

UNILEÃO  
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

KAIO JEFTÉ SANTOS DE OLIVEIRA DIAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATORIA TÓPICA DOS COMPOSTOS  
(+)-NOOTKATONE E (+)-VALENCENE EM CAMUNDONGOS**

Juazeiro do Norte – CE  
2019

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATORIA TÓPICA DOS COMPOSTOS  
(+)-NOOTKATONE E (+)-VALENCENE EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso – Artigo Científico, apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio - UNILEÃO, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de Bacharel.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Ma. Lindaiane Bezerra Rodrigues Dantas.

Juazeiro do Norte – CE  
2019

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATORIA TÓPICA DOS COMPOSTOS  
(+)-NOOTKATONE E (+)-VALENCENE EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso – Artigo Científico, apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio - UNILEÃO, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de Bacharel.

**Orientadora:** Profª. Ma. Lindaiane Bezerra Rodrigues Dantas.

**Data de aprovação:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profª. Ma. Lindaiane Bezerra Rodrigues Dantas**

---

**Prof.<sup>a</sup> Ma. Vivianne Cortez Sombra Vandesmet**  
**Examinador 1**

---

**Prof. Me. Cícero Roberto Nascimento Saraiva**  
**Examinador 2**

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATORIA TÓPICA DOS COMPOSTOS (+)-NOOTKATONE E (+)-VALENCENE EM CAMUNDONGOS

1

Kaio Jefté Santos de Oliveira Dias<sup>1</sup>  
Lindaiane Bezerra Rodrigues Dantas<sup>2</sup>

### RESUMO

A avaliação da inflamação dos compostos Nootkatone e Valencene em camundongos, identificando os efeitos anti-inflamatórios mediados pelos compostos Nootkatone e Valencene. Para os ensaios experimentais foi utilizada droga farmacológica como controle positivo: dexametasona por via tópica. Sendo usado o óleo de crôton um agente flogístico bem como, os sesquiterpenos (+)-Valencene e (+)-Nootkatone. O preparo das drogas foi utilizado água destilada e acetona, administrados por via oral e via tópica. Para os teste foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) Swiss, machos adultos, pesando entre 25-30 g, distribuídos em grupos testes e grupo controle. Avaliando a atividade antiflamatoria tópica do Valenene e Nootkatone em camundongos. A dexametasona apresentou 90,2% da redução do edema provocado pelo óleo de Croton, enquanto que a dose de 300mg/kg da Nootkatone mostrou 32,4% da redução, para a dose de 100mg/kg foi reduzido 21,2% e a dose de 10mg/kg 30%. Em relação ao Valencene a dose de 300mg/kg reduziu 38% do edema sendo uma resposta melhor que a dose de 100mg com redução de 20,5% e sem apresentar diferença com a solução salina, contudo a dose de 10mg/kg reduzindo 23,5% mostrou resultado significativo semelhante a dose de 300mg/kg levando em conta sua eficácia. Obtendo ação antiinflamatória após realização dos testes mesmo não mostrando resultados com significativos como apresentados por drogas conhecidas.

**Palavras-chave:** Nootkatone, Toxicidade, Valencene.

**EVALUATION OF TOPICAL ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF COMPOUNDS****(+) - NOOTKATONE E (+) - VALENCENE IN MICE****ABSTRACT**

The evaluation of the inflammation of the Nootkatone and Valencene compounds in mice, identifying the anti-inflammatory effects mediated by the Nootkatone and Valencene compounds. For the experimental trials pharmacological drug was used as a positive control: dexamethasone topically. Chronotron oil is used as a phlogistic agent as well as the sesquiterpenes (+) - Valencene and (+) - Nootkatone. The preparation of the drugs was distilled water and acetone, administered orally and topically. For the tests, Swiss males (*Mus musculus*), adult males, weighing between 25-30 g, were distributed in test groups and control group. Evaluating the topical anti-inflammatory activity of Valenene and Nootkatone in mice. Dexamethasone presented 90.2% of the reduction of edema caused by Croton oil, while the Nootkatone 300mg / kg dose showed 32.4% of the reduction; at the dose of 100mg / kg it was reduced by 21.2% and dose of 10mg / kg 30%. In relation to Valencene the dose of 300mg / kg reduced 38% of the edema being a better response than the dose of 100mg with a reduction of 20.5% and without presenting difference with the saline solution, however the dose of 10mg / kg reducing 23, 5% showed a significant similar result to a dose of 300mg / kg taking into account its efficacy. Obtaining anti-inflammatory action after performing the tests even though not showing results with significant as presented by known drugs.

