



• U • C •

FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

ANA SOFIA LOURENÇO JARDIM

BETULA SPP NA CLÍNICA: EVIDÊNCIA CIENTÍFICA

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE PLANTAS MEDICINAIS NA PRÁTICA CLÍNICA

Trabalho realizado sob a orientação de:

PROF. DOUTOR CELSO PEREIRA

DR^a GRAÇA LOUREIRO

MARÇO/2019

BETULA SPP NA CLÍNICA: EVIDÊNCIA CIENTÍFICA

Artigo de revisão

Trabalho final do 6ª ano do Mestrado Integrado em Medicina, com vista à atribuição do grau de Mestre em Medicina

Aluna

Ana Sofia Lourenço Jardim

Aluna do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina

Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

asljardim@gmail.com

Orientador

Prof. Doutor Celso Pereira

Professor Auxiliar Convidado da Unidade Curricular de Plantas Medicinais na Prática Clínica, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal – Azinhaga de Santa Comba, 3000-354, Coimbra

celsopereira.pt@gmail.com

Coorientadora

Dr.ª Graça Loureiro

Imunoalergologia, Assistente Graduada do Serviço de Imunoalergologia, Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal – Praceta Prof. Mota Pinto, 3000-075, Coimbra

gracamloureiro@hotmail.com

ÍNDICE

Resumo	3
Abstract	4
Lista de Abreviaturas.....	5
Introdução	7
Material e Métodos.....	11
Resultados	13
1. Efeito antimicrobiológico.....	13
2. Efeito nefrourolinário	17
3. Efeito dermatológico.....	19
4. Efeito anti-inflamatório.....	23
5. Efeito endócrino-metabólico	26
6. Efeito neuroprotetor.....	31
7. Efeito oncoprotetor	32
7.1 Ácido betulínico.....	34
7.2 Betulina	39
Discussão e Conclusão.....	41
Referências Bibliográficas.....	44

RESUMO

Introdução: No mundo atual, as plantas medicinais têm ganho um crescente destaque, com as suas diversas propriedades biofarmacológicas a assumirem um papel cada vez mais importante. A Bétula é uma árvore pertencente à família *Betulaceae*, que, dadas as suas vastas ações terapêuticas, era utilizada empiricamente em tempos ancestrais. Com a extensa investigação desenvolvida nesta área e o atual avanço biotecnológico, tais ações vieram a ser sustentadas e outras tantas viriam a ser evidenciadas, motivo pelo qual é ainda hoje utilizada mundialmente.

Objetivo: Redigir uma revisão crítica que tem como finalidade indagar e reunir as principais e cientificamente sustentadas atividades biofarmacológicas da Bétula e seus principais fitoconstituintes, nomeadamente a betulina e o ácido betulínico.

Métodos: Através de uma pesquisa eletrónica nas bases de dados PubMed e Embase, foram recolhidos artigos que cumprissem os objetivos. Procedeu-se à sua revisão, e à organização dos principais benefícios associados a esta planta por temas.

Resultados: Tendo em conta a informação disponível, foi possível agrupar os principais efeitos associados a esta planta em: antimicrobiológicos, nefrourinários, dermatológicos, anti-inflamatórios, endócrino-metabólicos, neuroprotetores e oncoprotetores. A evidência científica revela resultados promissores em todas estas áreas, fazendo desta planta medicinal, e respetivos bioativos, potenciais agentes terapêuticos.

Conclusão: A informação científica atual, além de suportar o uso empírico e ancestral desta árvore, e de desvendar outras tantas aplicações, sustenta também o seu bom perfil de segurança e elevada eficácia. A evolução biotecnológica permitiu estudar os mecanismos subjacentes a estes efeitos e melhorar limitações relativas à biodisponibilidade destes bioativos, ambicionando, um dia, a sua aplicação clínica. Contudo, são necessários mais estudos, nomeadamente *in vivo* que comprovem tais achados.

Palavras-chave: *Betula spp*, Bétula, betulina, ácido betulínico, queratose actínica, infeções urinárias

ABSTRACT

Introduction: Nowadays, medicinal plants are reaching a spotlight, with their biopharmacological properties taking a centre stage in human health. Birch is a tree from the *Betulaceae* family, which has been used empirically since ancestral times, due to its wide therapeutic actions. Through unceasing investigation, researchers have been able to gather the necessary scientific evidence to prove such therapeutic properties, sustaining current uses. Nevertheless, the latest advances also allowed to unveil new ones.

Objective: To write a critical review, aiming to compile and describe the main scientifically sustained biopharmacological properties of birch tree and of its main phytoconstituents: betulin and betulinic acid.

Methods: Scientific articles that fulfil the objectives were selected from Pubmed and Embase databases. They were reviewed and the major benefits of birch were organized according to therapeutic properties.

Results: The main effects of birch were grouped into: anti-microbiological, nephro-urinary, dermatological, anti-inflammatory, endocrine-metabolic, neuroprotective and oncological. The collected information shows enough scientific evidence to support such properties, reflecting birch's potential therapeutic application.

Conclusion: The state-of-play concerning birch supports its empiric and ancestral use. Moreover, new applications have also been discovered, while the safety and efficacy of this medicinal plant were confirmed. Through biotechnological progress, researchers revealed the underlying mechanisms of action and, at the same time, improved some limitations of these bioactives, specially their decreased bioavailability. Although more studies, particularly *in vivo*, are still needed to corroborate these findings, today's scientific evidence allows us to believe that, in the coming years, a clinical application of birch might actually be achieved.

Keywords: *Betula spp*, Betula, betulin, betulinic acid, actinic keratosis, urinary tract infections

LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-LOX** – araquidonato 5-lipoxigenase
- AA** – ácido araquidónico
- AK** – queratose actínica
- Bcl-2** – *B-cell lymphoma 2*
- CAT** – catalase
- COX** – ciclo-oxigenase
- cPLA2 α** – fosfolipase A2 alfa citosólica
- DNA** – ácido desoxirribonucleico
- EBV** – vírus *Epstein-Barr*
- EMA** – *European Medicines Agency*
- GLUT** – transportador de glicose
- HDL** – lipoproteína de alta densidade
- HSV** – vírus *Herpes Simplex*
- IC50** – 50% da concentração inibitória máxima
- IFN γ** – interferão gama
- IL** – interleucina
- iNOS** – sintetase de óxido nítrico
- ITU's** – infeções do trato urinário
- LDL** – lipoproteína de baixa densidade
- LPS** – lipopolissacarídeo
- MIC** – concentração mínima inibitória
- MMP's** – metaloproteinases da matriz
- mRNA** – ácido ribonucleico mensageiro
- ON** – óxido nítrico
- PGE₂** – prostaglandina E₂
- PLA2** – fosfolipase A2
- ROS** – espécies reativas de oxigénio
- SM** – síndrome metabólica
- SOD** – superóxido dismutase
- STAT3** – proteína 3 do sinal de transdução e ativação da transcrição
- TFG** – taxa de filtração glomerular
- TGF- β 1** – fator de transformação do crescimento β 1
- TNF- α** – fator de necrose tumoral alfa
- TPA** – *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*
- TryS** – tripanotiona sintase

UV – radiação ultravioleta

VEGF – fator de crescimento de endotélio vascular

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tem-se assistido à emergência das plantas medicinais nos países ocidentais, ainda que sob vigilância e legislação apertada, com algumas a serem integradas pela Medicina científica. (1)

A Bétula, tradicionalmente conhecida como Videiro, é uma árvore pertencente à família *Betulaceae*, abundante nas regiões temperadas e montanhosas do hemisfério Norte. (2-5) Pode atingir os 20 metros de altura e a sua casca é caracteristicamente branca e riscada, como se pode observar na Figura 1. (4) Desde há longa data que é usada como planta medicinal, sendo a sua casca, raízes, folhas (observáveis na Figura 2), rebentos e óleos essenciais utilizados com esse fim. Pode ser aproveitada sob a forma de decoção de casca ou folhas, aplicação tópica de óleos essenciais, ou ingestão da seiva. Atualmente, também a maceração de vários constituintes é utilizada em diferentes formulações farmacêuticas. (3, 4, 6, 7)



Figura 1: *Betula spp* (casca)

Imagem obtida do *website* de acesso livre sem copyright, acedida em 19/03/2019,

(<https://pixabay.com/photos/birch-trees-forest-trunks-pattern-1029086/>)



Figura 2: *Betula alba*
(amentos e folhas)

Imagem autorizada, cordialmente cedida pelo Jardim Botânico da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, a 18/03/2019

(https://jb.utad.pt/especie/Betula_alba#imagem-6636)

Há registo do seu uso ancestral, pelo menos desde o século XI, no tratamento de diversos distúrbios, como inflamações (nefrite, cistite e artrite), patologias dermatológicas (piodermites, alopecia, contusões e soluções de continuidade cutâneas), infeções, problemas gástricos, distúrbios do trato urinário, tosse, febre, prurido, patologia reumatismal, convulsões, neoplasias, hipercolesterolemia, diabetes e obesidade. (2-4, 6-8) O principal efeito que lhe é atribuído é o diurético, para o qual se usam as folhas e rebentos. (3, 6, 9, 10) O seu uso regulamentado data a 1956 na Polónia, 1976 na Alemanha e 1981 em França. Atualmente existem comercializadas diversas formas farmacêuticas na União Europeia, com indicação para queixas *minor* do trato urinário. (7) Na Rússia, a *Gemmae Betulae*, uma mistura de rebentos de Bétula, é utilizada como diurético. (3) No norte da China, a seiva da Bétula é uma bebida tradicional, consumida fresca, concentrada ou

fermentada. (6) Em Portugal, são comercializadas muitas formulações que contêm Bétula na sua composição, como suplementos alimentares, sob reduzida vigilância. Apenas existe uma formulação comercializada e aprovada pelo Infarmed, o Episalvan[®]. Trata-se de um gel, que está indicado no tratamento de feridas cutâneas superficiais de adultos. Dever-se-á aplicar, a cada troca de penso, uma fina camada deste gel sob a ferida e proceder à reoclusão do penso. A sua aplicação evidencia uma redução do tempo de cura e ausência de efeitos secundários graves. (11)

Cientificamente, quer extratos completos da árvore quer dos seus bioativos têm demonstrado evidência de diferentes efeitos farmacológicos, *in vitro* e *in vivo*. É disso exemplo a ação imunomoduladora, antioxidante, hepato, dermo, nefro e neuroprotetora, antimicrobiológica, endócrina, anti-inflamatória e antineoplásica, com as duas últimas a adquirir importante expressão. (5, 8, 12-18) Apesar de a evidência científica atual ser pouco robusta, o seu uso tradicional, seguro e eficaz há mais de 30 anos, foi reconhecido e objeto de uma monografia pela *European Medicines Agency* (EMA), estando englobada na área terapêutica das doenças do trato geniturinário. A EMA reconhece o uso empírico das suas folhas e indica-o no tratamento de problemas *minor* do trato urinário, face à sua ação diurética, recomendando uma concomitante ingestão hídrica mínima de 2L/dia. (7)

A casca da Bétula é composta, maioritariamente, por triterpenos pentacíclicos. (8, 19-21) De forma geral, na casca, destaca-se a presença de betulina, ácido betulínico, lupeol, e outros compostos *minor*, como o ácido oleanólico, ácido ursólico, eritrodioleol e glicosídeos fenólicos. (4, 8, 10, 19) Nesta planta medicinal existem igualmente ácidos linoleico e palmítico, quercetina, flavonoides, compostos fenólicos, óleos essenciais e hiperósidos. (4, 7, 22) A seiva é particularmente rica em vários aminoácidos, minerais e vitaminas. (6)

Apesar de ser unânime que a betulina é o constituinte *major* da casca da Bétula, a percentagem de bioativos presentes nesta árvore, quer em termos de quantidade, quer de qualidade, depende de algumas variáveis: da espécie de Bétula, da parte específica da planta, da idade e maturação da árvore, da localização geográfica, do solo, da estação do ano, do método de extração e do solvente utilizado. (12, 23-25) Em 2012, um grupo obteve, a partir da casca de *Betula pendula*, um máximo de 97% de betulina. Outros estudos registam, contudo, percentagens de 22%, 34%, 57% e 60%. (12, 21, 26)

A betulina é um triterpeno pentacíclico, inicialmente isolado em 1988. Está presente em diversas fontes naturais, porém o seu grande reservatório é a casca da Bétula, de onde é possível a sua extração em grande escala. Pode igualmente ser encontrada, em menor quantidade, nas folhas e raízes desta árvore. A juntar à grande disponibilidade de betulina na casca da Bétula, o facto desta casca ser considerada desperdício industrial, particularmente

na indústria do papel, faz dela uma potencial e disponível fonte de extração deste bioativo. (23, 24)

Há vários métodos de extração e purificação da betulina. Em 2016, atingiram-se valores de purificação acima de 99%. Há evidência de que o nível de pureza se correlaciona com a atividade biológica. Exemplo disso é o facto de que, quanto maior a pureza, maior a citotoxicidade para células do cancro da mama. (23)

O ácido betulínico é igualmente um triterpeno pentacíclico que pode ser extraído da casca da Bétula. (26, 27) Porém, a quantidade deste na sua forma natural é insuficiente para uma rendibilidade industrial, pelo que se tem apostado na sua semissíntese a partir da betulina que, através de um processo de oxidação, se pode facilmente converter em ácido betulínico. (24, 26, 28)

Existe evidência que triterpenos da Bétula, como a betulina e o ácido betulínico, possam representar mecanismos intrínsecos de defesa da planta. (21, 25) À semelhança da Bétula, estes dois bioativos apresentam igualmente vasta atividade biofarmacológica. (24, 26, 27, 29)

Os perfis farmacocinéticos e/ou de toxicidade são uma grande limitação da utilização destes fitoquímicos na prática clínica. (1) Os triterpenos têm evidenciado baixa toxicidade, porém também têm uma baixa solubilidade. A fraca solubilidade da betulina em água tem dificultado o estudo da sua eficácia biológica e consequente aplicabilidade farmacológica, e explica a maior investigação do seu derivado ácido betulínico, que tem melhor biodisponibilidade. (20, 29) Com o avanço biotecnológico, têm-se procurado alternativas que contornem estas dificuldades, de forma a aplicar as propriedades evidenciadas. Atualmente, existem modificações estruturais e propostas biotecnológicas de administração, como nanopartículas, capazes de alterar a sua farmacocinética e biodisponibilidade e, consequentemente, a sua eficácia. (1, 29, 30)

Não são conhecidos efeitos secundários graves associados ao uso correto e em doses terapêuticas destes bioativos. Estão relatados alguns efeitos adversos, embora em frequência desconhecida, como rinorreia, prurido, *rash*, urticária, irritação cutânea, diarreia, náuseas, vômitos e epigastralgias. (7)

Genericamente, as interações farmacológicas mais reportadas são com diuréticos, nomeadamente clorotiazida, furosemida e hidroclorotiazida, pela potenciação do seu efeito. (7)

Desaconselha-se o uso desta planta em edemas resultantes de condições com reduzida função cardíaca ou renal, e em condições nas quais um aporte hídrico limitado esteja indicado. Por não existirem estudos em populações especiais, desaconselha-se igualmente o seu uso

durante a gravidez e lactação, e a administração a crianças menores de 12 anos. Pacientes com alergia mediada por IgE ao pólen de Bétula, também não deverão usar qualquer preparação com estes bioativos pelo risco potencial de alergia. (7)

Pretendeu-se, com este trabalho, realizar uma revisão crítica da literatura disponível referente às aplicações médicas da *Betula spp* e dos seus principais fitoconstituintes. Baseando-se na evidência científica disponível e mais atualizada, objetivou-se reunir informação quanto às potencialidades *major* desta planta, com especial atenção aos seus efeitos farmacológicos, a saber: antimicrobiológicos, nefrourinários, dermatológicos, anti-inflamatórios, endócrino-metabólicos, neuroprotetores e oncoprotetores. Pretendeu-se igualmente avaliar a eventual aplicabilidade terapêutica de tais propriedades na prática clínica, a nível de segurança e eficácia.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a elaboração desta revisão bibliográfica, foi realizada uma pesquisa eletrônica nas bases de dados PubMed e Embase. Foi também consultado o *website* da EMA.

