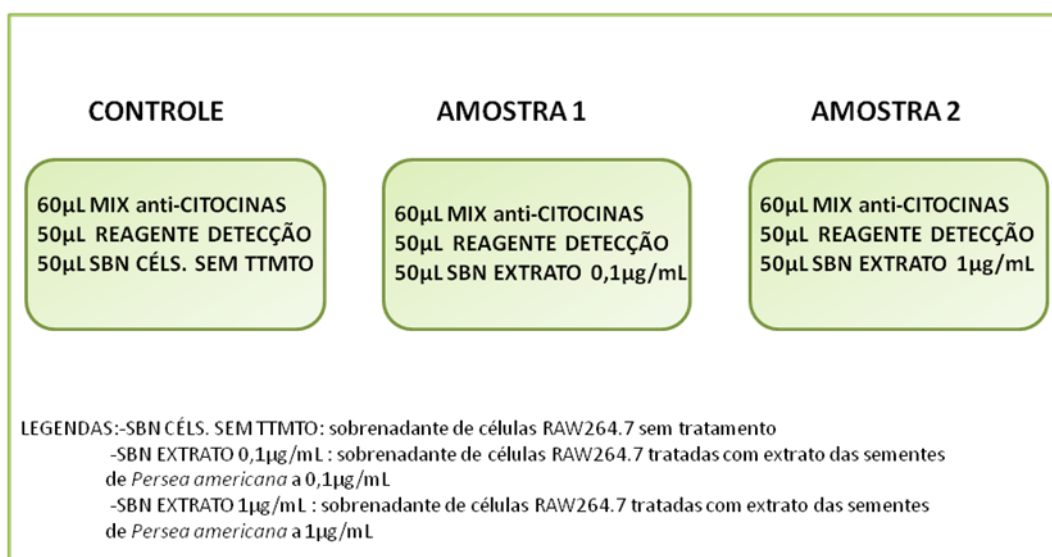
Em cada tubo de análise foi adicionado 10 μ L de cada solução das citocinas (6 citocinas diferentes = 60 μ L em cada tubo), 50 μ L de reagente de detecção e 50 μ L de cada amostra do sobrenadante das células RAW 264.7 utilizadas no ensaio de citotoxicidade (ESQUEMA 3).

Portanto, neste ensaio, os sobrenadantes referem-se às culturas de células RAW 264.7 que haviam sido tratadas com o extrato bruto de *Persea americana* nas concentrações 0.1 μ g/mL e 1.0 μ g /mL. O teste foi feito em duplicata.



ESQUEMA 3- ESQUEMA DE PREPARO DO MIX DE ESFERAS DE CAPTURA DE CITOCINAS (BEADS) UTILIZADO PARA ANÁLISE DO SOBRENADANTE DE CÉLULAS RAW 264.7. Nota: uma vez que foram analisados 8 tubos diferentes, preparou-se 480µL do mix de citocinas (8 tubos x 60µL).

FONTE: o autor



ESQUEMA 3- ESQUEMA ILUSTRATIVO DO TESTE DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS UTILIZANDO KIT BD CYTOMETRIC BEAD ARRAY (CBA) MOUSE INFLAMMATION® (SIGMA® Co.)

FONTE: o autor

3.5.3. ENSAIO DO EDEMA DE PATA DE CAMUNDONGOS INDUZIDO POR CARRAGENINA

Com a finalidade de avaliar a atividade anti-inflamatória das amostras dos extratos das sementes de *Persea americana*, um dos modelos utilizados foi o ensaio do edema de pata induzido por carragenina, utilizando camundongos SWISS machos. Este ensaio consiste em induzir um edema local (FIGURA Z) após aplicação de um agente flogístico que, no caso da carragenina, promove recrutamento de células leucocitárias cuja tentativa de fagocitose da carragenina acarreta em edema (VINEGAR, 1976).



FIGURA 7- EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA (PATA DIREITA). (VARALAKSHMI, 2012)

Para o ensaio farmacológico, as amostras de *Persea americana* foram aplicadas topicamente na pata de camundongos, massageando-as e, em seguida, aplicou-se injeção subplantar de 0,1mL de carragenina 1% em uma das patas posteriores, induzindo à inflamação. A aplicação de solução de NaCl 0,9% foi utilizada na pata contra-lateral como controle. Após 30 min da aplicação do agente flogístico fez-se a leitura da espessura das patas com auxílio de um micrômetro digital nos tempos de uma, duas, três e quatro horas. As concentrações do extrato de *Persea americana* utilizadas foram de 50% (diluído em óleo mineral) e 100%.



FIGURA 8- MICRÔMETRO DIGITAL UTILIZADO PARA MEDIR A ESPESSURA DA PATA DE ANIMAIS EXPERIMENTALMENTE.

FONTE: Grupo NSA. (Acesso em 2011)

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão das médias. As diferenças entre as médias foram determinadas através da análise de variância (ANOVA), seguida do teste post-hoc de Tukey. Para determinação dos resultados, foi utilizado o programa estatístico “R” e os dados foram obtidos com a colaboração do Prof. MsC Walmes Marques Zeviani, do Departamento de Estatística da Universidade Federal do Paraná.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES SOLVENTES

Estudos já realizados com os diferentes extratos de *Persea americana* demonstraram bons resultados para as atividades antioxidante, antimicrobiana e teor de compostos fenólicos utilizando acetato de etila, acetona:água (7:3) e metanol:água (7:3) como solventes durante a extração (JAVIER, 2011). Reproduzindo as condições descritas, os extratos em questão não demonstraram diferença qualitativa nas frações apolares em relação ao extrato etanólico de *Persea americana*, conforme apresenta a CCD abaixo.



FOTOGRAFIA 5- CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS EXTRATOS DE *Persea americana* UTILIZANDO COMO SOLVENTES: ETANOL (A), ACETONA:ÁGUA (7:3)(B), ACETATO DE ETILA (C) E METANOL:ÁGUA (7:3) (D).FASE MÓVEL: CLOROFÓRMIO:TOLUENO:METANOL (7:2:1). FASE ESTACIONÁRIA: SÍLICA.

FONTE: o autor

Portanto, os resultados obtidos demonstram que o extrato etanólico possui um padrão qualitativo apolar similar aos demais extratos obtidos com solventes que possuem atividades antioxidante e antimicrobiana comprovadas. Entretanto, sua escolha como solvente extrator se justifica devido à sua menor toxicidade e volatilidade quando comparado a solventes como metanol e acetona.