**Keywords:** Nootkatone, Inflammation, Valencene.

<sup>1</sup>Discente do curso de Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio – UNILEÃO

<sup>2</sup>Docente do curso de Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio - UNILEÃO

## **1 INTRODUÇÃO**

O conhecimento a respeito da utilização de plantas medicinais vem sendo obtida desde a antiguidade e mantida por muitos, sendo por muitas vezes a única forma terapêutica ou até um complemento as metodologias de tratamento mais modernas. Esses vegetais mesmo não possuindo seus compostos elucidados em rótulos são frequentemente recomendados devido as suas propriedades.( ARNOUS, SANTOS, BEINNER, 2005)

A população tenta promover uma melhora em sua qualidade de vida por meio da observação e tentativa, o que está relacionado ao empirismo, o ser humano usa da natureza para sobreviver, fazendo uso das plantas que estão ao seu alcance (ALMEIDA, 2011). O saber medicinal estimula o interesse dos cientistas no intuito de buscar mais sobre a multidisciplinaridade relacionada ao uso das plantas medicinais (MACIEL; PINTO; JUNIOR, 2002; JUNIOR, PINTO, 2005).

Com o passar dos anos a busca por novas moléculas para o tratamento de diversas patologias cresce cada vez mais. Muito se é descoberto estudando constituintes metabólicos provenientes de plantas com o auxílio da identificação química dos compostos onde boa parcela apresenta relevância farmacológica. Com o surgimento da necessidade a ciência é de certa forma forçada a buscar a união daquilo que a natureza oferece com a evolução das pesquisas (CARTAXO, SOUZA, ALBUQUERQUE, 2010; FOGLIO et al., 2006; SANTANA et al., 2016).

Mesmo que seja de origem natural, a utilização dessas plantas pode trazer riscos à saúde como a toxicidade devida interações dos componentes vegetais, bem como interação medicamentosa ou alimentar, havendo ainda relação com os aspectos do indivíduo (BALBINO, DIAS M. F., 2010).

A partir do metabolismo secundário dos vegetais substâncias complexas são produzidas tendo elas características voláteis, comumente apresentando-se de forma líquida e com odor (MILLEZI et al., 2014), também conhecidos como Óleos essenciais, que em sua composição existem monoterpenos, sesquiterpenos, além de conter ésteres e outras moléculas com atividades bioativas (VIZZOTTO, 2010). Os óleos essenciais são constituídos de uma combinação complexa de compostos voláteis que em sua totalidade possuem característica aromática sendo extraídos de plantas, possuindo como característica fundamental a capacidade de volatilização, não manifestando funções bem estabelecidas nos produtores (SIMÕES et al., 2017)

Nootkatone é uma substância de origem orgânica que foi obtida inicialmente a partir

do interior do Cedro do Alaska da classe das cetonas fazendo parte do grupo dos terpenoides e uma grande subclasse denominada de sesquiterpeno (LEONHARDT; BERGER, 2014). Esse composto é obtido por meio da metabolização do Valencene, um precursor imediato e presente em grande quantidade no óleo obtido da casca da laranja, uma substancia também achada no suco de toranja (SOWDEN et al., 2005). Assim como o valenceno a nootkatona é utilizada como aromatizante para bebidas, estando em meio aos terpenos como os mais usados em escala industrial, sendo o valenceno extraído por meio de destilação a vapor (BEEKWILDER et al., 2014).