O objetivo foi recolher bibliografia relativa às potenciais aplicações médicas da Bétula e seus principais constituintes, betulina e ácido betulínico. No *website* da EMA, pesquisou-se o termo “Betula”, tendo sido recolhida a informação disponível considerada relevante. Nas bases de dados, foi feita uma pesquisa geral, por forma a investigar as suas possíveis aplicações farmacológicas, sendo posteriormente a pesquisa direcionada às áreas de ação *major*: inflamação, infeção, endócrina-metabólica, dermatológica, urinária, oncológica e neuroprotecção.

Como palavras-chave usaram-se termos MeSH representativos de cada uma das áreas, conjugados com as palavras “Betula”, “betulinic acid” e “betulin”, sendo a equação base a seguinte: ("termo1"[MeSH] AND ("betula"[MeSH] OR "betulin"[All Fields] OR "betulinic acid"[All Fields])). Nos termos compostos, utilizou-se: ("palavra1 palavra2 "[MeSH] OR ("palavra1"[All Fields] AND "palavra2"[All Fields])) AND ("betula"[MeSH] OR "betulin"[All Fields] OR "betulinic acid"[All Fields]). Os termos MeSH de cada área podem ser consultados na tabela 1.

Tabela 1: Termos MeSH utilizados e respetiva área de aplicação

Área de aplicação	Termos MeSH
Geral	Protective effects; Therapeutic use; Properties; Pharmacological applications.
Inflamação	Anti-inflammatory agents; Inflammation.
Dermatológica	Actinic keratosis; Dermatologic agents; Skin diseases; Wound healing.
Urinária	Urologic diseases; Urinary tract infections; Diuretics; Urolithiasis.
Endócrino-metabólica	Diabetes; Hypoglycemic agents; Hyperglycemia; Obesity; Anti-obesity agents; Metabolic syndrome.
Oncológica	Neoplasms; Antineoplastic agents; Angiogenesis inhibition.

Tabela 1: Termos MeSH utilizados e respetiva área de aplicação (continuação)

Área de aplicação	Termos MeSH
Infeção	Antiparasitic agents; Antiprotozoal agents; Anti-infective agents; Anthelmintics; Antibacterial agents; Antifungal agents; Antiviral agents.
Neuroproteção	Neuroprotection; Memory; Nervous system.

Referências bibliográficas de alguns dos artigos resultantes desta pesquisa, se consideradas pertinentes, foram também consultadas e incluídas. Deu-se primazia aos artigos publicados entre 2008 e 2018. Não obstante, artigos anteriores considerados relevantes, foram também recolhidos. Apenas se incluíram artigos redigidos em inglês. Foram analisados artigos de revisão, ensaios clínicos e estudos *in vitro*, *in vivo* e *in silico*.

A revisão apenas se concentrou em publicações relativas à área médica, farmacológica e bioquímica, tendo sido excluídas publicações com carácter alternativo/complementar ou tradicional, nomeadamente artigos publicados nas seguintes revistas: Fitoterapia, J Ethnopharmacol, J Nat Prod, Nat Prod Res, Pharmacogn Mag, Hereditas, Complement Ther Med, Journal of Phytomedicine, Avicenna Journal of Medical Biotechnology, Journal of Alternative and Complementary Medicine, BMC Complementary and Alternative Medicine, Planta Medica, Afr J Tradit Complement Altern, Nat Med, Nat Prod Commun, American Journal of Chinese Medicine.

Para complementar a informação recolhida, foi também consultado o *website* clinicaltrials.gov, onde se pesquisaram os termos “betulin” e “betulinic acid”, para identificar eventuais ensaios clínicos.

A pesquisa, decorrida entre agosto de 2018 e janeiro de 2019, foi conduzida por um único revisor, que selecionou a bibliografia pertinente de entre todos os resultados obtidos. No total, cerca de 400 artigos cumpriam as premissas previamente descritas. Destes, foi feita uma seleção tendo em conta a sua relevância científica e atualização, e foram excluídos dados repetidos. Restaram 65, tendo sido estes a base da redação desta revisão.

RESULTADOS

1. Efeito antimicrobiológico

Os microrganismos multirresistentes têm vindo a aumentar, sendo este já considerado um dos problemas emergentes do século XXI. Como tal, tem sido movida uma pesquisa de novas estratégias terapêuticas, onde as plantas têm adquirido um crescente interesse. (31, 32)

Há vários estudos que comprovam a eficácia antibacteriana da Bétula. Já em 2000 havia evidência de que o extrato de *Betula pubescens* demonstrava uma atividade potente para *Staphylococcus aureus* e ligeira para *Escherichia coli*. (14) Em 2012 havia menção à influência da *B. pendula* no crescimento de diferentes espécies bacterianas, como o *Bacillus cereus*. (22)

Um estudo de 2014, testou a eficácia de extratos aquosos e alcoólicos de rebentos de *Betula verrucosa* para *Chromobacterium violaceum*, um cocobacilo multirresistente. O *quorum sensing* é um mecanismo bacteriano de comunicação célula-a-célula, que lhes confere proteção. Os investigadores colocaram o inóculo em contacto com os extratos por 24 a 48h e avaliaram a atividade antimicrobiana direta através da área de inibição de crescimento bacteriano e a atividade anti-*quorum sensing* pela inibição da produção de violaceína, um pigmento produzido por este cocobacilo e que é indicador deste mecanismo. Verificaram uma potente atividade anti-*quorum sensing*, com áreas de inibição de pigmentação demarcadas, mais expressiva com os extratos alcoólicos, imputando tal efeito à Bétula. (32)

Em 2012, um grupo de investigadores testou a eficácia antimicrobiana de extratos de casca de *Betula alnoides* obtidos com diferentes solventes. Usaram estirpes de *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* e *S. aureus*, patogêneos normalmente associados a infeções em humanos. Incubaram inóculos de cada uma das estirpes com diferentes concentrações de extrato durante 24h. O crescimento bacteriano foi avaliado, subjetivamente, pelo grau de turvação, e definiram a concentração mais baixa a impedir o crescimento de microrganismos como concentração mínima inibitória (MIC). As tetraciclinas serviram de controlo. Usaram igualmente o ensaio do disco de papel: os patogênicos foram espalhados em placas de agar juntamente com um disco seco saturado em extrato de *B. alnoides*, durante 24h. A atividade antibacteriana foi avaliada pelo diâmetro livre de crescimento bacteriano. No final observaram que a ação antimicrobiana da Bétula é variável conforme o solvente, com MIC's diferentes para cada um. No ensaio do disco, o melhor resultado foi para a *E. coli*, onde se verificou um diâmetro de $8,17 \pm 0,77$ mm, tendo o controlo $16,15 \pm 0,14$ mm. Tais resultados sustentam, assim, o uso tradicional desta planta em processos infecciosos. (2)

Além da Bétula, também os seus bioativos foram já testados quanto a este efeito. Rauha JP *et al.* estudaram a influência da rutina e quercetina no crescimento bacteriano. Enquanto que a rutina não revelou qualquer efeito antimicrobiano, a quercetina revelou-se fortemente eficaz para *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Micrococcus luteus*, moderadamente eficaz para *B. subtilis* e *E. coli* e ligeiramente eficaz para *Pseudomonas aeruginosa*. (14) Já o ácido betulínico, num estudo, demonstrou-se ineficaz para *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* e *M. luteus*, embora haja evidência da sua atividade, noutros estudos, para estas e outras bactérias. (24, 33)

A betulina foi também testada quanto a uma potencial atividade antibiofilme, já que a formação deste é um dos mecanismos responsáveis pela resistência a antibióticos. Demonstrou uma inibição da sua formação de 93%. Na adesão do *Streptococcus mutans*, condição crítica e inicial à patogénese do mesmo, demonstrou-se uma inibição de 71%. Além do mais, não afetou a viabilidade celular, o que é desejável por forma a evitar resistências, nem revelou citotoxicidade. (34)

Em 2017, tendo em conta o efeito antibacteriano e antioxidante evidenciado pela betulina e dos ácidos betulínico e ursólico, um grupo de trabalho investigou se a génese de espécies reativas de oxigénio (ROS) lhe estaria subjacente. Demonstraram atividade antibacteriana das 3 substâncias para *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, reduzindo a sua viabilidade celular. Todos os bioativos, em especial o ácido ursólico, promoveram o aumento de ROS, sustentando-se assim tal hipótese. (33)

Face ao espetro antibacteriano demonstrado, vários autores consideram promissora a utilização da Bétula e/ou seus fitoconstituintes em dentífricos, para prevenção e tratamento da placa dentária, ou como conservantes alimentares. (14, 34)

No que respeita à atividade antiviral, já em 2004 se demonstrava que a betulina era eficaz na inativação do vírus *Herpes Simplex (HSV)* 1 e 2. Ainda que a sua atividade fosse inferior à do aciclovir, a combinação de ambos evidenciou sinergismo contra *HSV1*. (35) A betulina mostrou efetividade para *ECHOvirus-6*, à semelhança do ácido betulínico, e alguns dos seus derivados têm mostrado atividade sobre o *Vírus Influenza A H1N1* e o *Vírus do Papiloma Humano*. (36)

O ácido betulínico é eficaz para *HSV1*, *Vírus Influenza A/PR/8* e vírus de Hepatite B, mas inativo para *Vírus Influenza FPV/Rostock*. O ácido oleanólico demonstrou inibir o vírus da Hepatite C. (24, 36)

A infeção pelo vírus *Epstein-Barr (EBV)* é, na maior parte dos casos, latente e está associada a algumas neoplasias. Dado que os antivirais atuais são habitualmente ineficazes, em 2017,

um estudo aprofundou a atividade do ácido betulínico nesta infecção. Testaram a aplicabilidade do ácido betulínico e do chidamide, por si só, e depois avaliaram a sua atividade conjunta. *In vitro*, utilizaram células de linhagem linfoblástico transformadas pelo *EBV* e adicionaram diferentes doses de ácido betulínico ou chidamide. *In vivo*, induziram um tumor xenográfico dependente do *EBV* em ratinhos e, após 2 dias, iniciaram o tratamento com ácido betulínico, chidamide ou ácido betulínico/chidamide. Após o tratamento com ácido betulínico, observou-se uma diminuição da expressão da superóxido dismutase (*SOD*), um aumento do *stress* oxidativo, dano de ácido desoxirribonucleico (*DNA*) e apoptose. Observou-se igualmente uma ligeira inibição da replicação viral, atribuível ao *stress* oxidativo, sendo a sua ligeira ação explicada pelo facto do *EBV* latente não ser sensível a esta substância. O chidamide ativou o *switch* do *EBV* de fase latente para fase lítica. A combinação destas substâncias, *in vitro* e *in vivo*, potenciou o *stress* oxidativo e suprimiu sinergicamente a replicação do *EBV* em cerca de 70% a 80%. Houve também inibição do crescimento tumoral, melhorando a sobrevivência dos ratinhos. Não se verificaram efeitos deletérios em células normais. Os autores assumem esta combinação como uma eficaz estratégia antiviral, atribuindo este sinergismo à ativação do *EBV*, mediada pelo chidamide, com posterior sensibilização viral à ação do ácido betulínico. (37)

O efeito antifúngico da Bétula é controverso. Embora tenha sido demonstrado em 2015, num estudo *in vitro* com extratos de folhas, ramos e seiva de *B. papyrifera* para *Candida albicans*, outros estudos refutam-no. (31) De facto, numa publicação de 2012, um extrato de casca de *Betula alnoides* para *C. albicans* e *Pichia jadinii*, não revelou qualquer atividade inibitória quanto a estes fungos. (2) Não se sabe ao certo quais os bioativos envolvidos nesta propriedade. Estudos com quercetina e rutina também não evidenciaram atividade para *Aspergillus niger*, *C. albicans* ou *Saccharomyces cerevisiae*. (14) Porém, há registos da eficácia de ácido betulínico para *Microsporum canis* e *C. albicans*. (10)

Os triterpenos da Bétula parecem defendê-la, nomeadamente de infestações por fungos. Neste sentido, um estudo averiguou a influência da betulina em alguns dos fungos conhecidos por a parasitar. Revelou que concentrações crescentes de betulina levavam a um crescimento mais disperso de micelas. Nos seus melhores resultados, mesmo pequenas concentrações inibiam o crescimento de *Fusarium dimerum*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium cyclopium*. O estudo apontou uma ação mais fungistática que propriamente tóxica, com supressão do crescimento fúngico. (21)

No que respeita à ação antiparasitária, há vários estudos que a suportam, nomeadamente a do ácido betulínico para *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major* e *Plasmodium falciparum*. (38) Outros, atribuem efeitos anti-helminthas ao ácido ursólico. (39)

Um estudo publicado em 1999 avaliou o efeito antiparasitário dos ácidos betulínico, ursólico e oleanólico e betulina em linhagens de *Plasmodium falciparum* sensível e resistente a cloroquina. A betulina não evidenciou atividade em nenhuma das variantes. Os restantes bioativos, demonstraram atividade moderada. O ácido betulínico foi o mais eficaz, com 50% da concentração inibitória máxima (IC50) de 19,6 µg/mL para a linhagem sensível e 25,9 µg/mL para a resistente. (24)

Em 2017, um estudo tentou identificar o mecanismo desencadeante da morte celular do protozoário *Trypanosoma cruzi* e, utilizando formas epimastigotas e tripomastigotas deste, testou o efeito do ácido betulínico no seu crescimento e viabilidade. Demonstrou-se inibição do crescimento da forma epimastigota e redução da viabilidade da forma tripomastigota, evidenciando um efeito seletivo e sem toxicidade celular. Utilizando posteriormente citometria de fluxo, observaram-se eventos característicos de necrose e apoptose celular. Estas alterações morfológicas e bioquímicas observadas nos protozoários tratados com ácido betulínico, juntamente com o aumento detetado da produção de ROS, são tidas como a chave dos mecanismos de morte celular deste protozoário. (38)

Em 2018, um outro projeto estudou o potencial dos ácidos ursólico e betulínico para *Syphacia oblevata*. *In vitro*, avaliou-se a mobilidade dos parasitas incubados em diferentes concentrações de cada composto. *In vivo*, administrou-se ácido betulínico, ácido ursólico e albendazol em ratinhos, e utilizou-se o teste da fita cola anal e disseção intestinal para contagem de ovos e parasitas, respetivamente. Ambos os compostos revelaram um efeito anti-helmíntico de forma dose dependente. O ácido betulínico revelou os melhores resultados, *in vitro* e *in vivo*. *In vitro*, em doses mais altas, induziu inclusivamente a morte dos parasitas mais rapidamente que o albendazol. *In vivo*, a administração de ácido betulínico por 5 dias reduziu significativamente a contagem de ovos e parasitas, comparativamente ao grupo sem qualquer tratamento, com a redução observada nas formas adultas a ser sobreponível à evidenciada pelo albendazol. (39)