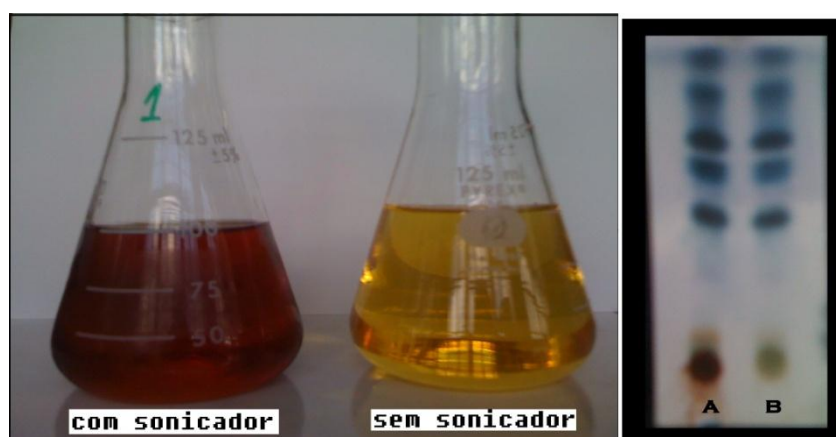
5.2.UTILIZAÇÃO DE ULTRA-SOM DURANTE MACERAÇÃO

Em relação às diferentes condições experimentais (uso de diferentes solventes, ultra-som) no processo de maceração testadas para os extratos, a utilização de ultra-som no processo de maceração demonstrou uma alteração na coloração dos extratos obtidos (FOTOGRAFIA 6). A análise química das duas frações testadas (com sonicador e sem sonicador) foi feita por cromatografia em camada delgada (CCD), e obtenção de massa seca. Aparentemente não houve alteração qualitativa nos cromatogramas (FOTOGRAFIA 6), mas uma leve diferença no conteúdo de massa seca entre as suas amostras (TABELA 4), sugerindo que a alteração de cor pode ser oriunda de alguma reação não detectável nas condições propostas pelo cromatograma utilizado, uma vez que neste avaliou-se apenas substâncias apolares.

TABELA 2- CÁLCULO DA MASSA SECA DOS EXTRATOS DE *Persea americana* OBTIDOS COM O USO DE SONICADOR E NA AUSÊNCIA DESTE

EXTRATO DE <i>Persea americana</i>	MASSA SECA
Com ultra-som	36 g/L
Sem ultra-som	33,5 g/L

FONTE: o autor



FOTOGRAFIA 5- EXTRATOS DE *Persea americana* (Mill.) OBTIDOS POR MACERAÇÃO COM E SEM SONICADOR. Nota: à direita, cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos feitos com ultra-som (A) e sem ultra-som (B). Fase móvel: clorofórmio:tolueno:metanol (7:2:1). Fase estacionária: sílica.
FONTE: o autor

As análises obtidas permitem concluir que as melhores condições experimentais utilizadas na metodologia para obtenção do extrato das sementes de *Persea americana* envolvem a utilização do álcool etílico durante o processo de maceração, não havendo necessidade do uso de ultra-som para otimizar o processo, uma vez que este não traz vantagens qualitativas ou quantitativas.

4.3. CÁLCULO DA MASSA SECA DO EXTRATO DAS SEMENTES DE *Persea americana* (Mill.)

O cálculo da massa seca do extrato das sementes de *Persea americana* foi obtido pela pesagem inicial das cápsulas após estas permanecerem 4 h em estufa a 100°C. Em seguida, adicionou-se 10 mL do extrato bruto em cada uma das cápsulas, mantendo-as novamente em estufa a 100°C por 4 horas.

Após este período, fez-se a pesagem das cápsulas com o extrato bruto agora seco, obtendo os resultados conforme TABELA 5.

TABELA 3- MASSA (em gramas) DAS CÁPSULAS DE PORCELANA E EXTRATO ETANÓLICO DE PERSEA AMERICANA PARA OBTENÇÃO DA MASSA SECA DO EXTRATO BRUTO

CÁPSULA (g)	CÁPSULA + 10mL DE EXTRATO ETANÓLICO (g)	MASSA SECA CALCULADA (g)
52.8872	53.2320	0.3448
67.4003	67.7571	0.3568
46.4488	46.7966	0.3478
		Média = 0.3498

FONTE: o autor

4. 4. CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Persea americana*- RENDIMENTO EM MASSA SECA

O cálculo da concentração do extrato etanólico bruto foi feito com os dados obtidos no experimento para determinação do teor de massa seca conforme Farmacopéia Brasileira, 5 Edicao. A concentração de massa seca obtida no extrato etanólico das sementes de *Persea americana* foi de aproximadamente 35 g/L.

O procedimento do cálculo foi feito conforme descrito a seguir:

MASSA SECA CALCULADA (MÉDIA)= 0.3478
VOLUME= 10mL

Concentração (C) = $\frac{\text{massa (g)}}{\text{Volume (L)}}$

$$C = \frac{0.3498}{0.01} = \boxed{34.98 \text{ g/L}}$$

4.5. TEOR DE MASSA SECA DO EXTRATO LIOFILIZADO DE *Persea americana* Mill.

Após a retirada do solvente etanólico, o extrato bruto foi submetido à liofilização para obtenção da forma pulverizada, facilitando sua manipulação e determinação de doses mais precisas para os ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*.

Contudo, mesmo após liofilização, o extrato não obtém a forma de pó devido ao aspecto dos seus constituintes químicos (FOTOGRAFIA 3).

Assim, foi necessária uma nova determinação de massa seca do extrato liofilizado para que se quantificasse o volume deste a ser utilizado nos ensaios biológicos e, desta forma, obter um valor mais exato da dose do extrato de *Persea americana* utilizada durante os experimentos.

TABELA 4- TEOR DE MASSA SECA NO EXTRATO DE *Persea americana* APÓS LIOFILIZAÇÃO

AMOSTRA	MASSA ou VOLUME
EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE <i>Persea Americana</i>	10 mL
EXTRATO BRUTO DE <i>Persea americana</i> APÓS EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE EM ROTA EVAPORADOR	0.3478 g (100%)
EXTRATO BRUTO DE <i>Persea americana</i> LIOFILIZADO	0.2624 g (75%)

FONTE: o autor

4.6. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DE REDUÇÃO DO SAL DE TETRAZÓLIO (MTT)

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade pela redução do MTT (TABELA 7; GRÁFICO 1) demonstraram que o extrato bruto de *Persea americana* não apresentou toxicidade ($p > 0.05$) nos tempos de tratamento (24h e 48h) para as células da linhagem RAW 264.7 nas concentrações de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$, quando comparado ao grupo controle negativo e ao grupo controle positivo (saponina). A TABELA 8 demonstra as comparações inter-grupos e fornece as diferenças estatisticamente significativas entre eles, comprovando que a viabilidade celular se manteve quando as células macrofágicas murinas foram tratadas com os extratos das sementes de *Persea americana* Mill. nas concentrações descritas (0.1 $\mu\text{g/mL}$ e 1.0 $\mu\text{g/mL}$).

