

## ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA EPIISOPiloturina LIVRE E NANOENCAPSULADA SOBRE A COLITE ULCERATIVA

<sup>1</sup> Danyela Maria Leal Rocha; <sup>2</sup> Ana Clara Coelho da Costa; <sup>2</sup> Maria da Graça Sales Furtado; <sup>2</sup> Tino Marcos Lino da Silva; <sup>3</sup> Viviane Pinheiro Alves de Almeida; <sup>4</sup> André Luiz dos Reis Barbosa.

<sup>1</sup> Graduanda em Biomedicina pela Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPAR;

<sup>2</sup> Graduanda (o) em Biomedicina pela Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPAR;

<sup>3</sup> Doutoranda em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO; <sup>4</sup> Doutor em Farmacologia pela Universidade Federal do Ceará - UFC;

**Área temática:** Inovações em Farmacologia

**Modalidade:** Comunicação Oral

**E-mail do autor:** danyelaleal22@gmail.com

### RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Os tratamentos convencionais da colite ulcerativa apresentam diversos efeitos colaterais, fazendo-se necessário o desenvolvimento de alternativas terapêuticas, como as moléculas advindas de plantas medicinais. Um exemplo é o alcalóide epiisopiloturina da espécie *Pilocarpus microphyllus*, que já mostrou atividade anti-inflamatória em estudos anteriores. Entretanto esse alcalóide apresenta baixa absorção após a administração oral, podendo ser melhorado por meio de nanoformulações. **OBJETIVO:** O presente trabalho visa estudar de forma comparativa o efeito da epiisopiloturina nanoencapsulada com a goma do cajueiro e da epiisopiloturina livre sobre os parâmetros inflamatórios da colite induzida por TNBS em ratos. **MÉTODOS:** Foram produzidas nanopartículas a base de goma do cajueiro modificada pelo método de nanoprecipitação. A atividade anti-inflamatória, foi analisada sobre os níveis de MDA, GSH e MPO, no cólon de ratos com colite induzida experimentalmente por TNBS. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Os resultados encontrados mostram que epiisopiloturina nanoencapsulada com a goma do cajueiro mostrou maior atividade anti-inflamatória que a sua forma livre ao reduzir parâmetros oxidativos como MPO e MDA e aumentar os níveis de GSH. **CONCLUSÃO:** Diante dos resultados até aqui obtidos conclui-se que a epiisopiloturina nanoencapsulada melhora a atividade anti-inflamatória em relação a sua forma livre, tornando-a uma possível promissora para a produção de um novo fitoterápico para o tratamento da colite.

**Palavras-chave:** Colite ulcerativa; Epiisopiloturina; Goma do cajueiro.

## 1 INTRODUÇÃO

A colite ulcerativa é uma doença crônica que acomete o cólon e reto, caracterizada por ulcerações da mucosa e submucosa do cólon sem afetar as camadas mais profundas da parede intestinal. Essa enfermidade é caracterizada pelo aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 e elevado infiltrado inflamatório com aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) na mucosa do cólon (DAMIANI, et al., 2007; REIFEN, et al., 2004; ROBERTS-THOMSON et al., 2011).

A farmacoterapia convencional para colite ulcerativa não se mostra totalmente eficaz e a sua utilização por períodos prolongados pode levar ao aparecimento de sérios efeitos colaterais significativos que comprometem a adesão e progressão ao tratamento e podem limitar seu uso. Tendo em vista isso, vários estudos mostram o uso de plantas e seus compostos bioativos como alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças inflamatórias. Dentre elas, destacam-se o jaborandi, da espécie *Pilocarpus microphyllus*, a qual é utilizada para o isolamento de alcalóides com propriedades farmacológicas.

Um dos principais alcalóides extraídos do jaborandi é a epiisopiloturina, que possui estrutura química similar a pilocarpina, tornando-a um alcalóide promissor quanto às suas propriedades farmacológicas. Silva e colaboradores (2013) investigaram a atividade de EPI em modelos farmacológicos clássicos de inflamação (edema de pata e migração de neutrófilos) e dor (contorção induzida por ácido, teste de placa quente e indução de dor usando formalina), tendo obtido potenciais efeitos anti-inflamatório e antinoceptivo. Guimarães e colaboradores (2013) estudaram, *in vitro*, o efeito de lipossomas carregados com EPI. Essa investigação mostrou que a nova formulação apresenta efetividade contra esquistossomos adultos, além de ser mais estável que a forma livre.

Partindo do princípio de que as propriedades farmacológicas de fármacos convencionais podem ser melhoradas com sistemas nanoestruturados (tais como nanopartículas poliméricas, micelas e lipossomas), aumentando a solubilidade dos compostos, é relevante o desenvolvimento biotecnológico de uma formulação nanoestruturada que melhore a biodisponibilidade plasmática do alcalóide EPI após administração via oral, para sua aplicação direcionada ao tratamento da colite ulcerativa.

## 2 OBJETIVO

Estudar de forma comparativa o efeito da epiisopiloturina nanoencapsulada e livre sobre a colite induzida por TNBS em ratos, avaliando os parâmetros de MDA, MPO e GSH.