A leishmaniose é uma doença tropical que pode adotar várias manifestações e os fármacos disponíveis para a sua erradicação, além de limitados, possuem sérios efeitos secundários e várias resistências. (30, 40) Neste sentido, novas estratégias terapêuticas têm sido perseguidas, especialmente direcionadas à atuação em mecanismos específicos da *Leishmania*. O metabolismo redox da *Leishmania* é diferente do dos humanos, e neste há uma enzima chave que parece promissora, a tripanotiona sintase (*TryS*). Em 2014, um grupo de investigadores, estudou o mecanismo de ação envolvido na morte da *Leishmania* dependente da betulina, comprovando a efetividade e seletividade desta substância, sem prejuízo para a célula hospedeira – demonstraram uma diminuição da concentração de

amastigotas intracelulares, sem qualquer toxicidade para os macrófagos, hospedeiros destes. Revelaram também que a betulina induzia *stress* oxidativo ao parasita, pela promoção da gênese de ROS. Os autores devem este efeito a uma provável inibição da *TryS*, apontando-a como mecanismo subjacente. Nos promastigotas, provavelmente também pelo *stress* oxidativo, observaram uma despolarização da membrana mitocondrial, com fragmentação de DNA e apoptose. (40)

De forma a ultrapassar as limitações biofarmacológicas destas moléculas, um estudo de 2018 propôs a utilização de nanopartículas no tratamento da leishmaniose. Submeteram macrófagos infetados com *Leishmania donovani* a um tratamento com *Lf-BANP*, nanopartículas esféricas de PLGA [poly (DL-lactide-co-glycolic acid)] com ácido betulínico no seu interior e cobertas com lactoferrina. No final, a contagem de amastigotas/100 macrófagos foi o termo de comparação entre o tratamento com estas moléculas ou apenas com ácido betulínico. Todas as formulações se mostraram eficazes para a *Leishmania*, sendo a *Lf-BANP* mais eficaz que o ácido betulínico por si só. As limitações biofarmacêuticas foram assim ultrapassadas, havendo uma potencial nova arma terapêutica para a *Leishmania*. (30)

2. Efeito nefrourinário

As infeções do trato urinário (ITU's) são das infeções mais comuns da comunidade, com a *E. coli* a ser um dos principais uropatógenos envolvidos. Depois de se ligarem ao hospedeiro, as bactérias têm capacidade para produzir biofilmes uroteliais, comprometendo os mecanismos de defesa do hospedeiro. (22) Na medicina tradicional, a Bétula é conhecida pelas suas ações diuréticas e bactericidas, sendo também utilizada nas ITU's. (41)

Registos dos anos 30 reportam que a administração de infusão de folhas de Bétula a coelhos e ratinhos, aumentou o seu volume urinário e a excreção de ureia e cloro. Porém, quando administrada a adultos saudáveis, não foi demonstrada qualquer diferença no aumento do volume urinário comparativamente à ingestão hídrica. Em 1998, 15 pacientes com ITU's foram tratados com infusão de folha de Bétula ou placebo. Nos que ingeriram a infusão, a contagem bacteriana urinária diminuiu 39%, no placebo diminuiu 18%. Em 1999, extrato seco de Bétula administrado a 1066 pacientes com ITU's, cistite inflamatória ou litíase renal, diminuiu os sintomas em 78%, 65% e 65%, respetivamente. Quer investigadores, quer pacientes, consideraram o uso desta terapêutica benéfica. (7)

Já em 2012, um estudo objetivou determinar a influência de um extrato de *Betula pendula* na *E. coli*, tendo concluído que esta planta reduzia significativamente a motilidade bacteriana,

assim como também evidenciava atividade antibiofilme. Utilizando uma dissolução de folhas secas reduzidas a pó em água destilada, com concentrações entre 0,125 e 20 mg/mL, verificou-se que a motilidade da *E. coli* diminuía de forma dose dependente, tal como a viabilidade e o crescimento bacteriano. Este extrato diminuiu igualmente a formação de biofilme, provavelmente por interferência na ligação das bactérias à superfície hospedeira, evidenciada através da disfunção das fímbrias P. (22)

Em 2017, um grupo utilizou o teste Microtox® para testar a toxicidade de uma infusão de folha de Bétula para *Vibrio fischeri*, uma bactéria semelhante à *E. coli*. Testaram diferentes concentrações, tendo a de 0,29 mg/mL demonstrado uma toxicidade de aproximadamente 60% e a de 5,89 mg/mL atingido valores próximos dos 100%, o que poderá sustentar um papel importante na medicina preventiva e curativa das ITU's. (41)

As infeções urinárias associadas a cateter são também bastante frequentes, sendo a atuação na formação de biofilme um importante passo na sua prevenção. Cistimev® é uma preparação com extratos de *Solidago virga-aurea*, *Orthosiphon stamineus*, *Betula spp* e *Vaccinium macrocarpon*, não comercializada em Portugal, mas com ampla prescrição na Europa. Com o objetivo de avaliar a sua eficácia na colonização microbiana e formação de biofilme em pacientes submetidos a cateterização urinária, dividiram-se pacientes com cateter urinário há mais de 3 meses em dois grupos – um tratado com 1 comprimido/dia de Cistimev® e o outro sem qualquer terapêutica. No dia 0, dia de troca de cateter, não se verificou diferença na positividade de uroculturas entre os dois grupos, e a superfície interna do cateter mostrava agregados de bactérias, cristais e células uroteliais. Após 30 dias, o grupo que tomou Cistimev®, revelou uma menor prevalência de uroculturas positivas (23,2% versus 53,3%) e uma menor quantidade de biofilme no lúmen dos cateteres. Tais resultados sugerem eficácia desta fórmula farmacêutica na redução da incidência de ITU's, podendo vir a ser utilizada como prevenção aquando destas intervenções, já que houve boa tolerabilidade e não houve efeitos secundários significativos. (42)

Está também publicado um outro estudo que avalia o efeito da associação de Cistimev® a antibioterapia profilática em mulheres com ITU's de repetição. Para tal, usaram-se dois grupos, um apenas sob uso exclusivo de antibioterapia e outro que foi submetido ao tratamento com a associação de Cistimev®, 1 comprimido/dia, com antibiótico. Em ambos os grupos, o tratamento durou 3 meses e o antibiótico foi escolhido consoante o teste de sensibilidades a antibióticos. Durante os 3 meses de tratamento, as taxas de recorrência não foram muito diferentes entre o grupo submetido à combinação e o grupo apenas sob antibioterapia. Porém, no ano após o término do tratamento, as doentes que tomaram Cistimev® apresentaram um maior intervalo de tempo sem ITU's e uma taxa de recorrência

2,5 vezes inferior às que apenas receberam antibioterapia. O facto de este estudo demonstrar melhores resultados a longo prazo, aponta benefício ao seu uso profilático, melhorando a qualidade de vida das doentes. (43)

Para as ITU's, a dose terapêutica recomendada mais consensual ronda os 750 a 1000 mg em comprimidos, de extrato seco de casca ou folha, por dia. Em alternativa, poder-se-á recomendar a infusão de 3 a 5 g de folhas em 150 a 250 mL de água, 2 a 3 vezes ao dia. (7)

A doença renal crónica é uma patologia progressiva caracterizada pela acumulação excessiva de matriz extracelular, levando a uma gradual disfunção glomerular e consequente diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG). A sua prevalência tem aumentado e a terapêutica atual é de suporte. (15, 44)

Um grupo de investigadores estudou a influência do ácido betulínico nesta doença. Utilizaram, para a sua simulação, uma dieta rica em adenina, que induz, a nível renal, fibrose e disfunção intersticial. Observaram que a administração de ácido betulínico diminuiu os níveis séricos de ureia, creatinina, ácido úrico e cistatina C, um marcador muito sensível de uma baixa TFG. Observaram também, no grupo submetido a tratamento, uma diminuição dos níveis do fator de transformação do crescimento $\beta 1$ (*TGF- $\beta 1$*), uma citocina pró-fibrótica com papel estabelecido na fibrose renal. Histologicamente, o tratamento com ácido betulínico melhorou significativamente as mudanças histopatológicas observadas no grupo com doença renal crónica, como a proliferação de fibroblastos ou acumulação de matriz extracelular e colagénio. (15) Os mesmos autores desenharam outro estudo semelhante para avaliar a ação do ácido ursólico. Quer pela diminuição dos marcadores de lesão renal, quer pela melhoria das alterações histopatológicas, comprovaram que também este fitoconstituente melhora os danos renais associados à doença renal crónica. (44) Os autores concluem assim que ambos os triterpenos se revelam promissores agentes nefroprotetores, sem quaisquer efeitos deletérios detetados. (15, 44)

Também na nefropatia diabética e membranosa, o ácido betulínico revelou ser um bom agente terapêutico, obtendo, na membranosa, resultados sobreponíveis aos da dexametasona. (16, 45, 46)

3. Efeito dermatológico

Os triterpenos têm demonstrado potencial na estimulação da cicatrização de feridas e promoção da regeneração da barreira epidérmica. (17) A betulina, por exemplo, é eficaz na cicatrização e modulação de respostas inflamatórias. (18)

Contudo, a grande expansão da Bétula na dermatologia deu-se aquando da comercialização de um gel semissólido cuja composição possui extrato seco de triterpenos da casca da Bétula numa percentagem de 10%, sendo os outros 90% óleo de girassol, sem quaisquer excipientes. Este gel, Oleogel-S10[®], disponível em alguns mercados europeus, tem sido objeto de ensaios dermatológicos, cujos resultados são encorajadores, com eficácia estabelecida ao nível da cicatrização e boa tolerabilidade. Em 2016 foi aprovado pela EMA como terapêutica tópica de contusões e soluções de continuidade cutâneas. (17) Este gel muda a sua viscosidade com o tempo. Quando agitado é menos espesso, facilitando a sua aplicação, vindo posteriormente a adquirir uma certa espessura que permite ocluir a ferida de forma estável. (18) Existe uma outra formulação em gel, o Episalvan[®], onde 1 g de gel contém 100 mg de extrato seco de casca de *B. pendula* e *B. pubescens*. Está disponível em Portugal, aprovado pelo Infarmed, mas sem registo de medicamento. É classificado como adjuvante à cicatrização e tem como indicação o tratamento de feridas cutâneas superficiais, em adultos. (11)

A betulina, tem o seu efeito dermatológico comprovado em vários estudos, maioritariamente após aplicação tópica. Diminuiu a perda transepidermica de água e melhorou a hidratação cutânea em pele previa e repetidamente exposta a uma solução de detergente, e foi eficaz no prurido cutâneo crónico e lesões de *grattage*. Há também um *case report* que afirma o seu benefício no tratamento de um paciente com *Herpes Zoster* necrotizante. (10) A sua eficácia foi igualmente demonstrada em queimaduras de 2º grau, onde o tempo até à reepitelização é crucial. (18)

Em termos de ensaios clínicos, na base de dados ClinicalTrials.gov, apenas há registo de um relativo ao ácido betulínico, que, entretanto, foi suspenso. Tratava-se de um ensaio clínico não randomizado com o propósito de avaliar a eficácia de um gel experimental, com 20% de ácido betulínico, no tratamento de *nevus* displásicos. Para a betulina existem 4 ensaios registados, três concluídos e um em recrutamento. Nos finalizados, dois estudaram a aplicação de Oleogel-S10[®] em feridas de doadores de enxertos cutâneos e o outro em queimaduras de 2º grau. Em fase de recrutamento está um ensaio em fase III, que pretende avaliar a eficácia e segurança do mesmo gel na epidermólise bolhosa *versus* placebo, com data estimada de fim para 2020. (47, 48) A informação atualmente disponível mostra-se promissora quanto à aplicação de emulsões de betulina, nomeadamente na queratose actínica, epidermólise bolhosa e cicatrização de feridas. (10)

Um grupo de investigadores testou a eficácia de Oleogel-S10[®] na cicatrização de feridas de epidermólise bolhosa, para as quais apenas existe otimização de cuidados. Tratou-se de um ensaio prospetivo de fase II com 10 doentes com feridas agudas ou crónicas (feridas

estabelecidas há mais de 6 semanas). As feridas foram divididas a meio – uma metade foi submetida a tratamento com o gel e tapada com um penso, e a outra serviu de controlo, sendo apenas coberta com um penso idêntico. O tratamento durou 14 dias, 28 no caso de feridas crónicas, e os pensos foram trocados a cada 24 ou 48h. No início do tratamento e a cada troca de penso, as feridas eram fotografadas e media-se a abertura da mesma. As fotografias foram depois avaliadas, em ocultação, por dois peritos, onde cada um anotava a metade que, pessoalmente, apresentava melhor reepitelização. No final, 41% das metades das feridas tratadas com Oleogel-S10[®] foram classificadas como melhores por ambos os investigadores. Quanto à medição do tamanho das feridas, foi observada uma cicatrização mais célere nas metades submetidas ao tratamento. Verificou-se um tempo médio de 10,5 dias até à oclusão das feridas nas metades tratadas e 14 dias no grupo controlo. Ou seja, com o tratamento, o número de feridas ocluídas foi maior e o tempo até à sua oclusão menor, sugerindo uma aceleração do processo de cicatrização pelo Oleogel-S10[®]. Também os doentes consideraram o tratamento eficiente e bem tolerado. Porém, algumas limitações deste estudo, como a amostra reduzida, não permitem extrapolar resultados. (17)

Há também um outro estudo de fase II que avaliou a eficácia de Oleogel-S10[®] em feridas de 24 doentes dadores de enxertos de pele. Durante 14 dias este gel foi aplicado a uma das metades da ferida, servindo a outra como controlo intraindividual. No final demonstrou-se que a reepitelização foi mais rápida na metade submetida a tratamento do que na metade controlo. Em 2017 foi desenvolvido um ensaio clínico em fase III semelhante, porém com 219 doentes e um tratamento máximo de 28 dias. O resultado foi idêntico, demonstrando que a utilização tópica de Oleogel-S10[®] acelerava a reepitelização de feridas de dadores de enxertos de pele. Mesmo a nível intraindividual, a ferida cicatrizou mais rapidamente com o fármaco do que com o tratamento *standard* (15,3 dias *versus* 6,5 dias), diferença esta que pode ser significativa se se considerar que acarreta menor risco de infeção. Decorridos 3 e 12 meses do final do tratamento, o *outcome* estético foi também animador, com as metades tratadas com Oleogel-S10[®] a revelavam-se mais semelhantes à pele circundante. Apesar do registo de 39% de efeitos secundários leves a moderados durante o período de tratamento e *follow up*, não houve efeitos adversos graves nem descontinuações do tratamento. Este estudo demonstrou também que a aplicação tópica deste gel não aumentou os níveis plasmáticos de betulina. Os investigadores consideraram, assim, esta aplicação segura, eficaz e bem tolerada. (18)