TABELA 5- VIABILIDADE CELULAR EM ABS/10⁶ CÉLULAS DOS GRUPOS SAPONINA, CONTROLE, EXTRATO 0, 1 µg/mL E EXTRATO 1 µg/mL EM DIFERENTES TEMPOS (24h e 48h) DURANTE ENSAIO DE CITOTOXICIDADE AVALIADO PELA REDUÇÃO DO SAL DE TRETRAZÓLIO (MTT).

GRUPOS	TEMPO (horas)	CONCENTRAÇÃO (ABS/10 ⁶ CÉLS)
SAPONINA	24	39.08 ± 1.39
CONTROLE	24	48.01 ± 2.45
EXTRATO 0.1 µg/mL	24	49.07 ± 2.26
EXTRATO 1 µg/mL	24	47.77 ± 3.05
SAPONINA	48	18.89 ± 2.13
CONTROLE	48	59.54 ± 10.72
EXTRATO 0.1 µg/mL	48	54.96 ± 8.01
EXTRATO 1 µg/mL	48	54.24 ± 9.20

FONTE: o autor

TABELA 6- COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS EXPERIMENTAIS DO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE IN VITRO (MTT) EM DIFERENTES TEMPOS (24h e 48h)- SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA ENTRES GRUPOS (VALOR DE p).

GRUPOS COMPARADOS	VALOR DE p	SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA
24 horas		
CONTROLE-SAPONINA	<0.001	diferença SIGNIFICATIVA
EXT. 0.1 µg/mL- SAPONINA	<0.001	diferença SIGNIFICATIVA
EXT. 1 µg/mL- SAPONINA	<0.001	diferença SIGNIFICATIVA
EXT. 0.1 µg/mL- CONTROLE	0.408	diferença NÃO SIGNIFICATIVA
EXT. 1 µg/mL- CONTROLE	0.984	diferença NÃO SIGNIFICATIVA
EXT. 0.1 µg/MI- EXT.1 µg/mL	0.230	diferença NÃO SIGNIFICATIVA
48 horas		
CONTROLE-SAPONINA	<0.001	diferença SIGNIFICATIVA
EXT. 0.1 µg/mL- SAPONINA	<0.001	diferença SIGNIFICATIVA
EXT. 1 µg/mL- SAPONINA	<0.001	diferença SIGNIFICATIVA
EXT. 0.1 µg/mL- CONTROLE	0.999	diferença NÃO SIGNIFICATIVA
EXT. 1 µg/mL- CONTROLE	0.996	diferença NÃO SIGNIFICATIVA
EXT. 0.1 µg/MI- EXT.1 µg/mL	0.993	diferença NÃO SIGNIFICATIVA

TESTE ESTATÍSTICO: ANÁLISE DE VARIÂNCIA DE UMA VIA (ANOVA ONE-WAY), INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95%; POST-HOC: TUKEY. SOFTWARE: R.

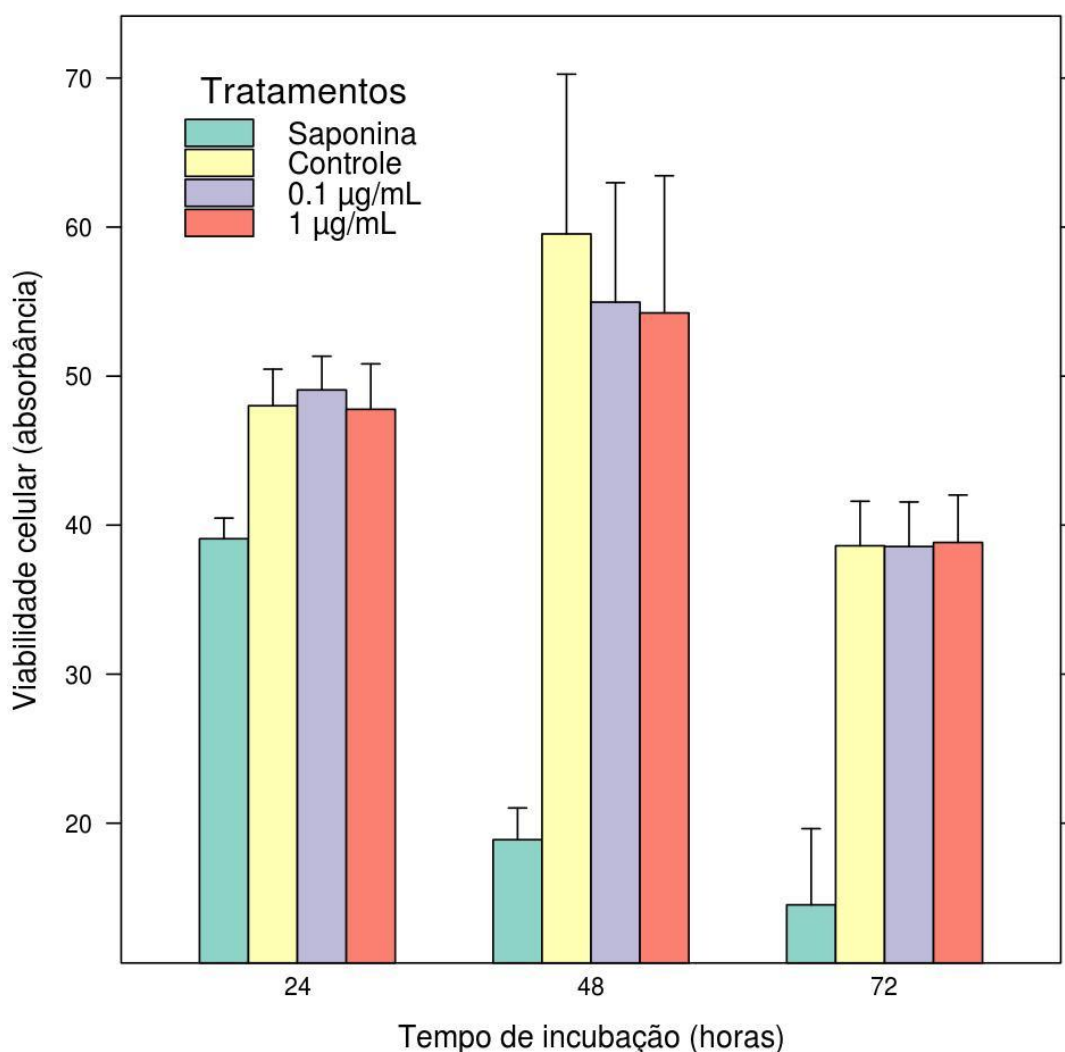


GRÁFICO 1- EFEITO CITOTÓXICO DOS EXTRATOS DAS SEMENTES DE *Persea americana* NAS CONCENTRAÇÕES 0.1 µg/mL E 1.0 µg/mL COMPARADOS AO GRUPO CONTROLE. Nota: Média e desvio padrão em ABS/10⁶ células.