O metabolismo do Valencene em Nootkatone pode ser dado pelo conjunto de enzimas citocromo P450 que podem ser encontrados tanto nos eucariontes como nos procariontes, no entanto os métodos de bioconversão executados não mostraram resultados satisfatórios (GAVIRA et al., 2013).

Alguns estudos mostraram que a Nootkatone apresentou ação contra a agregação plaquetaria, promovendo um aumento do tempo de sangramento (SEO et al., 2011); mostrado que por meio do extrato etanólico do *Cyperus rotundus* possuindo compostos provenientes da classe dos sesquiterpenos como a nootkatone e valenceno pode demonstrar bloqueio na síntese de leucotrienos e estimulado por 5-lipoxigenase em células de leucemia basofílica de ratos (RBL) -1, além de promover o bloqueio da liberação da β-hexosaminidase pelas células RBL-2H3 possuindo o valenceno o maior efeito inibitório (JIN et al., 2011).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo pré-clínico experimental randomizado com abordagem quantitativa onde para os ensaios experimentais foi utilizada droga farmacológica como controle positivo a dexametasona usada de forma tópica nos animais, que foi adquirida pelo laboratório Eurofarma. Os agentes flogísticos óleo de crôton adquirido pela Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, EUA), bem como, os sesquiterpenos (+)-Valencene e (+)-Nootkatone. Para preparo das drogas foram utilizados água destilada e acetona por via tópica.

Foram utilizadas para os ensaios experimentais, a espécie de camundongos Swiss (*Mus musculus*), com massa corpórea entre 25-30g. Estes animais foram cedidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ) e monitorados no Biotério Experimental da URCA, em conformidade com as normas e procedimentos de biossegurança para biotérios e bioéticas (BAZZANO, 2006). Os mesmos foram acondicionados em gaiolas de polipropileno e serão mantidos em ambiente com temperatura entre 23 ± 1° C, ciclo

claro/escuro de 12 h e com água e ração *ad libitum* (LAPA *et al.*, 2008).

Para a determinação eficácia da substancia foram utilizados grupos de camundongos (n=6) que tiveram suas orelhas tratadas, via tópica com 20uL (10ul na região interna e 10uL na região externa da orelha) na orelha direita e esquerda. Apos 30 minutos foi aplicado topicalmente o agente flogístico – óleo de croton a 5% na orelha direita e acetona na orelha esquerda. Após 6 horas, os animais foram anestesiados e eutanasiados, para retirada de discos de 6mm de diâmetro das orelhas por meio de um *punch* (perfurador de couro metálico) para avaliação do edema através do peso das orelhas em balança analítica.

Avaliação do edema:

$$\frac{\text{MOD} - \text{MOD}_0}{\text{MOE}} \times 100$$

Os dados foram analisados a partir da descrição das observações encontradas durante o teste da DL50 na tabela de Malone. Utilizando os programas Prisma e Anova para analisar os dados obtidos. Onde as doses para testes posteriores foram definidas a partir do número de mortes e determinação da DL50.

Os testes laboratoriais, tão-somente, foram desenvolvidos mediante aprovação do Comitê de Ética. Para tanto, a proposta da pesquisa está em conformidade e foi conduzida em estrita obediência com as normas e diretrizes bioéticas vigentes para ensaios envolvendo animais não humanos (*Guide for the care and use of laboratory animals*, do NIH - National Institute of Health - EUA, 1996; Lei Federal nº 11.794/2008; Princípios Éticos da Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA); e integridade da fauna e flora (Lei Federal nº 9605/1998) (BRASIL, 2008; BAZZANO, 2006; MACHADO *et al.*, 2006; BRASIL, 1998).