Uma das grandes apostas da utilização terapêutica da Bétula está na queratose actínica (AK). Trata-se de uma entidade dermatológica decorrente de uma exposição prolongada e reiterada a radiação ultravioleta (UV). (49, 50) Usualmente caracteriza-se por placas eritematosas em áreas expostas à luz solar, como face e pescoço, contudo pode adquirir variadas apresentações clínicas. (50, 51) Com uma prevalência mundial de 11% a 25%, é mais comum

em fenótipos de pele tipo I e II de Fitzpatrick e em idosos. (50) O seu potencial de transformação em carcinoma de células escamosas é elevado, havendo até quem considere estas lesões como carcinoma de células escamosas *in situ*, dadas as semelhanças histológicas. (49, 50) Em aproximadamente 10% dos casos, as lesões evoluem para carcinoma dentro de dois anos. Tendo em conta esta premissa, apesar de algumas lesões regredirem espontaneamente, o seu tratamento está recomendado. (49-51) Atualmente, há várias opções disponíveis, baseando-se sobretudo em métodos destrutivos como a curetagem, crioterapia com azoto líquido ou quimioterapia tópica. (50) Porém, algumas destas técnicas têm entraves económicos e/ou temporais, e efeitos adversos. Neste sentido, a procura de fármacos bem tolerados, seguros e eficazes tem sido extensa. Aqui os triterpenos, nomeadamente a betulina, têm ganho terreno, dadas as suas propriedades anti-inflamatórias, citotóxicas e antiproliferativas. (49-51)

Em 2009, Huyke *et al.*, desenvolveram um ensaio prospetivo de fase II para a avaliação da eficácia tópica de um gel, composto por extrato seco de casca de Bétula, com cerca de 87% de triterpenos, e óleo vegetal, na AK. Incluíram 45 pacientes com 10 ou menos lesões de AK. Dividiram os doentes em 3 grupos – a um aplicaram o gel em monoterapia 2 vezes/dia, outro foi submetido a crioterapia isolada e outro submetido a crioterapia seguida de aplicação do gel. O ensaio durou 3 meses, tendo os doentes sido avaliados mensalmente. No final, a resposta terapêutica foi classificada em remissão completa, remissão >75% ou ausência de remissão. Em alguns casos recolheram biópsias da lesão para posterior comparação histopatológica. Os investigadores observaram que, com a aplicação deste gel, em 64% dos doentes houve remissão completa e em 86% remissão >75%. Na crioterapia, os resultados foram de 79% e 93%, respetivamente. No que respeita à histopatologia, as lesões tratadas com o gel evidenciavam menos displasia e menos disqueratose. Não foram registados quaisquer efeitos secundários graves. (49) Os mesmos autores desenvolveram um estudo semelhante em 2006, tendo obtido 79% de remissão >75%. (49, 51) Atribuem a diferença de resultados ao diferente veículo e ao maior período de tratamento. Apesar destes achados promissores, salientam a necessidade de mais estudos, nomeadamente *versus* placebo e com amostras mais alargadas. (49)

Em 2015, um estudo prospetivo e duplamente cego, selecionou 165 pacientes com lesões ligeiras a moderadas de AK localizadas à face ou cabeça, e submeteu-os a um tratamento tópico com Oleogel-S10[®], 1 ou 2 vezes/dia, durante 3 meses. Utilizaram a avaliação clínica e histopatológica, realizadas um mês após o último dia de tratamento, como marcadores. Em 4% dos doentes cuja aplicação de Oleogel-S10[®] foi diária e em 7% dos submetidos a aplicação bidiária obteve-se remissão completa das lesões. No grupo controlo, exposto a placebo, não houve nenhuma lesão com remissão completa. Uma *clearance* >75% foi

observada em 15% e 18% dos doentes submetidos a aplicação diária ou bidiária, respetivamente, e em 13% no grupo controlo. Tais diferenças não se revelaram, contudo, estatisticamente significativas. (51)

A diferença entre os resultados obtidos neste estudo e nos dois anteriores pode residir em vários pontos. Em primeiro, salientar que na AK é difícil proceder a uma avaliação fiável de qualquer intervenção, não só pela sua tendência intrínseca para a regressão espontânea, mas também por uma maior informação dos doentes envolvidos poder condicionar a sua postura quanto à exposição a radiação UV. Além do mais, a variabilidade interobservador é inevitável. Outro ponto, está no facto de, ao contrário deste último, nenhum dos anteriores ter sido em dupla ocultação. E, por fim, e provavelmente a diferença mais preponderante, a diferente seleção de doentes. Os estudos anteriores apenas incluíram doentes com um máximo de 10 lesões e, no último, incluíram doentes com até 37 lesões. (51)

No que concerne a efeitos adversos, os autores advogam que, em geral, o tratamento com Oleogel-S10® foi bem tolerado. Apenas há reportada uma crise de mal asmático num doente com rinoconjuntivite alérgica, não havendo informação sobre uma possível alergia ao pólen da Bétula. Os investigadores consideraram pouco provável tratar-se de um efeito sistémico da betulina, uma vez que esta não era detetável no sangue após aplicação tópica. O efeito mais reportado foi o prurido. (51)

4. Efeito anti-inflamatório

A betulina tem atividade anti-inflamatória comprovada. Reduz o recrutamento de neutrófilos *in vivo* e há evidência de ser um potente inibidor da fosfolipase A (PLA2). (10, 21, 24)

O ácido betulínico é também anti-inflamatório, com atividade demonstrada a vários níveis. Suprime a expressão de ácido ribonucleico mensageiro (*mRNA*) de citocinas pró-inflamatórias. (52) Inibe a ciclo-oxigenase (*COX*) 2, a *PLA2* e o recrutamento de neutrófilos, e diminui a produção de interferão gama (*IFN γ*), fator de necrose tumoral alfa (*TNF- α*), interleucina (*IL*) 6, *IL-8*, prostaglandina E₂ (*PGE*₂) e óxido nítrico (*ON*). (10, 24, 52-54)

Um grupo de investigadores testou a eficácia anti-inflamatória de extratos de casca de Bétula *in vivo*, num modelo murino de inflamação da orelha induzida por *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate* (*TPA*). Testaram-na através da aplicação tópica de *TPA* com posterior aplicação de 2 mg betulina, ou equivalente quantidade de extrato, passados 30 minutos, e compararam-na com um controlo de indometacina, um fármaco anti-inflamatório. Este modelo induz rapidamente um processo inflamatório com edema, aumento da permeabilidade vascular e influxo de neutrófilos. Após 4h, nos grupos submetidos a tratamento verificou-se uma redução

significativa do edema. Os extratos de Bétula obtiveram um maior potencial anti-inflamatório, possivelmente devido à presença de outros compostos além da betulina. Os autores assinalam o facto de, quer a betulina, quer os extratos, serem equiparados à indometacina em termos de eficácia. (12)

Num modelo experimental de inflamação da pata de ratinhos, com inflamação induzida por carragenina e serotonina, o ácido betulínico teve um efeito anti-inflamatório equiparável aos dos anti-inflamatórios fenilbutazona e dexametasona. (24)

A enzima *PLA2* desempenha um importante papel na inflamação. Existem vários tipos, mas a fosfolipase A2 alfa citosólica (*cPLA2 α*) é a que tem maior especificidade pelo ácido araquidónico (AA), pelo que é tida como um potencial alvo terapêutico. Ao desencadear uma cascata de eventos, culmina na libertação de fosfolipídeos e AA. A clivagem do AA, pela COX e araquidonato 5-lipoxigenase (*5-LOX*), origina, respetivamente, prostaglandinas e leucotrienos, mediadores da resposta inflamatória. Apesar de haver fármacos direcionados à COX, não estão disponíveis nem comercializados nenhuns inibidores da *PLA2* ou da *5-LOX*. Tendo isto em conta, um grupo de investigadores decidiu averiguar a atividade inibitória de 43 extratos de plantas sobre *cPLA2 α* , entre os quais, um extrato de folha de *Betula spp.* Utilizando uma incubação de *cPLA2 α* porcina com os vários extratos, calcularam a percentagem de inibição enzimática e posteriormente correlacionaram-na com a composição fenólica de cada extrato. O extrato de Bétula foi o 5º extrato a evidenciar maior capacidade de inibição enzimática, com $68,7 \pm 13,3\%$ de inibição, contra os $80,04 \pm 3,58\%$ do controlo positivo, um inibidor específico da *cPLA2 α* . Não foi observada qualquer correlação entre a composição fenólica e a inibição da *cPLA2 α* . (9)

A mastite é uma inflamação da glândula mamária comum no puerpério, maior parte das vezes consequente a uma infeção dos ductos lactíferos por *S. aureus*. Por forma a investigar o potencial anti-inflamatório da betulina, um grupo de investigadores propôs-se a analisar a sua ação num modelo no qual induziram mastite em células epiteliais mamárias através do seu contacto com *S. aureus*. Administraram betulina em diferentes concentrações, e utilizaram a dexametasona como controlo. No grupo que não recebeu qualquer tratamento, a arquitetura do tecido glandular foi destruída e invadida por células inflamatórias. Tais alterações foram melhoradas com a betulina de forma dose dependente. Para determinar os mecanismos subjacentes, quantificaram os níveis das citocinas pró-inflamatórias *TNF- α* , *IL-1 β* e *IL-6*. Verificaram que o aumento destes valores no grupo sem tratamento, foi inibido com a administração de betulina. A betulina não revelou citotoxicidade em nenhuma das concentrações. Os autores apontam estes resultados como úteis na prevenção da inflamação e dano tecidular consequente. (55)

Na lesão renal aguda associada a sépsis estão envolvidos mecanismos de inflamação e *stress* oxidativo. Um grupo de trabalho investigou a ação do ácido betulínico num modelo murino que reproduzia essa mesma situação. Os ratinhos foram pré-tratados com diferentes concentrações de ácido betulínico por via intraperitoneal três dias antes de lhes ser induzida sépsis por punção cecal cirúrgica. A sépsis desencadeou processos pró-inflamatórios e pró-oxidativos, comprovados pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias e diminuição da *SOD* e catalase (*CAT*), enzimas antioxidantes endógenas. Todas estas modificações foram antagonizadas ou atenuadas pelo ácido betulínico, que também a nível histológico evidenciou melhoria da arquitetura renal comparativamente ao grupo sem tratamento. Os autores sustentam assim o papel regulador do ácido betulínico nas respostas inflamatórias e oxidativas decorrentes da sépsis, traduzindo inclusive um aumento da sobrevivência dos ratinhos. (56)

As bactérias têm a capacidade de produzir uma endotoxina, o lipopolissacarídeo (*LPS*), capaz de ativar macrófagos e induzir a produção de citocinas e mediadores pró-inflamatórios. Um estudo de 2016 propôs-se a avaliar a eficácia anti-inflamatória *in vitro* do ácido betulínico em macrófagos estimulados por *LPS*. Os macrófagos foram pré-tratados com ácido betulínico em concentrações não tóxicas, 3h antes de serem submetidos a um tratamento de 24h com *LPS*. Observou-se que o ácido betulínico, de forma dose dependente, diminuiu os níveis de citocinas pró-inflamatórias e a expressão da sintetase de óxido nítrico (*iNOS*) e *COX2*, com consequente significativa inibição da produção de *ON* e *PGE₂*. O *NF-κB* é um fator de transcrição que, quando ativado, se descomplexa do seu inibidor citosólico e é translocado para o núcleo. Uma vez no núcleo, interage com elementos da região promotora de vários genes e desencadeia a transcrição de mediadores pró-inflamatórios. A exposição a *LPS* é um dos estímulos que promove a translocação do *NF-κB* para o núcleo, contudo, a indução deste processo foi inibida pelo pré-tratamento com ácido betulínico. (57)

A osteoartrite é uma doença degenerativa articular à qual está imputada uma elevada carga inflamatória, com a *IL-1β* a contribuir para a sua patogénese. Em 2015, um grupo de investigadores averiguou os efeitos do ácido betulínico em condrócitos estimulados por *IL-1β*. Digeriram cartilagem articular de 18 doentes com colagenase tipo II e utilizaram os condrócitos obtidos. Pré-trataram os condrócitos com ácido betulínico 1h antes de os estimularem com *IL-1β*, por 24h. A estimulação de condrócitos com *IL-1β* revelou um aumento da produção de *ON*, *PGE₂* e metaloproteínases da matriz (*MMP's*). O *ON* permite induzir a apoptose de condrócitos, a *PGE₂* é importante na patofisiologia desta patologia e as *MMP's* regulam a destruição cartilágnea. A exposição ao ácido betulínico reverteu estes aumentos de forma dose dependente. Os investigadores avaliaram também a ação do ácido betulínico no *NF-κB*,

envolvido na regulação da produção destes mediadores. Verificaram que a exposição a *IL-1 β* ativou este fator de transcrição, mas que o ácido betulínico o inibiu. (54)

5. Efeito endócrino-metabólico

A diabetes é uma doença metabólica caracterizada por uma hiperglicemia crónica resultante de uma ineficaz sensibilidade e/ou secreção de insulina, tida como um dos principais problemas de saúde pública do século XXI. (58, 59)

Vários triterpenos da Bétula são descritos como detentores de um efeito antidiabético. (45, 46)

De forma a sistematizar a informação disponível, um grupo de investigadores portugueses publicou um artigo de revisão que reúne informação acerca da utilização dos ácidos oleanólico, ursólico e betulínico na diabetes *mellitus* tipo 2. Começam por descrever as várias ações hipoglicemiantes dos compostos, agrupando-as em classes: 1. redução da absorção da glicose; 2. redução da neoglicogénese e aumento da glicogénese; 3. aumento da secreção e/ou sensibilidade à insulina. (13)

No que respeita à redução da absorção da glicose plasmática, está demonstrada a inibição da hidrólise de hidratos de carbono, a diminuição da expressão dos transportadores de glicose a nível gastrointestinal e a inibição e/ou diminuição da atividade da α -amilase e α -gluconidase. (2, 13)

A α -amilase e a α -gluconidase são enzimas digestivas envolvidas na degradação de hidratos de carbono da dieta, contribuindo para a hiperglicemia pós-prandial. A sua inibição é um alvo desejável, sendo inclusivamente este o mecanismo de ação da acarbose, um fármaco hipoglicemiante. Em 2012, foi publicado um estudo que avaliava extratos de casca de *Betula alnoides* quanto à sua atividade inibitória da α -gluconidase. Verificou-se que um dos extratos obteve uma inibição ligeiramente superior à da própria acarbose. Ao avaliar a correlação entre a inibição enzimática e a composição do extrato, verificou-se que uma maior quantidade de compostos fenólicos exibiu um maior efeito inibitório. (2) Um estudo *in sílica* publicado em 2014, utilizando α -amilase murina e humana, demonstrou a inibição desta enzima pela betulina. (60) Já Zhang BW, *et al.*, tendo em conta os efeitos secundários da acarbose e desejando melhorar a sua tolerabilidade, avaliaram a ação inibitória de alguns triterpenos da Bétula, quer na α -amilase, quer na α -gluconidase, e o seu eventual sinergismo com a acarbose. Utilizando o IC50 como termo de comparação, os autores sustentaram que na inibição da α -gluconidase os triterpenos foram mais eficazes que a acarbose, com os ácidos betulínico e ursólico a obter os melhores resultados. Na inibição da α -amilase, o ácido ursólico

foi o mais eficaz. A avaliação do eventual sinergismo com a acarbose foi avaliada através da sua combinação com os ácidos ursólico e oleanólico, os únicos capazes de inibir ambas as enzimas. A primeira combinação mostrou um efeito aditivo ou antagônico, enquanto que na segunda se verificou sinergismo, perspetivando-se um aumento da sua eficácia e diminuição de efeitos secundários, com eventual aplicabilidade farmacológica. (58) Também o grupo português referenciou um sinergismo entre o ácido oleanólico e a metformina, um fármaco hipoglicemiante amplamente utilizado, sugerindo a possibilidade de se poder vir a diminuir a dose do fármaco. (13)