FONTE: o autor

Créditos: Prof. MsC Walmes Marques Zeviani

Estes resultados traduzem uma possível utilização do extrato de abacate nestas concentrações (0.1µg/mL e 1.0 µg/mL) para futuros testes de triagem *in vitro*. Uma vez que o ensaio do MTT avalia a exposição direta na célula frente ao extrato analisado, este é um ensaio que permite avaliar, em muitos casos, a viabilidade tecidual (TUTIDA,2006). O teste do MTT é um dos indicadores colorimétricos de viabilidade celular mais utilizados e essencial para as fases

iniciais de desenvolvimento de drogas. Portanto, os dados obtidos fornecem uma orientação na dosagem e/ou concentração da droga para demais ensaios de atividade biológica envolvendo o extrato das sementes de *Persea americana*.

4.7. EFEITO IMUNOMODULADOR DO EXTRATO DE *Persea americana* NO ENSAIO DE SECREÇÃO DE CITOCINAS POR MACRÓFAGOS RAW 264.7

O ensaio de secreção de citocinas *in vitro* demonstrou que o extrato das sementes de *Persea americana* foi capaz de diminuir a concentração das citocinas MCP-1 e TNF presentes no sobrenadante de cultura de células macrofágicas murinas RAW 264.7 em relação ao controle.

O TNF- α é uma citocina envolvida tanto na resposta inflamatória sistêmica como nas reações de fase aguda, através da liberação de IL-1 e IL-6, sendo uma molécula chave no controle das alterações inflamatórias que ocorrem em doenças como a artrite.

Em comparação com o nível basal de TNF- α ($94,24 \pm 2,26$ pg/mL), tanto o extrato $0,1 \mu\text{g/g}$ ($7,15 \pm 1,60$ pg/mL) como o extrato $1 \mu\text{g/g}$ ($10,95 \pm 1,46$ pg/mL) demonstraram uma redução altamente significativa desta citocina (valor de $p < 0,05$). Considerando o papel relevante do TNF- α na regulação das células do sistema imunológico e seu efeito pró-inflamatório, os dados do presente estudo mostram-se bastante promissores na utilização do extrato como fitoterápico na osteoartrite. Existem diversos medicamentos utilizados atualmente na clínica reumatológica cujo mecanismo envolve a diminuição do TNF- α (FELDMAN,

2003). Uma vez que o extrato das sementes de *Persea americana* demonstrou uma diminuição desta citocina por células macrofágicas em cultura, espera-se que também haja uma resposta significativa quando aliado à terapia da osteoartrite na diminuição do TNF.

O TNF α está no cume da cascata inflamatória, mediando a ativação de linfócitos, estimulação da liberação de enzimas proteolíticas por macrófagos e secreção de outras citocinas inflamatórias incluindo a IL 6 e IL 13. Portanto, as citocinas têm um papel significante na perpetuação da reação inflamatória. Além disso, altos níveis de TNF- α são observados nas articulações de pacientes com AR, associados a outros fenômenos celulares característicos das lesões, tais como aumento da expressão de moléculas de adesão, da produção de quimiocinas e da diferenciação de osteoclastos (MARTIN; MEDEIROS; SCHAINBERG, 2006; LIU et al., 2008).

TABELA 7- CONCENTRAÇÃO DE TNF EM pg/mL NO SOBRENADANTE DE CÉLULAS RAW 264.7 SEM TRATAMENTO (CONTROLE) E TRATADAS COM EXTRATO DE *Persea americana* a 0,1 μ g/mL e 1 μ g/mL.

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DE TNF (pg/mL)
Controle	94,24 \pm 2,26
Extrato <i>Persea americana</i> 0,1 μ g/mL	7,15 \pm 1,60
Extrato <i>Persea americana</i> 1 μ g/mL	10,95 \pm 1,46

FONTE: o autor

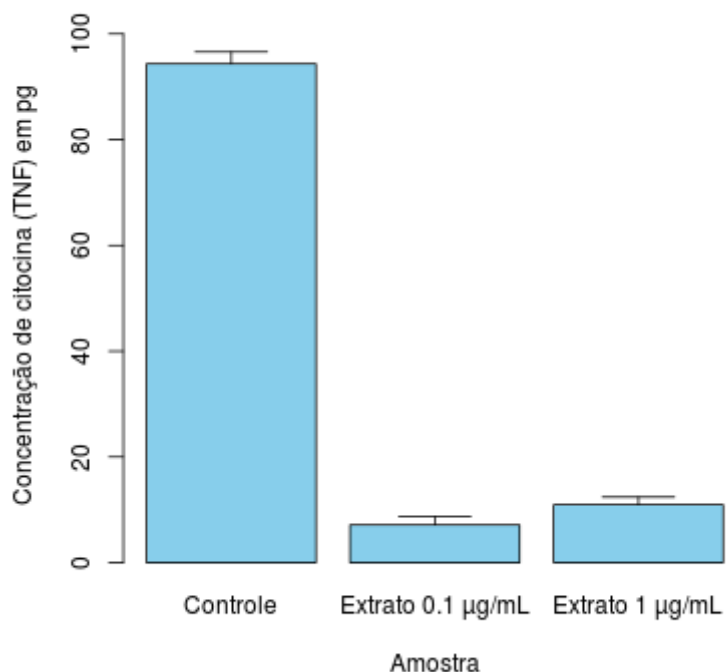


GRÁFICO 2- CONCENTRAÇÃO DA CITOCINA TNF EM pg/mL NO SOBRENADANTE DE CÉLULAS MACROFÁGICAS MURINAS (RAW 264.7) TRATADAS COM EXTRATO DAS SEMENTES DE *Persea americana* NAS CONCENTRAÇÕES 0,1µg/mL E 1µg/mL.

FONTE: o autor

Créditos: Prof MsC Walmes Marques Zeviani

Outra citocina que demonstrou-se significativamente diminuída ($p < 0,05$) na cultura de células macrofágicas RAW 264.7 foi a MCP-1 (TABELA 10 e GRÁFICO 3), chamada também de CCL2, uma citocina da classe das quimiocinas. A MCP-1 é uma citocina quimiotática que estimula a migração de monócitos e células T de memória durante a resposta inflamatória. Alguns estudos têm demonstrado que esta citocina encontra-se aumentada nas articulações de animais em modelo de artrite e a administração de um antagonista desta citocina diminuiu o inchaço e vermelhidão nas juntas inflamadas (GONG, 1997) (OGATA, 1997), o que sugere que drogas que agem

na diminuição de MCP-1 também podem ser utilizadas na terapia de doenças inflamatórias crônicas como a artrite.

TABELA 8- CONCENTRAÇÃO DE MCP-1 EM pg/mL NO SOBRENADANTE DE CÉLULAS RAW 264.7 SEM TRATAMENTO (CONTROLE) E TRATADAS COM EXTRATO DE *Persea americana* a 0,1µg/mL e 1µg/mL.