Este projeto foi submetido à aprovação pelo *Comitê de Ética no Uso de Animais* (CEUA) da Universidade Regional do Cariri (URCA), credenciado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), pelos termos da Portaria 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Para o processo inflamatorio muitas vias, sendo elas tanto intercelulares como as intracelulares são ativadas no intuito de recuperar e também manter a o homeostasia. Neste processo, celulas são

requeridas e possuem papel important,sendo elas : neutrófilos, monócitos, linfócitos, células dendríticas.O sistema imune é de suma importancia, bem como a ativação das vias inflamatórias e a posterior ou simultanea liberação de mediadores inflamatórios (PARISI et al., 2017).

A utilização do teste que mede o grau de edema de orelha ( mouse ear swelling test – MEST), quando comparado a testes antigos que usavam o Cavia porcellus ( poquinho da inidia) mostra que o MEST é mais rapido com gastos menores alem do número de animais menor para o estudo e objetiva avaliar a sensibilização. Esse protocolo de edema de orelha é importante na constatação de alérgenos (PAESE,2008).

Estudos feitos utilizando o oleo essencial da planta *Cyperus rotundus* , planta essa que possui em sua composição componentes da mesma classe dos compostos Nootkatone e Valencene mostraram uma significativa capacidade de reduzir a inflamçao causada em camundongos( BIRADAR et al., 2010).

Em um estudo realizado pelo departamento de farmacologia da universidade de medicina no iraque mostrou que a inflamação foi produzida pela carragenina em ratos e comparada com grupos tratados com salina e aspirina comprovou resultados sugerindo que o extrato metanólico de rizomas de *Cyperus rotundus*, outra importante fonte dos sesquiterpenos poderia ser usada para o desenvolvido de antiinflamatórios candidatos para o tratamento de doenças com processos inflamatorios mediadas produção de óxido nitrico (NO) e O<sub>2</sub> ( AL-SNAFI, 2017).

O presente trabalho demostra com auxilio de outros estudos e pesquisadores que avaliaram a atividade anti-inflamatória da planta *Cyperus rotundus* que possui em sua composição a Nootkatone e Valencene e demonstraram a capacidade do efeito inibitório de compostos dessas plantas sobre a produção de óxido nítrico (NO), como foi relatado por exemplo no trabalho executado por Jung et al., (2013) onde puderam comprovar a efetivação inibitória da *Cyperus rotundus* sobre a produção de NO em células RAW 264.7 submetidas a tratamento com fração isolada n-hexano dessa planta.

Para a investigação do efeito antiinflamatório foi utilizada a metodologia de indução do edema de orelha por óleo de Croton em camundongos, sendo estes previamente tratados com os compostos.

Na figura 1 os animais foram pré-tratados com Nootkatone nas doses de 300,100 e 10 mg/kg. Para controle foi usada a Dexametasona que apresentou 90,2% da redução do edema provocado pelo óleo de Croton, enquanto que a redução do edema provocado pela dose de 300mg/kg da Nootkatone mostrou 32,4% da redução, para a dose de 100mg/kg foi reduzido 21,2% e a dose de 10mg/kg 30%. Demonstrando que as doses administradas da substancia não apresentaram relevância significativa quando comparada a droga controle.

Para a figura 2 os animais foram pré-tratados com Valencene com doses de 300, 100, e 10mg/kg seguindo o uso da Dexametasona como droga controle, sua redução foi de 89,8% do

edema. Para a dose de 300mg/kg houve uma redução de 38% do edema sendo uma resposta melhor que a dose de 100mg com uma redução de 20,5% e sem apresentar diferença com a solução salina, contudo a dose de 10mg/kg reduzindo 23,5% mostrou resultado significativo semelhante a dose de 300mg/kg levando em conta sua eficácia.