Nas ações dos ácidos ursólico, betulínico e oleanólico no aumento da glicogénese, processo de síntese de glicogénio, e diminuição da neoglicogénese, processo de síntese de glicose a partir de substratos que não hidratos de carbono, são vários os mecanismos descritos. Há vários estudos a identificar inibições enzimáticas que cursam num aumento da síntese e armazenamento de glicogénio e numa diminuição da glicogenólise, processo de degradação de glicogénio em glicose. Outros evidenciam, também através da modulação de várias enzimas, uma diminuição da glicose plasmática, induzida pela promoção da utilização e transporte membranar da glicose, pelo aumento da expressão de transportador de glicose (*GLUT*) 1 e 2, e pela limitação da produção de glicose, consequência do estímulo pró-glicogénese. (13) Para os autores de um estudo de 2018, a diminuição das citocinas pró-inflamatórias observada com a administração de ácido betulínico pode também explicar este ponto. O *TNF- α* , uma citocina pró-inflamatória, estimula a neoglicogénese e a glicogenólise. Uma vez diminuídos os seus níveis, também estes processos serão atenuados. (61)

Quanto à insulinoresistência, há evidência que sustenta a atividade dos triterpenos como secretagogos e insulinomiméticos, a sua ação na biossíntese e sensibilidade à insulina e ainda a sua atuação na sobrevivência das células β -pancreáticas, melhorando-a. (13) Já em 2009 havia evidência de que o ácido betulínico aumentava o valor plasmático da insulina e diminuía significativamente o da glicose. (62) Castro EJ *et al.*, investigaram os mecanismos de ação do ácido betulínico, em murgos com hiperglicemia. Identificaram que este bioativo promoveu uma significativa redução da glicemia plasmática, um aumento da secreção de insulina e um aumento de glicogénio, comprovando assim a ação do ácido betulínico como secretagogo de insulina e insulinomimético. (59) Sabendo que as citocinas pró-inflamatórias são um estímulo à insulinoresistência, também a diminuição dos seus níveis poderá ter influência no efeito hipoglicemiante destes bioativos. Em 2018, um estudo demonstrou a eficácia do ácido betulínico na reversão das alterações glicémicas induzidas por uma dieta rica em frutose. Os investigadores concluíram que este fitoconstituente demonstrou a sua atividade hipoglicemiante de várias formas, uma das quais pelo aumento da sensibilidade à insulina. Demonstraram que a quantidade de citocinas pró-inflamatórias essenciais ao

desenvolvimento de insulinoresistência aumentou com a dieta, tendo este aumento sido revertido com a administração de ácido betulínico, de forma equiparável à observada com a metformina. (61)

Um outro mecanismo de ação que pode explicar esta propriedade da Bétula é a sua ação moduladora da adiponectina. A adiponectina é uma adipocina que modula a sensibilidade à insulina ao regular genes como o *GLUT 4*. Uma desregulação dos seus níveis pode levar à insulinoresistência. Em 2018, um grupo de investigadores identificou, num extrato de casca de Bétula, *catechin glycoside* e *arylbutanoid glycosides*. Avaliaram a sua ação antidiabética em adipócitos maduros, quantificando o *mRNA* de *GLUT 4* e de adiponectina. Ambos os níveis de *mRNA* foram regulados positivamente pelos *arylbutanoid glycosides*, modulando consequentemente a sua expressão. (8)

Além destas propriedades hipoglicemiantes, há a salientar o efeito protetor destes compostos também na prevenção de complicações associadas à progressão da diabetes, com evidência da sua atuação quer nas micro quer nas macrovasculares. É reconhecida a estas moléculas uma ação multifacetada, o que se torna realmente promissor no tratamento global desta doença. (13)

Liu C *et al.*, investigaram a ação do ácido betulínico na nefropatia diabética *in vitro*. Demonstraram que o tratamento de células cultivadas em meio hiperglicémico com este bioativo, diminuiu a proliferação de células mesangiais e a expressão e consequente deposição de fibronectina, ambos processos envolvidos na fisiopatologia da nefropatia. (45) Também neste sentido, um outro estudo pesquisou os efeitos deste bioativo na nefropatia diabética, desta vez *in vivo*. Induziram-na em ratinhos através de uma injeção intraperitoneal de estreptozotocina-nicotinamida, tendo depois estudado o efeito do tratamento oral com ácido betulínico, comparando-o com a metformina. Observaram que a administração de ácido betulínico aumentou dos níveis de albumina plasmática, medida indireta da diminuição da microalbuminúria, e diminuiu os níveis de ureia e creatinina séricas, de forma semelhante à metformina. Na avaliação histopatológica, a administração de ácido betulínico também melhorou as alterações morfológicas induzidas pela diabetes, como a glomeruloesclerose. (46)

A síndrome metabólica (SM) é uma associação de doenças que se caracteriza por obesidade, dislipidemia, hiperglicemia e hipertensão, e que está associada a um aumento da mortalidade cardiovascular. (63) Atualmente não existe um fármaco “ideal” para a SM, há apenas vários fármacos que atuam isoladamente em cada um dos seus componentes. (61)

A obesidade caracteriza-se pela deposição excessiva de tecido adiposo, com o excesso de gordura abdominal a ser um dos seus grandes condicionantes, sendo a sua prevenção essencial à saúde. (8, 62)

Já em 2009, Célio Melo *et al.*, demonstravam o papel do ácido betulínico na obesidade, ao testarem o papel inibidor deste na adipogénese. Ao induzir uma dieta hipercalórica, verificaram hiperglicemia, dislipidemia, insulinoresistência e aumento ponderal, porém o ácido betulínico melhorou todos estes perfis. Utilizaram 4 grupos de ratinhos – um controlo de dieta normal, um controlo de dieta hipercalórica, um com dieta hipercalórica e ingestão de água com 50 mg/L de ácido betulínico e outro tratado com sibutramina, um fármaco para o controlo ponderal. Cada ratinho foi pesado semanalmente e, à 15ª semana, colheram sangue venoso e sacrificaram os animais. No grupo que recebeu ácido betulínico, comparando com o controlo da dieta hipercalórica, os investigadores verificaram um peso corporal significativamente menor e uma reversão da acumulação abdominal de gordura, inclusivamente de forma mais potente que a sibutramina. A nível hormonal, as enzimas do metabolismo lipídico funcionam como potenciais alvos farmacológicos, e quer o ácido betulínico quer a sibutramina atenuaram e/ou inibiram a atividade da lipase e amilase, ambas enzimas digestivas com atuação a este nível. Quanto à grelina, que estimula o apetite, e à leptina, que promove a perda ponderal, relativamente ao grupo com dieta normal, o grupo com dieta hipercalórica revelou uma diminuição da primeira e um aumento da segunda, como é habitual na obesidade. Porém, o ácido betulínico evidenciou uma diminuição ainda maior da grelina e um aumento ainda maior da leptina, ao contrário da sibutramina que não teve influência significativa em nenhuma das hormonas. Contudo, estas alterações hormonais não aparentaram influenciar a ingestão dos ratinhos, o que aponta para a influência de outros mecanismos na perda ponderal registada. (62)

Um artigo publicado em 2018, focado na adipogénese, relata a ação de um extrato de casca de *Betula platyphylla* na diferenciação e maturação de adipócitos. Ao incubar adipócitos em diferenciação de ratinhos com *catechin glycoside* e *arylbutanoid glycosides*, e, quantificando marcadores adipogénicos, verificou-se que os bioativos diminuíram os seus níveis de forma dose dependente. Com a coloração *Oil Red O*, observou-se que a acumulação intracelular de lípidos foi inibida. Testaram-se ainda os efeitos destes compostos em adipócitos maduros, tendo-se observado que os *arylbutanoid glycosides* induziram a hidrólise de triglicéridos. Os autores concluem que o tratamento de adipócitos com *arylbutanoid glycosides* provenientes da Bétula, revelou um papel benéfico na regulação da diferenciação e metabolismo adipocitário, e advogam que tal efeito poderá ser benéfico na perda ponderal. (8)

Em 2016, um artigo de revisão, além de revelar os efeitos hipoglicemiantes dos ácidos betulínico, ursólico e oleanólico, testemunha também o seu papel a nível da obesidade e dislipidemia. Na obesidade, menciona estudos que demonstram que a sua administração diminui a adiposidade visceral, o peso corporal, os ácidos gordos livres e a acumulação lipídica a nível hepático. Aponta igualmente a diminuição do apetite, conseqüente à modulação dos níveis de leptina e grelina, como benefício para a prevenção da obesidade. Já o efeito antidislipidémico, passa pela diminuição do colesterol total, triglicérides e lipoproteína de baixa densidade (LDL), com concomitante aumento de lipoproteína de alta densidade (HDL). Outros estudos comprovam uma diminuição da absorção de lípidos a nível intestinal através da inibição de várias enzimas, como a lipase pancreática. (13) Melo *et al.*, na sua experimentação com ratinhos submetidos a dieta hipercalórica e administração de ácido betulínico dissolvido em água, também observaram que o ácido betulínico diminuiu os níveis de colesterol total e triglicérides de forma significativa, mais do que a própria sibutramina. (62)

Apesar de o ácido betulínico ser apontado como agente protetor de cada uma das doenças que fazem parte da SM, não há muitos estudos que comprovem o seu papel na SM propriamente dita. Porém, em 2018, um trabalho experimental propôs-se a avaliar a sua eficácia na SM como um todo. Induziram a SM em ratinhos através de uma dieta rica em frutose durante 6 semanas, e dividiram-nos em vários grupos – dois deles receberam tratamento com ácido betulínico em diferentes doses e outro recebeu metformina, fármaco controlo, durante 4 semanas. A dieta rica em frutose aumentou os parâmetros antropométricos avaliados (índice de massa corporal, peso corporal e perímetro abdominal), contudo, observou-se uma reversão desta tendência com o ácido betulínico, comprovando assim o seu potencial antiobesidade. Quanto ao perfil glicémico, o ácido betulínico também reverteu as alterações induzidas pela dieta, como o aumento da glicose e insulina, a diminuição da adiponectina e o aumento da leptina. O ácido betulínico também atuou no perfil lipídico, observando-se uma inversão do aumento de triglicérides, colesterol total e LDL, e diminuição de HDL observados com a dieta. Tais resultados sustentam a atuação benéfica do ácido betulínico em cada um dos componentes da SM, determinando um efeito cumulativo. Os autores defendem assim que, invés de administrar um fármaco para cada um dos componentes da SM, se poderá vir a utilizar apenas ácido betulínico, com atuação multivalente, evitando polimedicação e minimizando possíveis interações e efeitos secundários. (61)

6. Efeito neuroprotetor

Nos últimos anos, a investigação em neurociências tem demonstrado, em inúmeras patologias, o potencial efeito de mecanismos oxidativos e de algumas vias de inflamação nos seus mecanismos fisiopatológicos. Deste modo, pela demonstração experimental destes efeitos reguladores da Bétula, também o seu potencial neuroprotetor tem vindo a ser avaliado.

A doença de *Alzheimer* é uma doença neurodegenerativa progressiva. A patogénese desta assenta na deposição extracelular de β -amilóide, um produto da degradação da proteína precursora de amilóide pela ação enzimática da β e γ secretases. Além disto, também se observa, nesta doença, um declínio dos neurónios colinérgicos, com baixos níveis de acetilcolina, e um ambiente de *stress* oxidativo. Num estudo de 2014, administrou-se oralmente extrato de casca de *Betula platyphylla* a murganhos 3 dias antes de serem submetidos a uma injeção de β -amilóide no 3º ventrículo. Observou-se, através de alguns testes e marcadores, que a Bétula recuperou a “memória” a longo prazo em relação ao grupo controlo, sendo inclusivamente mais potente que o donepezilo, um fármaco inibidor da acetilcolinesterase. Na “memória” a curto prazo e “memória” espacial, a Bétula também demonstrou bons resultados, prevenindo o declínio observado no grupo controlo. Ao nível dos marcadores avaliados, o extrato inibiu o aumento da acetilcolinesterase e β -secretase e diminuiu os níveis de β -amilóide. Concluiu-se que o extrato de *B. platyphylla* melhorou o *outcome* de *Alzheimer* experimental, melhorando os défices induzidos pela deposição de β -amilóide ao nível da “memória” a curto e longo prazo e “memória” espacial. Observou-se também uma melhoria da viabilidade neuronal, demonstrada pela integridade morfológica. Os autores apontam a redução dos níveis de acetilcolinesterase e β -secretase, como possível mecanismo de ação subjacente. (64)

A isquemia cerebral é outra área que tem suscitado interesse. Jiao S *et al.*, mimetizaram isquemia *in vitro* para avaliar as ações do ácido betulínico. Neurónios previamente tratados com ácido betulínico foram expostos a um meio anaeróbio e sem glicose, com posterior introdução de glicose e condições normotóxicas. Comparando com o grupo controlo, sob condições normotóxicas, no grupo tratado com ácido betulínico verificou-se um aumento da viabilidade celular e uma melhoria da lesão neuronal induzida pela privação/reperfusão de oxigénio e glicose. Observou-se também uma melhoria do *stress* oxidativo, traduzida pela diminuição de ROS. (65)

Já Kaundal M *et al.*, estudaram igualmente a influência do ácido betulínico na isquémia cerebral, mas neste caso através da oclusão bilateral da carótica comum em ratinhos, traduzindo uma hipoperfusão cerebral. Verificaram que o ácido betulínico restabeleceu o fluxo cerebral, a “memória” espacial e não espacial. Tentando encontrar o mecanismo subjacente,

observaram que o ácido betulínico preveniu a redução de vários neurotransmissores, como a serotonina e a dopamina, frenou a elevação da atividade da acetilcolinesterase e restabeleceu os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, todas elas alterações induzidas pela hipoperfusão. O estudo sustenta assim que o tratamento com ácido betulínico diminui a neuroinflamação e deterioração cognitiva decorrentes da hipoperfusão cerebral, e ainda melhora a “memória” e vários parâmetros bio e neuroquímicos, admitindo-se que possa vir a ser uma potencial arma terapêutica na doença vascular cerebral. (66)

Tentando extrapolar estes achados para os efeitos neurotóxicos da anestesia, especialmente em cérebros em desenvolvimento, Wang D *et al.*, testaram a eficácia do ácido betulínico em ratinhos com 7 dias submetidos ao isoflurano, um anestésico inalatório de utilização frequente em idades pediátricas. Submeteram os ratinhos ao anestésico durante 2h por 3 dias, com posterior administração intragástrica de ácido betulínico durante 21 dias. Avaliaram possíveis danos comportamentais ou défices cognitivos, nomeadamente a nível da “memória”, decorrentes desta exposição. Verificaram que a administração de ácido betulínico melhorou a função cognitiva em cérebros expostos ao isoflurano e preveniu o dano neuronal, uma vez que demonstrou atenuar a apoptose neuronal, controlar os níveis de citocinas pró-inflamatórias e diminuir os parâmetros de *stress* oxidativo. (67)

7. Efeito oncoprotetor

A patologia oncológica é devastadora e tem uma elevada expressão mundial. As diversas terapêuticas atuais têm limitações, pelo que se tem observado uma incessante investigação nesta área, procurando novas terapêuticas antitumorais. (1, 3)