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DE MCP-1 (pg/mL)
Controle	297,15 ± 2,70
Extrato <i>Persea americana</i> 0,1µg/mL	ND
Extrato <i>Persea americana</i> 1µg/mL	60,25 ± 1,83

LEGENDA: ND- não detectável

FONTE: o autor

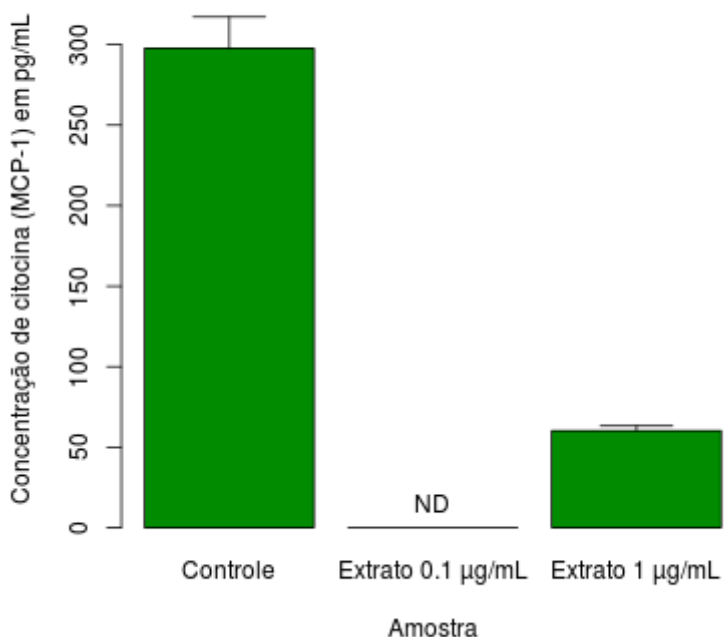


GRÁFICO 3- CONCENTRAÇÃO DA CITOCINA MCP-1 EM pg/mL NO SOBRENADANTE DE CÉLULAS MACROFÁGICAS MURINAS (RAW 264.7) TRATADAS COM EXTRATO DAS SEMENTES DE *Persea americana* NAS CONCENTRAÇÕES 0,1µg/mL E 1µg/mL.

FONTE: o autor

Créditos: Prof MsC Walmes Marques Zeviani

Uma vez que o extrato das sementes de *Persea americana* demonstrou uma redução significativa ($p < 0.05$) em duas citocinas chave no processo inflamatório da artrite, percebe-se a importância de investir na continuidade de estudos farmacológicos e farmacotécnicos para produção de um fitoterápico tópico a base desta planta.

4.8. ENSAIO DO EDEMA DE PATA DE CAMUNDONGO INDUZIDO POR CARRAGENINA

Um estudo encontrado acerca das sementes de abacate avaliou a capacidade antioxidante do extrato obtido por maceração, através do ensaio DPPH, que avalia a capacidade dos compostos antioxidantes presentes no extrato em capturar o radical DPPH (CARPENA, 2011). Porém as abordagens envolvendo a capacidade antiinflamatória do caroço de *Persea americana* não são encontradas na literatura.

Sabendo-se que o caroço de abacate pode apresentar uma atividade anti-inflamatória em camundongos e, ainda, que a parte vegetal da espécie em questão tende a ser resíduo do consumo da planta, o presente estudo apresenta vantagens não só farmacológicas, bem como econômicas e de sustentabilidade.

O GRÁFICO 4 demonstra o efeito dos extratos de *Persea americana*, em diferentes tempos e concentrações, no teste do edema de pata de camundongo induzido por carragenina. As concentrações dos extratos utilizadas foram de 10%, 50% e 100%.

Uma vez que a pomada de diclofenaco é indicada para dores relacionadas a processos inflamatórios e, de acordo com o Colégio Americano de Reumatologia, sua utilização é prescrita para pacientes com osteoartrite, fez-se uma comparação da pomada de diclofenaco dietilamônio (DEA) com o extrato bruto do caroço de *Persea americana* avaliando a diminuição do edema de pata de camundongo induzido por carragenina.

Os resultados demonstram que tanto o diclofenaco como os extratos brutos em diferentes concentrações produzem uma melhora no quadro do edema induzido pelo agente flogístico ($p < 0.05$).

O experimento envolvendo a concentração de extrato bruto a 10% não demonstrou diferença na atividade anti-edema com relação ao grupo óleo mineral (OM) + carragenina em experimento prévio (dados não demonstrados).

A tabela 12 demonstra uma comparação inter-grupos e permite avaliar se houve algum interferente na avaliação da redução do edema de pata durante o experimento. Percebe-se que o grupo óleo mineral + carragenina, criado para testar se o óleo mineral exerce alguma atividade antiinflamatória, demonstrou que existe diferença significativa ($p < 0.001$) em relação ao grupo óleo mineral + salina, indicando que o óleo mineral não é capaz de exercer efeito antiinflamatório.

Outra análise inter-grupo (TABELA 12) é a comparação entre os grupos extrato 100% + salina e OM + salina, a fim de avaliar se o extrato exerce alguma ação antiinflamatória quando da injeção de salina intraplantar ou até mesmo para avaliar se o extrato 100% possui alguma ação pró-inflamatória ou antiinflamatória quando na falta de estímulo por

agente flogístico, como a carragenina. Os dados demonstraram que não há diferença significativa entre os grupos extrato 100% + salina e OM + salina ($p > 0.05$), negando as hipóteses acima descritas.

Em relação aos grupos diclofenaco, extrato bruto à 50% e extrato bruto à 100%, não houve diferença significativa ($p < 0.05$) entre os três grupos na redução da atividade anti-edema (TABELA 12).

Já quando se compara o grupo extrato bruto a 100% com grupo o óleo mineral + carragenina nota-se que houve uma redução bastante significativa ($p < 0,05$) do edema de pata. Interessantemente, o grupo extrato bruto à 100% foi capaz de reduzir o edema de pata em aproximadamente 50%, enquanto que o grupo diclofenaco dietilamônio reduziu em torno de 20-25% (GRÁFICO 4), demonstrando uma maior eficácia do extrato de *Persea americana*, quando comparado ao antiinflamatório diclofenaco, na redução do edema de pata de camundongo induzido por carragenina.

TABELA 11 – DIFERENÇA NA ESPESURA DA PATA DE CAMUNDONGOS DURANTE ENSAIO DE EDEMA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM COMPARAÇÃO À ESPESURA BASAL DA PATA

Veículos	DIFERENÇA DE ESPESURA DA PATA DE CAMUNDONGOS EM DIFERENTES TEMPOS (horas)- DADOS EM MILÍMETROS			
	0.5	1.0	2.0	4.0
	mm			
OM + Salina	0.05 ± 0.058	0.01 ± 0.044	-0.09 ± 0.058	-0.06 ± 0.050
OM + Carragenina	0.62 ± 0.055	0.67 ± 0.047	0.97 ± 0.089	1.06 ± 0.080
Extrato 100% + Salina	0.15 ± 0.094	0.16 ± 0.037	0.17 ± 0.083	0.17 ± 0.117
Extrato 50% + Carragenina	0.57 ± 0.063	0.50 ± 0.068	0.63 ± 0.081	0.77 ± 0.093
Diclofenaco + Carragenina	0.65 ± 0.068	0.53 ± 0.046	0.75 ± 0.059	0.87 ± 0.107
Extrato 100% + Carragenina	0.57 ± 0.049	0.42 ± 0.039	0.46 ± 0.053	0.65 ± 0.081

FONTE: o autor

TABELA 12- COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS EXPERIMENTAIS DO ENSAIO DE EDEMA DE PATA DE CAMUNDONGO INDUZIDO POR CARRAGENINA, 2 HORAS APÓS INJEÇÃO INTRAPLANTAR DO AGENTE FLOGÍSTICO- SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS (VALOR DE p).