## 3 MÉTODOS

Para o experimento foi necessário um número de 6 animais por grupo ( $n=6$ ), e um total de 4 grupos, totalizando 24 animais, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclo claro/escuro (12h/12h) controlados. Todos os tratamentos e procedimentos foram realizados de acordo com os princípios e normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), ressaltamos que o presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) (Nº de Protocolo: 003/2021).

A colite foi induzida pela administração de TNBS (20mg) diluído em etanol a 50%, sendo a solução administrada num volume de 0,8 ml por animal. O grupo controle recebeu apenas salina (0,9%, num volume de 0,8 ml). Os tratamentos foram feitos uma hora antes da indução da colite e uma vez ao dia, por três dias após a indução da colite por TNBS.

Para medir a concentração do MPO, utilizou-se o protocolo estabelecido por Bradley et al (1982), o homogenato (cólon + tampão) foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . A partir do sobrenadante, a concentração de MPO foi avaliada medindo a mudança na absorbância a 450 nm utilizando 45ml de NaPO<sub>4</sub>0,08M junto com a solução de leitura. Os níveis de MPO são relatados como UMPO/mg de tecido.

Para medir os níveis de GSH no fígado, foi utilizado o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Foi utilizado um espectrofotômetro de leitura com absorbância em 412 nm. As concentrações de GSH foram expressas em  $\mu\text{g}$  de GSH/g de tecido.

Os níveis de malondialdeído (MDA) no fígado foram determinados pelo método de Mihara e Uchiyama (1978). As amostras foram medidas em 520 e 535 nm e os resultados obtidos foram expressos em mol de MDA/g de tecido.

Dos dados quantitativos foram calculadas as médias  $\pm$  erro de certo número de eventos ( $n = 6$ ) em cada grupo. A diferença estatística entre os grupos foi determinada através de análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as médias feita pelo teste de Bonferroni. A diferença estatís-

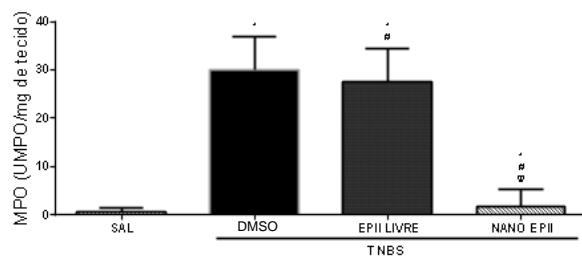
tica entre os grupos foi determinada através de análise de variância (ANOVA) a comparação entre as médias ocorreu através do teste de Kruskal-Wallis. Uma diferença de  $p < 0,05$  foi considerada estatisticamente significativa.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como se pode observar na Figura 1, o grupo que recebeu TNBS + DMSO 2% apresentou aumento significativo da enzima mieloperoxidase ( $< 0,05$ ) quando comparado com o grupo salina. O grupo EPII livre (1 mg/kg), mostrou diminuição quando comparado com o grupo DMSO, destacando assim a menor atividade de mieloperoxidase no tecido do cólon desses animais. O grupo que recebeu a EPII nanoencapsulada (concentração 1mg/kg) apresentou uma redução também significativa na ação antioxidante da EPII sob os níveis de MPO.

Dessa forma, com a administração de Epiisopiloturina encapsulada na dose de 1 mg/kg os níveis de MPO diminuíram significativamente, principalmente em relação à epiisopiloturina livre, demonstrando assim, a redução de neutrófilos no local da lesão e consequentemente o estresse oxidativo no cólon de camundongos com colite ulcerativa.

**Figura 1:** Atividade de mieloperoxidase (MPO)

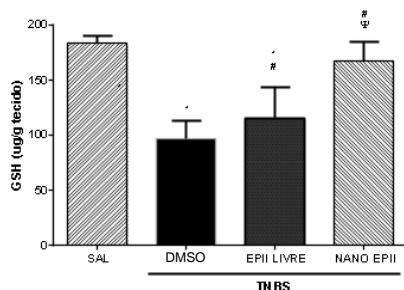


**Legenda:** SAL, salina; DMSO, dimetilsulfóxido; EPII LIVRE, epiisopiloturina livre; NANO EPII, epiisopiloturina nanoencapsulada. Os resultados estatísticos são expressos como média  $\pm$  erro de 6 animais por grupo.

Como observado na Figura 2, o grupo com colite ulcerativa que recebeu apenas TNBS + DMSO 2% apresentou uma diminuição dos níveis de GSH, quando comparado com o grupo salina. O grupo EPII livre (1 mg/kg) obteve uma redução do consumo do antioxidante GSH, evidenciando assim, um aumento significativo ( $< 0,05$ ) dos valores de GSH quando comparado com o grupo DMSO. Adicionalmente, o grupo que recebeu Epiisopiloturina nanoencapsulada também obteve uma redução estatisticamente significativa ( $< 0,05$ ), quando comparado com o grupo EPII livre (1 mg/kg) e salina.