À Bétula são reconhecidas características farmacológicas antineoplásicas. (5, 8, 24) O ácido betulínico é, provavelmente, dos bioativos mais amplamente estudados, porém, outros triterpenos têm também descritos efeitos antineoplásicos. Além de cada um traçar o seu próprio efeito isoladamente, há evidência que a sua combinação potencia tal efeito. (4, 51, 53)

A indução da apoptose é um dos mecanismos mais frequentemente envolvido na atividade citotóxica dos triterpenos. A apoptose é um processo de morte celular programada, desencadeada por vários *triggers*. Pode ser dividida em duas vias, a intrínseca e a extrínseca, com a ativação da caspase 9 a ser discriminadora da via intrínseca e a 8 da via extrínseca. As mitocôndrias têm um papel importante na regulação da via intrínseca, também conhecida por via mitocondrial. Após a iniciação apoptótica, ocorre uma série de eventos característicos que envolvem alterações citomorfológicas, culminando na morte celular. As células

neoplásicas têm revelado capacidade disruptiva do processo apoptótico, principalmente na via intrínseca. (4, 68, 69)

Um estudo de 2012 averiguou a eficácia antineoplásica de vários extratos de casca de Bétula, *in vitro*, utilizando células de linhagem de carcinoma do ovário. Todos os extratos revelaram uma pronunciada atividade antiproliferativa. Os autores assinalam o facto de a betulina ser conhecida como agente anti-inflamatório, e que uma intervenção a nível inflamatório poder-se-á correlacionar com a atividade antiproliferativa evidenciada, mencionando o facto de vários compostos anti-inflamatórios terem já demonstrado diminuir a incidência tumoral e o desenvolvimento metastático. (12)

Em 2018, outro grupo de investigadores avaliou o potencial antineoplásico de extratos de rebentos de *Betula pendula* e *pubescens* em linhagens celulares de 8 tipos de cancro: mama, endométrio, colo do útero, colorretal, gástrico, hepatocelular, glioblastoma e melanoma. Utilizaram também fibroblastos da pele para avaliar a sua citotoxicidade, e a cisplatina, um fármaco citostático amplamente utilizado, como controlo positivo. Todos os extratos, de forma dose e tempo-dependente, induziram uma diminuição da viabilidade celular. De forma geral, comparativamente às células neoplásicas, os valores de IC50 para a redução da viabilidade celular foram superiores para os fibroblastos, porém, houve extratos mais citotóxicos para os fibroblastos do que para as células neoplásicas. Quando avaliaram a proliferação celular, concluíram que os IC50 registados eram inferiores aos da redução da viabilidade celular, o que sugere uma ação antiproliferativa preponderante. Em ambas as avaliações, a cisplatina foi o agente mais eficaz em todas as linhagens, contudo, os fibroblastos foram das células mais afetadas por este fármaco. Os autores admitem que, à semelhança da cisplatina, os extratos de Bétula não evidenciam seletividade para as células neoplásicas. (3)

Fitoconstituintes da Bétula podem ser úteis quando combinados com outros fármacos citostáticos. Um estudo de 2018, concluiu que a administração de seiva de *Betula pendula* conjugada com a cisplatina, rearranja o desequilíbrio que esta última provoca na concentração sérica de vários minerais. A seiva da Bétula é rica em minerais, entre os quais potássio, cálcio, magnésio, fósforo, manganésio e ferro. Inicialmente, avaliaram a ação da cisplatina na biodisponibilidade de alguns minerais e, posteriormente, o efeito da administração da combinação da seiva com o citostático. Dividiram ratinhos em 4 grupos – um controlo, um submetido à administração de cisplatina, um a quem foi oferecida seiva *ad libitum* e administrada cisplatina e outro que apenas recebeu seiva *ad libitum*. Observaram que a cisplatina depletou os níveis plasmáticos de cobre, magnésio, ferro, manganésio e zinco. Porém, no grupo que recebeu a combinação, a descida plasmática dos níveis de cobre foi limitada, e os níveis de ferro, zinco, magnésio e manganésio aumentaram. (6)

Um outro estudo, avaliou o potencial citotóxico de triterpenos da casca de *Betula utilis*. Utilizaram linhas celulares tumorais humanas de cancro do pulmão, próstata, ovário, rim, glioblastoma, hepatocarcinoma e adenocarcinoma do pâncreas, mama e colorretal. Após incubação das células neoplásicas com os extratos por 48h, a maior eficácia dos extratos foi verificada para o cancro do pâncreas. Seguidamente, testaram a citotoxicidade intrínseca de alguns dos compostos isolados (*β*-*amyirin*, ácido betulínico, ursólico e oleanólico). Verificaram que o ácido ursólico foi o mais eficaz em todas as linhagens, com uma maior atividade na de cancro da mama e ovário (aproximadamente 80% de inibição do crescimento em ambos). O segundo fitoconstituente mais eficaz foi o ácido betulínico, com cerca de 20% de inibição para ambos. Dada a maior citotoxicidade do ácido ursólico para o adenocarcinoma da mama, testaram também a sua ação noutras linhagens tumorais deste tipo de carcinoma e ainda em linhagens normais da mama. O ácido ursólico revelou-se seletivamente tóxico para as células tumorais, com mais de 90% de inibição na concentração máxima experimentada (10 µM), e uma toxicidade mínima para as células epiteliais normais. Compararam ainda esta eficácia com um fármaco citostático, a doxorrubicina, tendo verificado que, numa das linhagens tumorais, nas concentrações de 5 e 10 µM, o ácido ursólico foi mais eficaz que a doxorrubicina. Viriam depois a descrever que o mecanismo de ação subjacente se prendia com a indução da apoptose, comprovada pelo aumento de marcadores de apoptose. Avaliando a expressão de pró-caspases 8 e 9, esclareceram qual das vias apoptóticas envolvida: observaram uma modulação da pró-caspase 8 enquanto que a expressão da 9 permaneceu inalterada, apontando para o envolvimento da via extrínseca. (4) Contudo, verificaram também um aumento da produção de ROS, um importante *trigger* para a via intrínseca da apoptose. (4, 69) Estudaram ainda a expressão dos *death receptors* 4 e 5 após exposição ao ácido ursólico, observando o seu aumento dose dependente nas linhagens tumorais, não se tendo verificado qualquer alteração nas linhagens normais, o que sugere que uma regulação positiva destes recetores possa estar na base da citotoxicidade seletiva do ácido ursólico. Os autores sustentaram também uma inibição da migração celular pelo ácido ursólico. (4)

7.1 Ácido betulínico

O primeiro registo da atividade antineoplásica do ácido betulínico surge em 1995, onde evidenciou eficácia para células de melanoma murino. (1) Desde então, tem-se vindo a mostrar um eficaz agente antineoplásico num largo espetro de linhagens celulares, *in vitro*, e em vários tumores sólidos, *in vivo*. (1, 24, 51, 69)

Alguns resultados mostraram efeitos equiparáveis aos obtidos por alguns fármacos citostáticos usados na terapêutica oncológica (1). Um estudo *in vitro* de 2004, com células de leucemia, revelou que ácido betulínico era mais ativo que 9 das 19 terapêuticas *standard* com as quais fora comparado. (24) A sua combinação, com fármacos de quimioterapia ou radiação ionizante, pode também surtir um efeito sinérgico, estando este já comprovado entre o ácido betulínico e vincristina, paclitaxel, doxorubicina, etoposido, cisplatina, talidomida e mitramicina A. (28, 69) No caso da mitramicina A, o sinergismo observado em células tumorais do pâncreas é substancial, inibindo a migração e invasão destas células em concentrações não tóxicas. (1) Não se sabe o porquê deste sinergismo, mas pensa-se dever-se ao facto de estes fármacos e o ácido betulínico exercerem a sua ação antineoplásica de diferentes formas. (24)

Está também reportada uma ação quimiossensibilizadora por parte do ácido betulínico em linhagens tumorais resistentes a 5-fluorouracil, irinotecano e oxaliplatina, provavelmente pela inibição das proteínas que provocam a resistência. O ácido betulínico reverte assim esta dificuldade terapêutica, aumentando a ação destes fármacos e melhorando a eficácia clínica destes tratamentos antitumorais, sem, no entanto, aumentar os efeitos secundários associados. (1, 28, 69)

O ácido betulínico tem efeitos altamente seletivos para as células tumorais, e mínimos efeitos secundários nas células normais. (1, 24, 26) Há estudos que revelam uma toxicidade 10 vezes superior para células neoplásicas do que para células normais, e muitos têm demonstrado que fibroblastos, linfócitos do sangue periférico, melanócitos e astrócitos, *in vitro*, são mais resistentes ao ácido betulínico que as células neoplásicas. (28, 69) Porém, o mecanismo pela qual se verifica esta seletividade ainda não está completamente esclarecido. Em relação à sua segurança, sabe-se que, mesmo em doses elevadas, não evidencia toxicidade sistémica. (69) Um outro ponto a favor desta ação antineoplásica do ácido betulínico é que, normalmente, o pH dos tumores sólidos é ácido e este bioativo demonstrou uma citotoxicidade aumentada em pH's baixos (pH <6.8). (24, 26)

Estudos em ratinhos revelam uma boa distribuição deste bioativo no tecido tumoral. Contudo, sabe-se que o ácido betulínico tem fraca solubilidade em água, e conseqüente fraca absorção e biodisponibilidade, dificultando o seu estudo e o desenvolvimento de novas terapêuticas. Dada a ampla evidência de aplicabilidade terapêutica, nos últimos anos, o avanço biotecnológico tem sido exponencial. O objetivo tem sido testar modificações estruturais que melhorem o seu perfil farmacológico, e conseqüente eficácia, e desenvolver novos sistemas de administração de ácido betulínico. Atualmente existem várias soluções biotecnológicas,

como as nanoformulações, que melhoram a citotoxicidade e/ou solubilidade do ácido betulínico, mantendo a sua seletividade característica. (1, 69)

Investigação e ensaios experimentais que comprovem a eficácia do ácido betulínico estão atualmente contemplados em neoplasias hematológicas (leucemia mieloide crônica, leucemia mieloide aguda e leucemia linfóide aguda), ginecológicas (mama, ovário e colo do útero), gastrointestinais e hepatobiliares (colorretal, estômago, hepatocelular e pâncreas), neurológicos (glioblastoma, neuroblastoma, glioma e meduloblastoma), nefrourológicos (próstata, bexiga e carcinoma de células renais), músculo-esqueléticas (osteossarcoma, sarcoma de Ewing e rhabdomyosarcoma) e ainda no cancro do pulmão, cabeça e pescoço e melanoma. (1, 24, 28, 69) Além do potencial citotóxico *in vitro*, o ácido betulínico também se tem demonstrado eficaz em tumores sólidos xenográficos *in vivo*, como no carcinoma da mama, pâncreas, próstata e cólon, aumentando a sobrevivência de alguns dos modelos. (28, 69)

Os mecanismos subjacentes a esta atividade são diversos, considerando-se que o ácido betulínico possui múltiplos alvos moleculares. (1) Entre os quais, destacam-se a indução da apoptose, a frenagem do ciclo celular, efeitos antiangiogênicos, inibição de invasão e migração tumoral e imunorregulação. (28, 51)

I. Indução da apoptose

As mitocôndrias têm um papel importante na via intrínseca da apoptose, e as células neoplásicas têm revelado capacidade de suprimir esta via. (69)

Relativamente às propriedades antineoplásicas do ácido betulínico, este é o mecanismo mais amplamente estudado. Está demonstrado em vários estudos, várias linhagens celulares e com ação identificada em várias vias de indução apoptóticas. Porém, o estímulo concreto que desencadeia este processo permanece incerto, admitindo-se que o ácido betulínico possua múltiplos alvos. O mais comum é a sua interferência direta na regulação mitocondrial. (1, 28)

O ácido betulínico provoca uma despolarização membranar, com consequente rutura da membrana celular. (1, 26, 28) Esta alteração da permeabilidade membranar leva à libertação de citocromo C para o citoplasma. Tal libertação vai desencadear uma ativação direta de caspases, que vão clivar um conjunto de proteínas celulares e consequentemente levar à fragmentação de *DNA*. (26, 53, 69) Em vários estudos, o ácido betulínico promoveu uma regulação positiva de caspases, aumentando a sua atividade. (1, 26, 28) No entanto, esta ativação pode considerar-se secundária, resultante da perturbação mitocondrial primária. (69)

Outro mecanismo associado a esta alteração da membrana mitocondrial é a indução da produção de *ROS* pelo ácido betulínico. (69) Este aumento vai igualmente contribuir para a

ativação da via apoptótica com consequente libertação de citocromo C, ativação da cascata de caspases, e apoptose. (26, 53)

Os membros da família de genes *Bcl-2* (*B-cell lymphoma 2*) são responsáveis por manter a integridade da mitocôndria, ao regular a permeabilidade da sua membrana externa e a apoptose por esta via. Dividem-se em dois grupos, os antiapoptóticos e os pró-apoptóticos, capazes de desencadear a apoptose por vários mecanismos. (26, 69) Existe evidência acumulada de que o ácido betulínico possa ter um papel regulador a este nível. (69) O ácido betulínico tem efeito na regulação positiva dos fatores pró-apoptóticos *Bax*, *Bak* e *Mcl-1* e negativa dos antiapoptóticos *Bcl-2* e *Bcl-xL*. (1, 26, 51, 53, 69) Contudo, este campo possui evidência contraditória, com resultados díspares consoante os estudos, pelo que se considera a atuação do ácido betulínico a este nível complexa e dependente do tipo e contexto tumoral, requerendo mais investigação. (28, 69)

II. Antiangiogénese

O ácido betulínico também tem efeitos antiangiogénicos, porém, o mecanismo subjacente a estes não está ainda totalmente esclarecido. (28, 51)

O fator de crescimento de endotélio vascular (*VEGF*), um importante fator na regulação da angiogénese, encontra-se sobre-expresso em vários tipos de tumores. Num estudo com células de cancro da próstata, o ácido betulínico revelou diminuir a expressão do *VEGF*. (69) Este mecanismo antiangiogénico foi igualmente sustentado noutros estudos, como numa linhagem celular de carcinoma endometrial, onde o ácido betulínico mostrou também, indiretamente, diminuir os níveis do *VEGF*. (26, 28)

III. Antimetastático

Num modelo murino de melanoma, o ácido betulínico como adjuvante da vincristina, reduziu significativamente as metástases pulmonares. No carcinoma pancreático, foi exibido um sinergismo entre o ácido betulínico e mitramicina A na inibição da migração e invasão tumoral. (28) Este efeito parece relacionar-se com a via de transição epitelial-mesenquimal. O ácido betulínico demonstrou prevenir esta transição em células de melanoma agressivo. (1, 26) Em células de cancro da mama, o mecanismo demonstrado foi a regulação negativa de MMP's. (1)

IV. Interrupção do ciclo celular

O ácido betulínico tem demonstrado promover a frenação do ciclo celular em várias fases, inibindo assim o crescimento e proliferação tumoral. (26) Diferentes estudos e diferentes linhagens celulares tumorais têm exibido diferentes fases de paragem. Maioritariamente

descreve-se uma paragem em G1, mas há registos de interrupção também nas fases S, G2 e M. (26, 28, 53)

Porém, a evidência aponta para um efeito marcadamente seletivo para as células tumorais. (28)