GRUPOS COMPARADOS	VALOR DE p
EXTRATO 50% + CARRAGENINA vs EXTRATO 100% + CARRAGENINA	0.477
DICLOFENACO + CARRAGENINA vs EXTRATO 100% + CARRAGENINA	0.109
EXTRATO 100% + SALINA vs EXTRATO 100% + CARRAGENINA	0.128
ÓLEO MINERAL + CARRAGENINA vs EXTRATO 100% + CARRAGENINA	<0.001
ÓLEO MINERAL + SALINA vs EXTRATO 100% + CARRAGENINA	<0.001
DICLOFENACO + CARRAGENINA vs EXTRATO 50% + CARRAGENINA	0.867
EXTRATO 100% + SALINA vs EXTRATO 50% + CARRAGENINA	0.002
ÓLEO MINERAL + CARRAGENINA vs EXTRATO 50% + CARRAGENINA	0.013
ÓLEO MINERAL + SALINA vs EXTRATO 50% + CARRAGENINA	<0.001

FONTE: o autor

GRUPOS COMPARADOS	VALOR DE p
DICLOFENACO + CARRAGENINA vs EXTRATO 100% + SALINA	<0.001
DICLOFENACO + CARRAGENINA vs ÓLEO MINERAL + CARRAGENINA	0.428
ÓLEO MINERAL + SALINA vs DICLOFENACO + CARRAGENINA	<0.001
ÓLEO MINERAL + CARRAGENINA vs EXTRATO 100% + SALINA	<0.001
ÓLEO MINERAL + SALINA vs EXTRATO 100% + SALINA	0.198
ÓLEO MINERAL + SALINA vs ÓLEO MINERAL + CARRAGENINA	<0.001

TESTE ESTATÍSTICO: ANÁLISE DE VARIÂNCIA DE UMA VIA (ANOVA ONE-WAY), INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95%; POST-HOC: TUKEY. SOFTWARE: R.

FONTE: o autor.

Créditos: Prof. MSc. Walmes Marques Zeviani

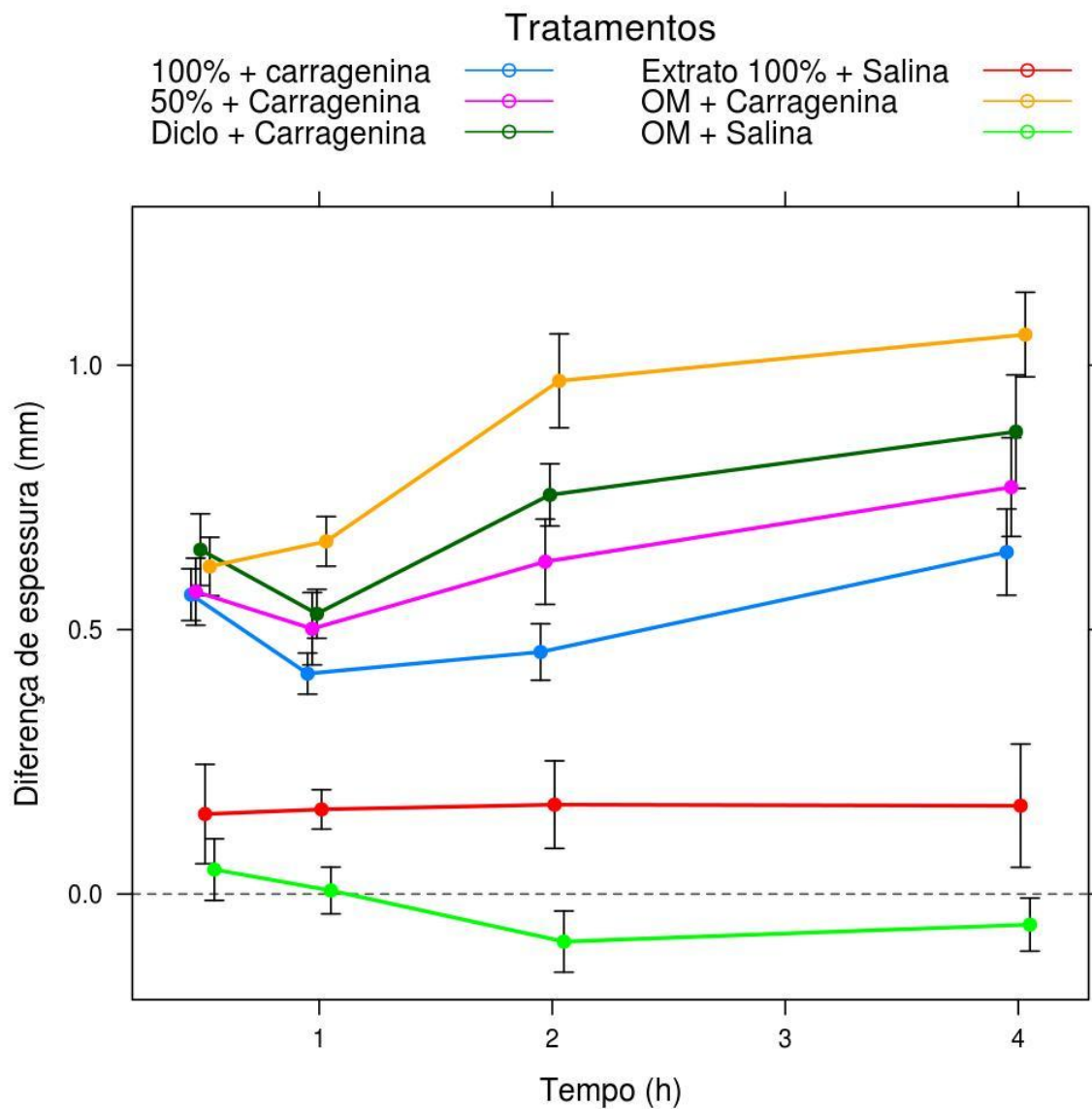


GRÁFICO 4- EFEITO DO EXTRATO DAS SEMENTES DE *Persea americana* NAS CONCENTRAÇÕES 50%, 100% EM COMPARAÇÃO COM UM ANTIINFLAMATÓRIO TÓPICO (DICLOFENACO DEA) SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA.