### Atividade Anti-inflamatória tópica:

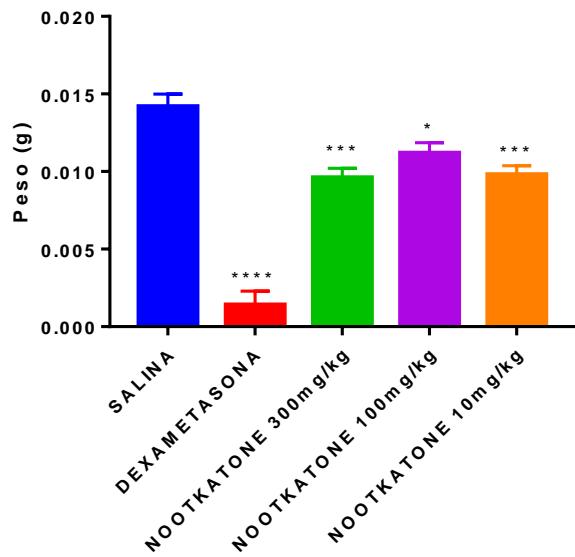


FIGURA 1: Edema de orelha induzido por aplicação tópica de óleo de crotón. *Resultado do valor médio do volume das orelhas após quatro horas com animais pré-tratados com NOOTKATONE. Percentual médio referente à massa final (peso em gramas) das orelhas de camundongos. a4 = p < 0,0001 vs salina; a3=p<0,001 vs salina; a1=p< 0,05 vs salina. ANOVA seguida do Teste de Tukey.*

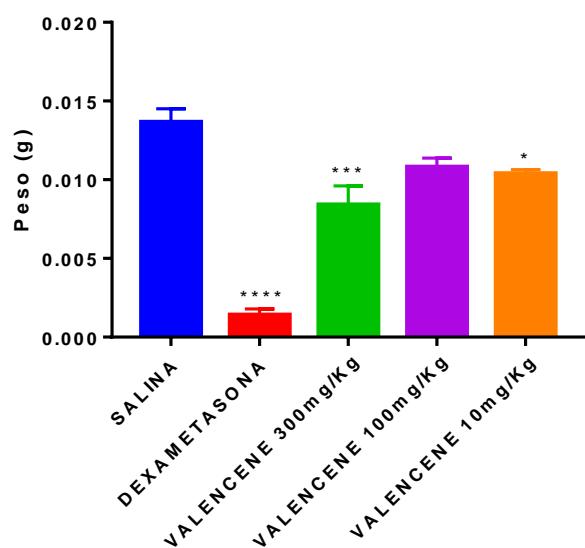


FIGURA 2: Edema de orelha induzido por aplicação tópica de óleo de crotón. *Resultado do valor médio do*

volume das orelhas após quatro horas com animais pré-tratados com VALENCENE. Percentual médio referente à massa final (peso em gramas) das orelhas de camundongos. a4 = p < 0,0001 vs salina; a3=p<0,001 vs salina; a1=p< 0,05 vs salina. ANOVA seguida do Teste de Tukey.

## 4 CONCLUSÃO

Após os testes realizados pode ser visto que com relação a inflamação foi mostrado que não houve diferença significativa dos resultados quanto a droga já usada, sendo necessário o desenvolvimento de mais pesquisas relacionadas aos mecanismos aos quais os compostos podem estar envolvidos no processo da inflamação.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. Z. **Plantas Medicinais**,3<sup>a</sup> Edição. Salvador: EDUFBA,2011. p.221

**AL-SNAFI A. E.** *Cyperus rotundus* A potencial medicinal plant.

**APARECIDA, M. et al.** **PLANTAS MEDICINAIS: A NECESSIDADE DE ESTUDOS MULTIDISCIPLINARES**Quim.

**Arnous A. H.; Santos A. S.; Beinne R. P. C.** PLANTAS MEDICINAIS DE USO CASEIRO - CONHECIMENTO POPULAR E INTERESSE POR CULTIVO COMUNITÁRIO

BADKE, R. et al. Saberes E Práticas Populares De Cuidado Em Saúde Com O Uso De Plantas Medicinais. 2012.

BALBINO, E. E.; DIAS, M. F. Farmacovigilância: Um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Brazilian Journal of**

BRASIL, Decreto n° 24.645 de 10 julho de 1934

BRASIL. Lei n °. 6638 de 8 de maio de 1979. Estabelece normas para a prática didática - científica da viviseção de animais e determina outras providências.