V. Outros mecanismos

Muitos outros mecanismos têm sido evocados para explicar a atuação do ácido betulínico. Entre estes, os fatores de transcrição *Sp* têm ganho grande destaque. Este tipo de fatores, particularmente o *Sp1*, *Sp3* e *Sp4*, encontram-se sobre-expressos em vários tipos de cancro. A sua importância terapêutica prende-se precisamente com a sua sobre-expressão tumoral, e fraca expressão em tecidos normais. Os *Sp*'s regulam genes importantes para o crescimento, sobrevivência e invasão tumoral. Os genes do *Bcl-2*, do *VEGF*, da survivina e da subunidade *p65* do *NF-κB* são alguns exemplos. Vários estudos apontam que o ácido betulínico inibe a expressão proteica e/ou induz a degradação destes fatores de forma específica. Esta degradação/inibição de *Sp*'s vai consequentemente diminuir a expressão dos genes por eles regulados, exercendo assim uma ação antineoplásica em vários pontos, como na apoptose, na angiogénese e na metastização. (26, 28, 69) Na apoptose, por exemplo, diminui a expressão de survivina, uma proteína antiapoptótica. Num estudo em células de cancro da próstata, bexiga e cólon, foi demonstrado que o ácido betulínico induziu apoptose através de uma infrarregulação de *Sp*'s. (69) Na antiangiogénese, a acima mencionada diminuição da expressão do *VEGF* é também secundária a uma degradação/repressão de *Sp*'s. (26, 69) Na metastização, realça-se o facto de os *Sp*'s também regularem a expressão de mediadores da invasão tumoral. Ao inibi-los, o ácido betulínico evidencia um efeito antimetastático indireto. (69) O cancro da mama, é um dos mais estudados quanto à sobre-expressão de *Sp*'s. Num estudo com linhagens celulares deste, o ácido betulínico demonstrou regular negativamente *Sp1*. Ao diminuir a sua expressão, inibiu o crescimento tumoral. (26)

No cancro da próstata, por exemplo, há uma sobre-expressão da proteína *Lamin B1*. Esta regula a apoptose, proliferação, invasão e metastização tumoral. O ácido betulínico provou suprimir a sua expressão, quer *in vitro*, quer em modelos de tumores xenográficos. (26)

As topoisomerasas são enzimas nucleares que catalisam a quebra e rearranjos de cadeias de *DNA*. A topoisomerase I relaciona-se com o local de quebra do proto-oncogene *RET*, que está envolvido em rearranjos cromossomais e que pode ser encontrado no cancro da tiróide e do pulmão. O ácido betulínico encarcera a topoisomerase I no nucleoplasma e impede a formação de complexos de *DNA* resultantes da sua clivagem. (26)

Além de inibir o crescimento tumoral em ratinhos, o ácido betulínico pareceu também contribuir para a sua imunorregulação. Este demonstrou aumentar o ratio $CD4^+/CD8^+$. Assim, aos efeitos antineoplásicos deste bioativo, já mencionados, pode também estar adjacente uma melhoria da resposta imunitária do hospedeiro. (28)

A proteína 3 do sinal de transdução e ativação da transcrição (*STAT3*) tem um papel importante na regulação do crescimento, sobrevivência, apoptose e invasão de células neoplásicas, e atualmente há evidência que o ácido betulínico a inibe. (26, 28)

7.2 Betulina

Quanto ao seu efeito oncoprotetor, a betulina tem evidenciado, comparativamente a extratos brutos de casca de *Bétula*, resultados divergentes – ora mais eficaz, ora menos eficaz. Tais discrepâncias poderão ser explicadas, por um lado pela existência de impurezas, e, por outro, pela presença de outros triterpenos, com diferentes atividades e modos de ação. (29, 68)

À semelhança do ácido betulínico, a betulina tem revelado não só clara atividade antineoplásica isoladamente, comparável a alguns citostáticos, mas também sinergismo quando complexada com estes. Tal atividade tem-se verificado também em linhagens resistentes a citostáticos. A sua eficácia está demonstrada em diversas linhagens celulares tumorais humanas, porém, também já foi observada ineficácia noutras. Tal poder-se-á explicar pela variabilidade dependente do tipo de neoplasias, método de extração e pureza. (24, 28, 29, 68)

Apesar de este bioativo exercer atividade antineoplásica em múltiplos alvos, os seus mecanismos moleculares ainda não estão completamente decifrados. O seu fraco perfil de biodisponibilidade limita a compreensão do seu verdadeiro potencial efeito terapêutico e explica a maior investigação do ácido betulínico neste campo. (29, 68)

Um dos principais mecanismos evocados é a indução da apoptose, demonstrado em vários estudos e linhagens celulares. Em células *HeLa*, de carcinoma do colo do útero, após exposição de 24h à betulina, observaram-se alterações morfológicas características de apoptose, com concomitante aumento da atividade da caspase 9, apontando para uma modulação da via intrínseca. A via extrínseca foi também implicada nesta ação pró-apoptótica, nomeadamente em células de carcinoma renal, onde se verificou um aumento das caspases 8 e 9. Também outros estudos suportam esta hipótese pró-apoptótica, ao revelar ação da betulina no potencial membranar mitocondrial com aumento de *ROS* e libertação de citocromo C. (29, 68)

A frenagem do ciclo celular é outro mecanismo apontado. À semelhança do ácido betulínico, a interrupção pode-se dar em diferentes fases, consoante a linhagem celular. Tais achados poder-se-ão relacionar com interações da betulina com topoisomerases de *DNA*, que afetam a replicação e divisão cromossómicas. Inibidores de topoisomerases são tidos como indutores da apoptose e a betulina tem revelado capacidade inibitória da topoisomerase II. (68)

Outra atividade da betulina prende-se com a antiangiogénese, demonstrada *in vivo*, ao diminuir a formação de neovasculas em membrana corioalantóica de embriões de galinha, provavelmente por atuação desta no endotélio. Está também demonstrado que a betulina exerce efeito na limitação da migração e metastização tumoral. (28, 68)

A carcinogénese é um processo dinâmico, e admite-se que a inflamação, principalmente a crónica, e a imunomodulação possam ter um papel preponderante. A interação do sistema imunitário com as células neoplásicas tem-se comprovado importante na modulação tumoral, com a imunoterapia a afirmar-se como terapêutica. A vigilância imunológica anticarcinogénica inclui macrófagos, linfócitos e interleucinas, que impedem o crescimento tumoral. Porém, num processo inflamatório crónico, as células neoplásicas podem modular as células imunes, e estas passam a sustentar o ambiente tumoral. A betulina tem um papel imunomodulador, que poderá contribuir para o seu potencial antineoplásico. Estimula a proliferação linfocitária no sangue periférico, modula células dendríticas e inibe a expressão de citocinas pró-inflamatórias, e, contrariamente ao verificado nas células neoplásicas, não induz apoptose nas células imunes. (29)

Apesar do potencial antineoplásico atribuído à betulina, da sua segurança e baixa toxicidade para células não neoplásicas, como fibroblastos e células epiteliais e endoteliais, até ao momento, nenhum ensaio clínico testou a sua aplicabilidade. Existe apenas evidência da sua eficácia e tolerabilidade em condições pré-neoplásicas, como na AK. (68)

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

No mundo atual, a consciencialização da alimentação e suplementação sofreu tremenda atenção. Cada vez se fomenta mais uma alimentação saudável, pelo que a procura e consumo de “produtos naturais”, suplementos e aditivos tem crescido exponencialmente. Neste contexto, outros desafios surgem para reflexão. Por um lado, teremos de ter presente a ideia de que tudo o que é ingerido tem impacto comprovado na nossa saúde, a curto e longo prazo, sendo inclusivamente a dieta uma das estratégias terapêuticas a ser implementada pelo médico. Por outro, a crescente oferta e incessante busca por “produtos milagrosos”, publicitados como indispensáveis em qualquer local, é preocupante. Preocupante não só pela excessiva publicitação, mas também pela facilidade de acesso a produtos cuja regulamentação e vigilância é praticamente residual. Acresce ainda o facto de muitos destes produtos não terem qualquer evidência científica comprovada e de não se conhecerem os seus potenciais efeitos adversos nem possíveis interações medicamentosas.

A contribuição das plantas medicinais na medicina científica pode, de facto, ser frutífera. Contudo, a existência de três premissas é essencial: que a sua evidência científica esteja devidamente comprovada e estabelecida, que a fórmula farmacêutica seja regulamentada e vigiada, e que não haja prejuízo para o doente em questão.

Tendo em conta as crescentes resistências farmacológicas, a elevada expressão mundial de cancro e a epidemia da obesidade, é necessário equacionar novas soluções. Respostas poderão ser encontradas nas plantas, onde muitas são já substrato a inúmeros fármacos atualmente comercializados.

A Bétula, e os seus fitoconstituintes, apresentam algumas vantagens basilares: a abundância, a facilidade de processamento, o bom perfil de segurança e o seu uso ancestral. Contudo, o seu ponto forte assenta na sua vasta ação biofarmacológica. Utilizada empiricamente há séculos, é hoje investigada a vários níveis e vê o seu potencial terapêutico a ser expandido e sustentado a cada dia. Tendo em conta as aplicações supracitadas, é fácil perceber a Bétula como um potencial agente terapêutico.

É interessante ter presente a própria evolução na investigação científica da *Betula spp* e seus principais bioativos, desde o início do século XX até à atualidade. Além de se confirmarem os efeitos para os quais era utilizada ancestralmente, a descoberta de novas áreas de atuação foi notável, inclusivamente com aplicação clínica sustentada. O enfoque deixou de estar unicamente no aparelho geniturinário e passou a englobar áreas potenciais como a oncologia, endocrinologia, dermatologia e neurologia. Contudo, a sua ação anti-inflamatória, base de muitas das restantes ações, continua a ser preponderante.

À luz da informação atual, a utilização dos efeitos cutâneos, especialmente na AK e na cicatrização, e da propriedade antimicrobiológica, particularmente na prevenção/tratamento de ITU's, são as que evidenciam maior eficácia comprovada.

Nas ITU's, os resultados até agora evidenciados certificam o seu uso. *In vitro*, há a demonstração da diminuição da formação de biofilme (efeito anti-*quorum sensing*) e diminuição da motilidade e viabilidade para a *E coli*. *In vivo*, estudos populacionais comprovam a diminuição da bacteriúria e dos sintomas urinários, e o aumento do tempo livre de doença em ITU's recorrentes. Tais achados, juntamente com a boa tolerabilidade e ausência de efeitos secundários significativos, sustentam assim a sua utilização, nomeadamente na profilaxia de ITU's associadas a cateterização das vias urinárias e nas ITU's recorrentes, com implicações na melhoria da qualidade de vida. A dose terapêutica mais consensual é de 750 a 1000 mg em comprimidos, de extrato seco de casca ou folha, em toma única diária. Em alternativa recomenda-se a infusão de 3-5 g de folhas em 150 a 250 mL de água, 2 a 3 vezes ao dia.

Na AK, também os resultados são promissores. A aplicação tópica de gel à base de Bétula demonstrou induzir remissão completa em algumas das lesões e *clearance* >75% na maior parte das restantes. Assim, aliada a um elevado perfil de segurança, considera-se ser de enorme eficácia nesta condição pré-neoplásica, particularmente em estádios mais iniciais. Está recomendada a aplicação diária de uma formulação tópica contendo aproximadamente 80 mg de betulina por cada 1 g de gel. Ainda na área dermatológica, a aceleração do tempo de reepitelização de diferentes tipos de feridas e o bom *outcome* estético posterior, sustenta também uma aplicação eficaz destes géis. A principal vantagem desta evidência reside no facto de se saber que o tempo que decorre até à reepitelização é crítico e está intimamente ligado com a probabilidade de infeção.

A evidência científica proporcionou um grande espectro de novas, potenciais e promissoras aplicações da Bétula e seus fitoconstituintes. Muita da atual investigação está centrada na área oncológica e metabólica. Porém, apesar dos avanços biotecnológicos, e dos resultados de estudos *in vitro*, não existe a transposição para ensaios *in vivo* que comprovem tal eficácia e segurança.

Os efeitos endócrino-metabólicos da Bétula são potencialmente muito auspiciosos. Relativamente à diabetes destaca-se a sua comprovada ação hipoglicemiante por atuação em múltiplos alvos, como a redução da absorção da glicose ou a melhoria do perfil de resistência à insulina. Para além disso, destacam-se igualmente os efeitos demonstrados em algumas das suas complicações, como a nefropatia diabética, onde se observou inclusivamente reversão de parâmetros histopatológicos característicos da doença. Na

síndrome metabólica, parece ser promissor usufruir da ação global desta planta, particularmente pelos efeitos demonstrados na obesidade, diabetes e dislipidemia. A comprovar-se, teria um enorme impacto no tratamento de uma problemática atual de saúde pública, e implicações óbvias na adesão terapêutica, por permitir uma redução da polimedicação. Seria, neste âmbito, muito importante um desenvolvimento biotecnológico que permitisse um incremento da biodisponibilidade destes fitoconstituintes, e a realização de ensaios clínicos para comprovação da sua eficácia e segurança.

O efeito antineoplásico da Bétula tem sido dos mais amplamente estudadas nos últimos anos. Há vários motivos que movem esta contínua investigação: o facto de serem vários os bioativos da Bétula a demonstrarem-se eficazes, a imensa quantidade de neoplasias para as quais já há evidência desta eficácia *in vitro*, os múltiplos mecanismos de ação evidenciados, os diversos alvos modulados (como vias de sinalização, proteínas e fatores de transcrição), o sinergismo comprovado com algumas terapêuticas oncológicas, a reversão de certas resistências a citostáticos e, provavelmente o mais importante, a seletividade com que estes bioativos exercem o seu papel, com mínima lesão para as células não neoplásicas. Esta deverá ser, sem dúvida, uma área a merecer grande destaque nos próximos anos, objetivando a aplicação clínica destes achados. Dever-se-á focar, principalmente, em estudos *in vivo* que atestem a sua eficácia terapêutica, segurança e tolerabilidade, especialmente em humanos, e em estratégias biofarmacológicas que melhorem a sua farmacocinética.