Estes dados demonstram um potencial promissor para o emprego do extrato bruto do caroço de *Persea americana* como tratamento para pacientes com doenças como osteoartrite, uma vez que este demonstrou uma atividade anti-flogística consideravelmente maior que a pomada de diclofenaco potássico já utilizada no tratamento da doença há anos como coadjuvante na terapia medicamentosa.

Tendo em vista que o mercado terapêutico apresenta atualmente uma variedade de fármacos muitas vezes eficazes, mas que apresentam impasses, tanto num contexto global, demonstrando efeitos colaterais aos pacientes, como num contexto nacional, em que a maior parte da população brasileira possui baixa renda, o presente estudo oferece uma alternativa de baixo custo e terapeuticamente promissora para a população brasileira na terapia de doenças crônicas reumatológicas.

A matéria-prima pode ser obtida através de uma parceria entre indústrias (alimentos, cosméticos), uma vez que as sementes de *Persea americana* Mill. são muitas vezes descartadas, gerando lixo orgânico, que poderia ser utilizado para fabricação de um novo medicamento fitoterápico.

5. CONCLUSÃO

- O extrato etanólico de *Persea americana* (Mill.) Lauraceae não apresentou diferença qualitativa nas frações apolares em comparação com os extratos metanólico e acetato de etila, que possuem atividade antioxidante e antimicrobiana descrita na literatura

- A utilização de ultra-som durante o processo de extração por maceração dos constituintes químicos das sementes de *Persea americana* utilizando etanol como solvente extrator não demonstrou diferença qualitativa nem quantitativa em relação à extração nas mesmas condições, porém sem o uso de ultra-som, concluindo que sua utilização não otimiza o processo extrativo.

- Os extratos das sementes de *Persea americana* não demonstrou atividade citotóxica nas concentrações 0,1µg/g e 1 µg/g em células macrofágicas murinas da linhagem RAW 264.7 no ensaio de redução do sal de tetrazólio (MTT)

- Os extratos das sementes de *Persea americana* demonstraram ser capazes de diminuir a liberação de duas citocinas pró-inflamatórias (MCP-1 e TNF) importantes na progressão do quadro de osteoartrite.

- Houve significativa redução do edema de pata de camundongos quando tratados com os extratos das sementes de *Persea americana*, sendo esta redução maior que a exercida pela pomada de diclofenaco, já utilizado na terapêutica reumatológica.

6. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Considerando o potencial antiinflamatório do extrato das sementes de *Persea americana* Mill., cuja atividade já é descrita na medicina popular e foi observada em alguns dos ensaios farmacológicos deste estudo, a continuidade do projeto consiste na produção de um novo fitoterápico de uso tópico para pacientes que sofrem de sintomas relacionados à inflamação, atuando como coadjuvante na terapia medicamentosa de doenças como a osteoartrite.

Alguns testes farmacotécnicos já encontram-se em andamento e uma patente intitulada “**Produção e aplicação de formulação farmacêutica de uso tópico contendo extrato e frações de *Persea americana* Mill.**” já encontra-se depositada no INPI sob o protocolo BR 10 2013 004308 7.

Assim, o presente estudo assumirá continuidade objetivando a produção de uma nova alternativa fitoterápica eficaz e segura para aqueles indivíduos cujas comorbidades impedem o uso dos medicamentos antiinflamatórios atualmente disponíveis no mercado farmacêutico.

Referências Bibliográficas

ADEYEMI, O. O.; OKPO, S. O.; OGUNTI, O. O. **Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* mill (LAURACEAE)**. Fitoterapia, Ed. Elsevier, v.73, p. 375-380, 2002.

AHN, K. S.; AGGARWAL, A.; KHANNA, D.; SETHI, G.; PANDEY, M. K.; KUNNUMAKKARA, A. B.; SUNG, B.; AGGARWAL, B.B.; AJAIKUMAR, B. **Natural products as a gold mine for arthritis treatment**. Current Opinion in Pharmacology, Ed. Elsevier, v.7, p. 344–351, 2007.

ALONSO, J. **Tratado de fitofármacos y nutracéuticos**. Ed. Corpus, p. 76-79, 2004.

AL-SEREITIA, M. R.; ABU-AMERB; K. M., SENA, P. **Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* linn.) and its therapeutic potentials**. Indian journal of experimental biology, v. 37, p. 124-131, 1999.

ALTINIER, G.; SOSA, S.; AQUINO, R.P.; DELLA LOGGIA, R.; MENCHERINI, T.; TUBARO, A. **Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.7, n°5, p.1718-1723, 2007.

AMATUZZ, M. M.; CAMANHO, G. L.; HERNANDEZ, A. J.; REZENDE, M. U. **Cartilagem articular e osteoartrose** . Acta Ortopédica Brasileira, v.8, n°2, 2000.

ARBOGAST, P. G.; DAUGHERTY, J. R.; GRIFFIN, M. R.; HALL, K.; RAY, W. A.; STEIN, C. M. **COX-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of serious coronary heart disease**. The Lancet, v.360, p. 1071-1073, 2002.

BATESON, M.; BARI, M.; JOSHI, H. N.; NANDI, I. **Synergistic effect of peg-400 and cyclodextrin to enhance solubility of progesterone**. American Association of Pharmaceutical Scientists , v.4, p.01-05, 2003.

BJARNASON, I.; LEVI, A. J.; PETERS, T. J.; SMETHURST, P.; WILLIAMS, P.; **Alimentary tract and pancreas. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs and prostaglandins on the permeability of the human small intestine**. International Journal of Gastroenterology and Hepatology, v.27, p. 1292-1297, 1986.

BLUMBERGER, W.; TEPE, H.J. **Redução do uso de anti-reumáticas orais pelo uso tópico de Etofenamato gel; Saving of oral antirheumatics agents by local use of Etofenamate gel**. Folha médica, ed. Cidade Editora Científica, v. 90, p. 77-81, 1985.

BRAIN, K.R.; GREEN, D.M.; DYKES, P.J. ; MARKS, R. ; BOLA T.S. **The role of menthol in skin penetration from topical formulations of ibuprofen 5% *in vivo***. *Skin Pharmacology and Physiology*, v.19, p. 17-21, 2006.

BRAND, D.D.; LATHAM, K.A.; ROSLONIEC, E.F. **Collagen-induced arthritis**. *Nature Protocols*, v. 2, p.1269 – 1275, 2007.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JUNIOR, J. M. **The Drug Development in Brazil: Challenges**. Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina. *Revista Gazeta médica da Bahia* 2008; v.78 (Suplemento 1), p. 98-106, 2008.

CARNÉ, X.; JUAN, J.; LAPORTE, J-R.; MORENO, V.; VIDAL, X. **Upper gastrointestinal bleeding in relation to previous use of analgesics and non-steroidal anti-inflammatory drugs**. *The Lancet*, v. 37, p. 85-89,1991.