Os cólons dos animais tratados com Epiisopiloturina nanoencapsulada 1 mg/kg apresentaram aumento dos níveis de GSH, ainda maiores que dos animais que receberam a EPII livre (1 mg/kg), evidenciando assim, que a Epiisopiloturina nanoencapsulada melhor previne a depleção dos níveis de GSH do cólon de ratos.

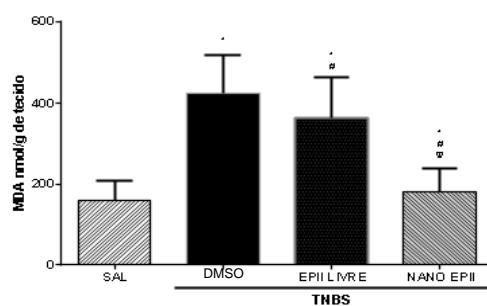
**Figura 2:** Glutationa reduzida (GSH)



**Legenda:** SAL, salina; DMSO, dimetilsulfóxido; EPII LIVRE, epiisopiloturina livre; NANO EPII, epiisopiloturina nanoencapsulada. Os resultados estatísticos são expressos como média  $\pm$  erro de 6 animais por grupo.

A partir dos resultados obtidos pode-se observar na Figura 3 que, a colite ulcerativa induzida por TNBS + DMSO 2% resultou no aumento do estresse oxidativo no cólon, sendo mensurado pela enzima marcadora de degradação lipídica MDA, na qual apresentou aumento significativo ( $< 0,05$ ) no grupo com colite ulcerativa que recebeu somente TNBS + DMSO 2% quando comparado com o grupo salina. O grupo tratado com EPII livre (1 mg/kg) apresentou uma diminuição significativa dos níveis de degradação lipídica quando comparado com o grupo TNBS + DMSO. Assim como grupo tratado com EPII nanoencapsulada (1 mg/kg), demonstrando redução ainda maior e significativa da concentração de MDA do cólon de ratos.

**Figura 3:** Malonaldeído (MDA)



**Legenda:** SAL, salina; DMSO, dimetilsulfóxido; EPII LIVRE, epiisopiloturina livre; NANO EPII, epiisopiloturina nanoencapsulada. Os resultados estatísticos são expressos como média  $\pm$  erro de 6 animais por grupo.

## 5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados até aqui obtidos conclui-se que a epiisopiloturina nanoencapsulada melhorou a atividade anti-inflamatória em relação a sua forma livre, tornando-a promissora para a continuidade dos estudos, visando a produção de um novo fitoterápico para o tratamento da colite.

## REFERÊNCIAS

- BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular And Extracellular Myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60 n.3, p. 618-622, 1982.
- CONRAD, K.; ROGGENBUCK, D.; LAASS, M. W. **Diagnosis and classification of ulcerative-colitis**. Autoimmun Reviews, v. 13, p. 463-466, 2014.
- DAMIANI, C. R.; BENETTON, C. A.; STOFFEL, C.; BARDINI, K. C.; CARDOSO, V. H.; DI GIUNTA, G.; PINHO, R. A.; DAL-PIZZOL, F.; STRECK, E. L. **Oxidative stress and metabolism in animal model of ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium**. Journal of Gastroenterology and Hepatology, v. 22, p. 1846-1851, 2007.
- GUIMARÃES, M. A.; VEIRA, M. M.; CAMPELO, Y. D. M.; SAKAI, V. Y.; LIMA, D. F.; CARVALHO JUNIOR, P. S.; ELLENA, J. A.; SILVA, P. R. P.; VASCONCELOS, L. C.; GODEJO-HANN M.; PETRILLI, H. M.; CONSTANTINO, V. R. L.; MASCARENHAS, Y. P.; ALMEIDA, J. R. S. Industrial ScaleIsolation, Structural and Spectroscopic Characterization of Epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf Leaves: A Promising Alkaloids against Schistosomiasis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1-11, jun. 2013.
- MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal. Biochem.** v. 86(1), p. 271-278, 1978.
- REIFEN, R.; NISSENKORN, A.; MATAS, Z.; BUJANOVER, Y. 5-ASA and lycopene decrease the oxidative stress and inflammation induced by iron in rats with colitis. **Journal Gastroenterology**, v. 39, p. 514–519, 2004.
- ROBERTS-THOMSON I.C.; FON J.; UYLAKI W.; CUMMINS A.G.; BARRY S. **Cells, cytokines and inflammatory bowel disease: a clinical perspective**. Expert Review of Gastroenterology and Hepatology, v. 5, n. 6, p. 703-716, 2011.
- SEDLAK J, LINDSAY R. H. Estimationof total, protein-bound, and non protein sulfhydryl groups in tissuewithEllman'sreagent. **AnalyticalBiochemistry**, v. 25: p. 192-205, 1968.
- SILVA, V. G. et al. **Anti-inflammatory and antinociceptive activity of epiisopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus Microphyllus*.** **Journal of natural products**, v. 76, n. 6, p. 1071-1077, 2013.