De forma global, a evidência científica recolhida com esta revisão é bastante promissora, e recentra a Bétula como um potencial agente terapêutico. Contudo, é requerida mais investigação, por forma a usufruir das propriedades aqui evidenciadas na prática clínica. Destaca-se, neste sentido, o desconhecimento de alguns mecanismos subjacentes a cada uma das ações evidenciadas, algumas limitações farmacocinéticas e a ausência de estudos em humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Seca AML, Pinto D. Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application. *Int J Mol Sci.* 2018;19(1).
2. Ghimire BK, Tamang JP, Yu CY, Jung SJ, Chung IM. Antioxidant, antimicrobial activity and inhibition of alpha-glucosidase activity by *Betula alnoides* Buch. bark extract and their relationship with polyphenolic compounds concentration. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2012;34(5):824-31.
3. Isidorov V, Szoka L, Nazaruk J. Cytotoxicity of white birch bud extracts: Perspectives for therapy of tumours. *PLoS One.* 2018;13(8):e0201949.
4. Mishra T, Arya RK, Meena S, Joshi P, Pal M, Meena B, et al. Isolation, Characterization and Anticancer Potential of Cytotoxic Triterpenes from *Betula utilis* Bark. *PLoS One.* 2016;11(7):e0159430.
5. Park KJ, Subedi L, Kim SY, Choi SU, Lee KR. Bioactive triterpenoids from twigs of *Betula schmidtii*. *Bioorg Chem.* 2018;77:527-33.
6. Muselin F, Dumitrescu E, Berbecea A, Doma AO, Brezovan D, Savici J, et al. The effect of cisplatin administration on certain trace elements homeostasis in rats and the protective effect of silver birch (*Betula pendula*) sap. *J Trace Elem Med Biol.* 2018;50:474-81.
7. European Medicines Agency. Assessment report on *Betula pendula* Roth and/or *Betula pubescens* Ehrh. as well as hybrids of both species, folium 2014 [Visitado a 17 de agosto de 2018] Disponível em: https://www.ema.europa.eu/documents/herbal-report/final-assessment-report-betula-pendula-roth-betula-pubescens-ehrh-folium_en.pdf
8. Huh JY, Lee S, Ma EB, Eom HJ, Baek J, Ko YJ, et al. The effects of phenolic glycosides from *Betula platyphylla* var. *japonica* on adipocyte differentiation and mature adipocyte metabolism. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2018;33(1):1167-73.
9. Arnold E, Benz T, Zapp C, Wink M. Inhibition of Cytosolic Phospholipase A2alpha (cPLA2alpha) by Medicinal Plants in Relation to Their Phenolic Content. *Molecules.* 2015;20(8):15033-48.
10. Colantonio S, Rivers JK. Botanicals With Dermatologic Properties Derived From First Nations Healing: Part 1-Trees. *J Cutan Med Surg.* 2017;21(4):288-98.
11. European Medicines Agency. Resumo das características do medicamento – Episalvan [Visitado a 12 outubro 2018] Disponível em https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/Episalvan-epar-product-information_pt.pdf

12. Dehelean CA, Soica C, Ledeti I, Aluas M, Zupko I, A GL, et al. Study of the betulin enriched birch bark extracts effects on human carcinoma cells and ear inflammation. *Chem Cent J*. 2012;6(1):137.
13. Silva FS, Oliveira PJ, Duarte MF. Oleanolic, Ursolic, and Betulinic Acids as Food Supplements or Pharmaceutical Agents for Type 2 Diabetes: Promise or Illusion? *J Agric Food Chem*. 2016;64(15):2991-3008.
14. Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kahkonen M, Kujala T, et al. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol*. 2000;56(1):3-12.
15. Sharma A, Thakur R, Lingaraju MC, Kumar D, Mathesh K, Telang AG, et al. Betulinic acid attenuates renal fibrosis in rat chronic kidney disease model. *Biomed Pharmacother*. 2017;89:796-804.
16. Sutariya B, Taneja N, Saraf M. Betulinic acid, isolated from the leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeels, ameliorates the proteinuria in experimental membranous nephropathy through regulating Nrf2/NF-kappaB pathways. *Chem Biol Interact*. 2017;274:124-37.
17. Schwieger-Briel A, Kiritsi D, Schempp C, Has C, Schumann H. Betulin-Based Oleogel to Improve Wound Healing in Dystrophic Epidermolysis Bullosa: A Prospective Controlled Proof-of-Concept Study. *Dermatol Res Pract*. 2017;2017:5068969.
18. Barret JP, Podmelle F, Lipovy B, Rennekampff HO, Schumann H, Schwieger-Briel A, et al. Accelerated re-epithelialization of partial-thickness skin wounds by a topical betulin gel: Results of a randomized phase III clinical trials program. *Burns*. 2017;43(6):1284-94.
19. Cinta-Pinzaru S, Dehelean CA, Soica C, Culea M, Borcan F. Evaluation and differentiation of the Betulaceae birch bark species and their bioactive triterpene content using analytical FT-vibrational spectroscopy and GC-MS. *Chem Cent J*. 2012;6(1):67.
20. Jager S, Laszczyk MN, Scheffler A. A preliminary pharmacokinetic study of betulin, the main pentacyclic triterpene from extract of outer bark of birch (*Betulae alba cortex*). *Molecules*. 2008;13(12):3224-35.
21. Jasicka-Misiak I, Lipok J, Swider IA, Kafarski P. Possible fungistatic implications of betulin presence in betulaceae plants and their hymenochaetaceae parasitic fungi. *Z Naturforsch C*. 2010;65(3-4):201-6.
22. Wojnicz D, Kucharska AZ, Sokol-Letowska A, Kicia M, Tichaczek-Goska D. Medicinal plants extracts affect virulence factors expression and biofilm formation by the uropathogenic *Escherichia coli*. *Urol Res*. 2012;40(6):683-97.

23. Šiman P, Filipová A, Tichá A, Niang M, Bezrouk A, Havelek R. Effective Method of Purification of Betulin from Birch Bark: The Importance of Its Purity for Scientific and Medicinal Use. *PLoS One*. 2016;11(5):e0154933.
24. Alakurtti S, Makela T, Koskimies S, Yli-Kauhaluoma J. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur J Pharm Sci*. 2006;29(1):1-13.
25. Yin J, Ren CL, Zhan YG, Li CX, Xiao JL, Qiu W, et al. Distribution and expression characteristics of triterpenoids and OSC genes in white birch (*Betula platyphylla* suk.). *Mol Biol Rep*. 2012;39(3):2321-8.
26. Zhang X, Hu J, Chen Y. Betulinic acid and the pharmacological effects of tumor suppression (Review). *Mol Med Rep*. 2016;14(5):4489-95.
27. Jiang L, Chen FX, Zang ST, Yang QF. Betulinic acid prevents high glucose-induced expression of extracellular matrix protein in cardiac fibroblasts by inhibiting the TGFβ1/Smad signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2017;16(5):6320-5.
28. Zhang DM, Xu HG, Wang L, Li YJ, Sun PH, Wu XM, et al. Betulinic Acid and its Derivatives as Potential Antitumor Agents. *Med Res Rev*. 2015;35(6):1127-55.
29. Schwiebs A, Radeke HH. Immunopharmacological Activity of Betulin in Inflammation-associated Carcinogenesis. *Anticancer Agents Med Chem*. 2018;18(5):645-51.
30. Halder A, Shukla D, Das S, Roy P, Mukherjee A, Saha B. Lactoferrin-modified Betulinic Acid-loaded PLGA nanoparticles are strong anti-leishmanials. *Cytokine*. 2018;110:412-5.
31. Vandal J, Abou-Zaid MM, Ferroni G, Leduc LG. Antimicrobial activity of natural products from the flora of Northern Ontario, Canada. *Pharm Biol*. 2015;53(6):800-6.
32. Tolmacheva AA, Rogozhin EA, Deryabin DG. Antibacterial and quorum sensing regulatory activities of some traditional Eastern-European medicinal plants. *Acta Pharm*. 2014;64(2):173-86.
33. Oloyede HOB, Ajiboye HO, Salawu MO, Ajiboye TO. Influence of oxidative stress on the antibacterial activity of betulin, betulinic acid and ursolic acid. *Microb Pathog*. 2017;111:338-44.
34. Viszwapriya D, Subramenium GA, Radhika S, Pandian SK. Betulin inhibits cariogenic properties of *Streptococcus mutans* by targeting *vicRK* and *gtf* genes. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2017;110(1):153-65.

35. Gong Y, Raj KM, Luscombe CA, Gadawski I, Tam T, Chu J, et al. The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses. *Antiviral Res.* 2004;64(2):127-30.
36. Xiao S, Tian Z, Wang Y, Si L, Zhang L, Zhou D. Recent progress in the antiviral activity and mechanism study of pentacyclic triterpenoids and their derivatives. *Med Res Rev.* 2018;38(3):951-76.
37. Yu H, Zhang H, Chu Z, Ruan Q, Chen X, Kong D, et al. Combination of betulinic acid and chidamide synergistically inhibits Epstein-Barr virus replication through over-generation of reactive oxygen species. *Oncotarget.* 2017;8(37):61646-61.
38. Sousa PL, Souza R, Tessarolo LD, de Menezes R, Sampaio TL, Canuto JA, et al. Betulinic acid induces cell death by necrosis in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 2017;174:72-5.
39. Vijaya, Yadav AK, Gogoi S. In vitro and in vivo anthelmintic efficacy of two pentacyclic triterpenoids, ursolic acid and betulinic acid against mice pinworm, *Syphacia obvelata*. *J Parasit Dis.* 2018;42(1):144-9.
40. Saudagar P, Dubey VK. Molecular mechanisms of in vitro betulin-induced apoptosis of *Leishmania donovani*. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90(2):354-60.
41. Okragla E, Chraniuk M, Wolska L. MICROTOX TEST AS A TOOL TO ASSESS ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF HERBAL INFUSIONS USED IN URINARY TRACT INFECTIONS. *Acta Pol Pharm.* 2017;74(3):895-901.
42. Cai T, Caola I, Tessarolo F, Piccoli F, D'Elia C, Caciagli P, et al. Solidago, orthosiphon, birch and cranberry extracts can decrease microbial colonization and biofilm development in indwelling urinary catheter: a microbiologic and ultrastructural pilot study. *World J Urol.* 2014;32(4):1007-14.
43. Frumenzio E, Maglia D, Salvini E, Giovannozzi S, Di Biase M, Bini V, et al. Role of phytotherapy associated with antibiotic prophylaxis in female patients with recurrent urinary tract infections. *Arch Ital Urol Androl.* 2013;85(4):197-9.
44. Thakur R, Sharma A, Lingaraju MC, Begum J, Kumar D, Mathesh K, et al. Ameliorative effect of ursolic acid on renal fibrosis in adenine-induced chronic kidney disease in rats. *Biomed Pharmacother.* 2018;101:972-80.
45. Liu CM, Qi XL, Yang YF, Zhang XD. Betulinic acid inhibits cell proliferation and fibronectin accumulation in rat glomerular mesangial cells cultured under high glucose condition. *Biomed Pharmacother.* 2016;80:338-42.

46. Ahangarpour A, Oroojan AA, Khorsandi L, Shabani R, Mojaddami S. Preventive effects of betulinic acid on streptozotocinnicotinamide induced diabetic nephropathy in male mouse. *J Nephropathol.* 2016;5(4):128-33.
47. Clinicaltrials.gov. Betulin [Visitado a 24 de janeiro de 2019] Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=betulin&cntry=&state=&city=&dist=>
48. Clinicaltrials.gov. Betulinic acid [Visitado a 24 de janeiro de 2019] Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=betulinic%20acid>
49. Huyke C, Reuter J, Rodig M, Kersten A, Laszczyk M, Scheffler A, et al. Treatment of actinic keratoses with a novel betulin-based oleogel. A prospective, randomized, comparative pilot study. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2009;7(2):128-33.
50. de Oliveira ECV, da Motta VRV, Pantoja PC, Ilha CSO, Magalhaes RF, Galadari H, et al. Actinic keratosis – review for clinical practice. *Int J Dermatol.* 2018.
51. Pflugfelder A, Andonov E, Weide B, Dirschka T, Schempp C, Stockfleth E, et al. Lack of activity of betulin-based Oleogel-S10 in the treatment of actinic keratoses: a randomized, multicentre, placebo-controlled double-blind phase II trial. *Br J Dermatol.* 2015;172(4):926-32.
52. Kalra J, Lingaraju MC, Mathesh K, Kumar D, Parida S, Singh TU, et al. Betulinic acid alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis and visceral pain in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2018;391(3):285-97.
53. Mohamed SIA, Jantan I, Haque MA. Naturally occurring immunomodulators with antitumor activity: An insight on their mechanisms of action. *Int Immunopharmacol.* 2017;50:291-304.
54. Jingbo W, Aimin C, Qi W, Xin L, Huaining L. Betulinic acid inhibits IL-1beta-induced inflammation by activating PPAR-gamma in human osteoarthritis chondrocytes. *Int Immunopharmacol.* 2015;29(2):687-92.
55. Guo MY, Li WY, Zhang Z, Qiu C, Li C, Deng G. Betulin suppresses *S. aureus*-induced mammary gland inflammatory injury by regulating PPAR-gamma in mice. *Int Immunopharmacol.* 2015;29(2):824-31.
56. Lingaraju MC, Pathak NN, Begum J, Balaganur V, Ramachandra HD, Bhat RA, et al. Betulinic acid attenuates renal oxidative stress and inflammation in experimental model of murine polymicrobial sepsis. *Eur J Pharm Sci.* 2015;70:12-21.

57. Kim KS, Lee DS, Kim DC, Yoon CS, Ko W, Oh H, et al. Anti-Inflammatory Effects and Mechanisms of Action of Coussaric and Betulinic Acids Isolated from *Diospyros kaki* in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages. *Molecules*. 2016;21(9).
58. Zhang BW, Xing Y, Wen C, Yu XX, Sun WL, Xiu ZL, et al. Pentacyclic triterpenes as alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibitors: Structure-activity relationships and the synergism with acarbose. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017;27(22):5065-70.
59. Castro AJ, Frederico MJ, Cazarolli LH, Bretanha LC, Tavares Lde C, Buss Zda S, et al. Betulinic acid and 1,25(OH)(2) vitamin D(3) share intracellular signal transduction in glucose homeostasis in soleus muscle. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;48:18-27.
60. Wulan DR, Utomo EP, Mahdi C. Molecular modeling of *Ruellia tuberosa* L compounds as α -amylase inhibitor: an in silico comparison between human and rat enzyme model. *Bioinformation*. 2014;10(4):209-15.
61. Ajala-Lawal RA, Aliyu NO, Ajiboye TO. Betulinic acid improves insulin sensitivity, hyperglycemia, inflammation and oxidative stress in metabolic syndrome rats via PI3K/Akt pathways. *Arch Physiol Biochem*. 2018:1-9.
62. de Melo CL, Queiroz MG, Arruda Filho AC, Rodrigues AM, de Sousa DF, Almeida JG, et al. Betulinic acid, a natural pentacyclic triterpenoid, prevents abdominal fat accumulation in mice fed a high-fat diet. *J Agric Food Chem*. 2009;57(19):8776-81.
63. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*. 2005;366(9491):1059-62.
64. Cho N, Lee HK, Jeon BJ, Kim HW, Kim HP, Lee JH, et al. The effects of *Betula platyphylla* bark on amyloid beta-induced learning and memory impairment in mice. *Food Chem Toxicol*. 2014;74:156-63.
65. Jiao S, Zhu H, He P, Teng J. Betulinic acid protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by activating the PI3K/Akt signaling pathway. *Biomed Pharmacother*. 2016;84:1533-7.
66. Kaundal M, Zameer S, Najmi AK, Parvez S, Akhtar M. Betulinic acid, a natural PDE inhibitor restores hippocampal cAMP/cGMP and BDNF, improve cerebral blood flow and recover memory deficits in permanent BCCAO induced vascular dementia in rats. *Eur J Pharmacol*. 2018;832:56-66.
67. Wang D, Chen P, Chen L, Zeng F, Zang R, Liu H, et al. Betulinic acid protects the neuronal damage in new born rats from isoflurane-induced apoptosis in the developing brain by blocking FASL-FAS signaling pathway. *Biomed Pharmacother*. 2017;95:1631-5.

68. Krol SK, Kielbus M, Rivero-Muller A, Stepulak A. Comprehensive review on betulin as a potent anticancer agent. *Biomed Res Int.* 2015;2015:584189.
69. Kumar P, Bhadauria AS, Singh AK, Saha S. Betulinic acid as apoptosis activator: Molecular mechanisms, mathematical modeling and chemical modifications. *Life Sci.* 2018;209:24-33.