CLARK-LEWIS, I.; GONG, J-H. RATKAY,L. G.; WATERFIELD, J. D. **An Antagonist of Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) Inhibits Arthritis in the MRL-*lpr* Mouse Model**. *The Journal of Experimental Medicine*, p. 131-137, 1997.

CHIMELLI, M.; DALLARMI MIGUEL; DALMAZ, A. C.; ZANIN, S. M. W. **Physicals parameters in the emulsion stability study**. *Revista Visão Acadêmica*, v. 2, nº. 2, p. 47-58, 2001.

CORNÉLIO, R.; MAYORGA, P. **Estudo da penetração cutânea do flurbiprofeno**. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 26, p. 883-888, 2007.

DAVIS, M.A.; ETTINGER, W.H.; NEUHAUS, J.M.; MUELLER, W.H. **Body fat distribution and osteoarthritis**. *American Journal of Epidemiology*, v. 132, p.701-707, 1990.

DELFINO, V. D.; FAVERO, M. E.; PERES, L. A. B.; TUTIDA, L. A. **Padronização do MTT como um teste de viabilidade celular em fragmentos corticais de rins de ratos**. *Anais da 58ª Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência*, 2006.

FARINES, M.; SOULIER J., *et al.* **Influence of avocado oil processing on the nature of some unsaponifiable constituents**. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.72, p.473–476,1995.

Farmacopéia Brasileira, Agência nacional de Vigilância Sanitária, 5ª Edição, V. 2, Brasília, 2010.

FILHO, V. C.; PEDROSA, R. C.; YUNES, R. A. **Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil**. *Química Nova*, v. 24, nº. 1, p. 147-152, 2001.

FLOGLIO, M.A.; QUEIROGA, C.L.; SOUSA, I.M.O; RODRIGUES, R.A.F. **Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo**

Multidisciplinar. Multicência, v.7, 2006. Disponível em <http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_04_7.pdf> Acesso em junho de 2012.

GEISSMAN, T. A.; DITTMAR, H. F. K. **A proanthocyanidin from avocado seed**. *Phytochemistry*, v.4, p.359–368. 1965.

Guidelines for the medical management of osteoarthritis. American College of Rheumatology, v.38, n°. 11, p 1541-1546, 1995.

Inovação e Pesquisa Clínica no Brasil, Revista: INTERFARMA, 2010. Disponível em <www.interfarma.org.br> acesso em agosto 2011.

JAVIER-GERMÁN RODRÍGUEZ-CARPENA, MORCUENDE, D., MARÍA-JESUS ANDRADE, PETRI KYLLI, AND MARIO ESTEVEZ. **Avocado (*Persea americana* mill.) Phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59, 2011, p. 5625-5635.

KASHMAN, Y.; NEEMAN, I. *et al.* **New compounds from avocado pear**. *Jornal: Tetrahedron* v.25, p. 4617–4631, 1969.

KEISERMAN, M. W. **Artrite reumatóide**. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 2001.

KLEIN T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. **Fitoterápicos: um mercado promissor**. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v.3, p. 241-248, 2009.

LOZANO, Y. F.; DHUIQUE MAYER, C. M. *et al.* **Unsaponifiable matter, total sterol and tocopherol contents of avocado oil varieties**. *Journal American Oil chememists' Society*, v.70, p.561–565, 1993.

LOPEZ, A. D.; MURRAY C. J. L., editors. **The global burden of disease. A comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020**. Cambridge (MA): Harvard School of Public Health on behalf of the World Health Organization and The World Bank, 1996.

Lo que Mexico apporto al mundo. RAMON CRUCES CARVAJAL. 1ª Edição, 2006.

LUTTMANN, W.; BRATKE, K.; KUPPER, M.; MYRTEK, D. **Immunology**. Ed. Elsevier. 2006.

OGATA, H.; TAKAGI, K.; TAKAHASHI, K.; TAKEYA, M.; YOSHIMURA, T. **The role of monocyte chemoattractant protein-1 (mcp-1) in the pathogenesis of collagen-induced arthritis in rats**. *The Journal of Pathology*, v.182, p. 106-114, 1997.

RAMOS, M. D.; JERZ, G. *et al.* **Two glucosylated abscisic acid derivatives from avocado seeds (*Persea americana* mill. Lauraceae cv. Hass).** *Phytochemistry*, v.65, n.7, p.955-962. 2004.

Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee. *American College of Rheumatology*, v. 43, n°. 9, p.1905–1915, 2000

Rational Phytoterapy, SCHULZ, HANSEL, TYLER. 4a Edição, Ed. Springer, 2001.

SELLAM, J., BERENBAUM, F. **The role of sinovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis.** *Nature Reviews. Rheumatology*, v.6, p. 625–635, 2010.

SILVA, M. C.; CARVALHO, J. C. T. **Inflamação.** In: **J. C. T. Carvalho (ed.). Fitoterápicos antiinflamatórios.** Revista : Superpedido tecmedd. Inflamação, p.49-68, 2004.

THOMPSON, R. S.; JACQUES, D. *et al.* **Plant proanthocyanidins, part i., introduction: the isolation, structure, and distribution in nature of plant procyanidins.** *Journal of the Chemical Society*, p.1387–1399. 1972.

U. R. MARCIA, J.H. ARNALDO, L. C. GILBERTO, M. A. MARCO; **Cartilagem articular e osteoartrose.** *Acta Ortopédica Brasileira*, v.8, 2000.

VALERI, H.; GIMENO, F. **Estudio fito-químico toxicológico de los frutos de aguacate (*Persea americana-c* bauhin, pinax 441, 1623).** *Revista de Medicina Veterinaria y Parasitología*, v. 12, p.130–165, 1953.

VARALAKSHMI, P; ARUNKUMAR, R.; CHANTHRAMOCHAN, L.; NAGARAJAN, M.; BABU, T.V.; PRATHEEBA, N. **Study of anti-inflammatory, anti-diabetic, and analgesic activity of *Oscillatoria annae* extract in rats and mice.** *African Journal of Biotechnology*, v.11, p. 7986-7994, 2012.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L. **Quantitative studies of the pathway to acute carrageenan inflammation.** *Federation Proceedings*, v. 35, p. 2447-2455, 1976.

V. F. M. TREVISANI, S. A. F. TANIA, **Como diagnosticar e tratar osteoartrite.** *Revista Brasileira de Medicina*, p. 51-59, 2009.

WERMAN, M. J.; MOKADY, S., *et al.* **Partial isolation and characterization of a new natural inhibitor of lysyl oxidase from avocado seed oil.** *Journal of Agricultural and Food chemistry*, v.38, p.2164–2168, 1990.

WOOLF, A.D.; PFLEGER BRUCE. **Burden of major musculoskeletal conditions.** *Bulletin of The World Health Organization*, v. 81, p. 646-656, 2003.