BRASIL, Lei Federal nº 9605 do ano 1998.

BRASIL, Lei Federal nº 11.794 de 2008 sobre Princípios Éticos da Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

BAZZANO, F. C. O. Aspectos éticos da pesquisa científica, p. 149-180. In: SILVA, J.V. **Bioética: meio ambiente, saúde e pesquisa.** 1<sup>a</sup> ed. São Paulo: Iátria, 2006.

BRASILEIRO, B. G et al. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no "Programa de Saúde da Família", Governador Valadares, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 629-636, 2008.

BEEKWILDER, J. et al. Valencene synthase from the heartwood of Nootka cypress (*Callitropsis nootkatensis*) for biotechnological production of valencene. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, n. 2, p. 174–182, 2014.

CARTAXO, S. L.; DE ALMEIDA SOUZA, M. M.; DE ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326–342, 2010.

**CHOI H. J.; LEE J. H.; JUNG Y. S.** (+)-Nootkatone inhibits tumor necrosis factor  $\alpha$ /interferon  $\gamma$ -induced production of chemokines in HaCaT cells  
**FELTRE, R.** **Química Orgânica**. 6<sup>a</sup> ed. São Paulo: Moderna. 2004.

FIRMO, W. D. C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cad. Pesq.**, v. 18, n. n. especial, p. 90–95, 2011.

FIRMO, W. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, n. - especial, 2012.

FOGLIO, M. A. et al. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Construindo a história dos produtos naturais**, v. 7, p. 1-8, 2006.

FURUSAWA, M. et al. Biotransformation of citrus aromatics nootkatone and valencene by microorganisms. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 53, n. 11, p. 1423-1429, 2005.

JIN, J. H. et al. Anti-allergic activity of sesquiterpenes from the rhizomes of *Cyperus rotundus*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 2, p. 223-228, 2011.

**JUNG, S. H. et al.**  $\alpha$ -Cyperone, isolated from the rhizomes of *Cyperus rotundus*, inhibits LPS-induced COX-2 expression and PGE2 production through the negative regulation of NF $\kappa$ B signalling in RAW 264.7 cells. **J Ethnopharmacol**, v. 147, n. 1, p. 208-14, Mai 2013.

LEONHARDT, R. H.; BERGER, R. G. Nootkatone. **Biotechnology of Isoprenoids**. Springer, Cham. p. 391-404, 2014

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LANDMAN, M.T.R.L.; CASTRO, M.S.A.; LIMA, T.C.M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. SBPC, Campinas-SP, 2008

MILLEZI, A. F. et al. Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 1, p. 18–24, 2014.

**PARISI, L. et al.** Natural Killer Cells in the Orchestration of Chronic Inflammatory Diseases. **J Immunol Res**, v. 2017, p. 4218254, 2017.

**Pharmacognosy**, v. 20, n. 6, p. 992–1000, 2010.

**PAESE K.** Desenvolvimento tecnológico, estudo da fotoestabilidade e avaliação da

permeação cutânea *in vitro* da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorpoadas em diferentes veículos semi-sólidos.

ROSSATO, M. et al. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto & contexto enfermagem**, v. 21, n. 2, 2012.

SANTANA, P. S. et al. Efeito Antibacteriano e Antifúngico de Extratos Etanólico, Hexânico e Metanólico a Partir de Folhas de Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers (Malva Corama) Contra Cepas Multi-Resistentes a Drogas. **Biota Amazônia**, v. 6, n. 1, p. 64–69, 2016.

SEO, E. J. et al. Antiplatelet effects of Cyperus rotundus and its component (+)-nootkatone. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 1, p. 48–54, 2011.

SOWDEN, R. J. et al. Biotransformation of the sesquiterpene (+)-valencene by cytochrome P450 cam and P450 BM-3. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 3, n. 1, p. 57-64, 2005.

VIZZOTTO, M. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado**, v. 1, n. 2, p. 16, 2010.