



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA

MARIANA DE AZEVEDO AGUIAR

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE
DO EXTRATO SECO PADRONIZADO (CLAE-DAD) DE *Amburana cearensis*
(CUMARU) CULTIVADA E CONSTITUINTES QUÍMICOS EM
NEUTRÓFILOS HUMANO**

FORTALEZA

2017

MARIANA DE AZEVEDO AGUIAR

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE
DO EXTRATO SECO PADRONIZADO (CLAE-DAD) DE *Amburana cearensis*
(CUMARU) CULTIVADA E CONSTITUINTES QUÍMICOS EM
NEUTRÓFILOS HUMANO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal do Ceará, como requisito
para a conclusão do Curso de Graduação em
Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida
Moreira Leal.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A23a Aguiar, Mariana de Azevedo.

Avaliação do potencial anti-inflamatório e antioxidante do extrato seco padronizado (CLAE-DAD) de *Amburana cearensis* (cumarú) cultivada e constituintes químicos em neutrófilos humano / Mariana de Azevedo Aguiar. – 2017.

81 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.

Coorientação: Prof. Me. Hilmara Helia de Sousa Amaral.

1. *Amburana cearensis*. 2. cumarina. 3. ácido vanílico. 4. atividade anti-inflamatória. 5. atividade antioxidante. I. Título.

CDD 615

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE
DO EXTRATO SECO PADRONIZADO (CLAE-DAD) DE *Amburana cearensis*
(CUMARU) CULTIVADA E CONSTITUINTES QUÍMICOS EM
NEUTRÓFILOS HUMANO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal do Ceará, como requisito
para a conclusão do Curso de Graduação em
Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida
Moreira Leal.

Aprovada em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Jamile Magalhães Ferreira

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Me. Talita Magalhães Rocha

Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por toda a força, coragem e bênçãos concedidas diariamente.

À minha família, minha mãe Terezinha por ser meu alicerce e minha força diária, aquela que nunca medirá esforços pelos filhos, sempre nos apoiando e amando incondicionalmente. Ao meu pai, Francisco (*in memoriam*) pelos 17 anos de convivência diária dedicados a família e ao trabalho, a saudade é imensa e o amor continua o mesmo. Ao meu irmão Júnior por todo apoio concedido nos estudos e na vida.

Aos tios e primos, pessoas que sempre torcem pelo meu sucesso.

Às minhas amigas de infância Andréia, Brenda, Lara, Mariana, Natália e Nayara, companheiras dos melhores e piores momentos da vida, aquelas com quem eu sempre poderei contar.

Aos amigos de faculdade. Fernanda Campos e sua companhia durante esses 5 anos, compartilhando todos os momentos e sempre me incentivando a vencer os desafios da vida. Fernanda Soares, Stiven e os demais colegas de curso, todos fazem parte dessa história, sou grata por conhecê-los.

À banca, pelo carinho e disponibilidade.

À professora Kalyne, pelo apoio e conhecimentos repassados ao longo dos anos, exemplo de profissional e de mulher.

À professora Tamara, pelos ensinamentos e carinho dedicados durante o período de monitoria.

A todos os professores da graduação, aqueles que continuam formando profissionais de excelência.

Aos colegas de CEFAC, IC's, pós-graduandos e funcionários, companheiros de trabalho e aprendizado, especialmente à Hilmara por toda a paciência e tempo dedicados a mim e a esse trabalho.

À UFC e às instituições CAPES, FUNCAP e CNPQ, por todo o apoio financeiro neste e em outros projetos.

À todos que contribuíram de alguma forma para o cumprimento dessa etapa, muito obrigada!

RESUMO

Estudos anteriores realizados no Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos (CEFAC) comprovaram o potencial anti-inflamatório e antioxidante de *Amburana cearensis* (cumarú) silvestre. Porém, frente ao risco de extinção da espécie devido ao uso na medicina popular e exploração madeireira, estudos tem sido conduzidos pelo nosso grupo, onde a espécie cultivada tem mostrado similaridade química e biológica com a planta silvestre. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade anti-inflamatória e antioxidante do extrato seco (Spray dryer) padronizado de *Amburana cearensis* cultivada (ESPACC) e constituintes químicos, ácido vanílico (AV) e cumarina (CM), visando seu potencial no tratamento de doenças inflamatórias. O ESPACC foi produzido a partir da planta cultivada por 7 meses e o teor de marcadores foi determinado por CLAE-DAD (AV: 2,55 mg/g e CM: 14,25 mg/g). Os neutrófilos foram isolados a partir de fração de sangue total cedido pelo HEMOCE (CAAE 45668515.4.0000.5054). Os efeitos do ESPACC e AV (1, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) sobre a degranulação neutrofílica induzida por PMA foram mensurados pela liberação da enzima MPO que foi reduzida em até 51,2% pelo ESPACC e 87,6% pelo AV, enquanto que a indometacina (36 µg/mL), droga padrão, reduziu cerca de 78,1%. A avaliação dos efeitos do ESPACC, CM e AV sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos ativados por PMA foi mensurada por ensaio de quimioluminescência (sondas luminol e lucigenina) para quantificar as espécies reativas de oxigênio (EROs). A citotoxicidade das drogas foi avaliada pelo teste do MTT. A adição de ESPACC na maior concentração reduziu a produção de EROs marcadas pelo luminol em 62,7% e por lucigenina em 15,4%, a quercetina (50 µg/mL), padrão antioxidante, reduziu em 71,3% e 19,73%, respectivamente. O AV (100 µg/mL) reduziu a produção de EROs marcados por luminol em 63,8% e marcados por lucigenina em 13,9%, comparando-se a quercetina que reduziu em 63,3% e 12,9%, respectivamente. A CM reduziu em menor grau (até 24%) a produção de EROs marcadas por luminol e não reduziu a produção das marcadas por lucigenina. Nenhuma das concentrações investigadas interferiu significativamente na viabilidade celular dos neutrófilos em relação ao grupo controle. Dessa forma, os resultados mostraram que o efeito anti-inflamatório está relacionado pelo menos em parte à presença de CM e AV, sugerindo que estes possuem potencial no tratamento de doenças inflamatórias.

Palavras-chave: *Amburana cearensis*, cumarina, ácido vanílico, neutrófilos, atividade anti-inflamatória, atividade antioxidante

ABSTRACT

Previous studies performed in the Center of Pharmaceutical and Cosmetical Studies (CEFAC) proved the anti-inflammatory and antioxidant potential of wild *Amburana cearensis* (cumaru). However, under the risk of extinction of the species due to its use in popular medicine and logging, studies have been conducted by our group, where the cultivated species showed chemical and biological similarity with the wild one. The objective of this present work was to evaluate the anti-inflammatory and antioxidant activity of standardized dry extract of cultivated *Amburana cearensis* (ESPACC) and chemical constituents, vanillic acid (AV) and coumarin (CM), aiming at its potential in the treatment of inflammatory diseases. The ESPACC was produced from the 7 months old cultivated plant and the marker content was determined by HPLC-DAD (AV: 2.55 mg/g and CM: 14.25 mg/g). The human neutrophils used were isolated from whole blood fraction donated by Hematology and Hemotherapy Center of Ceará (HEMOCE) (CAAE 45668515.4.0000.5054). The effects of ESPACC and AV (1, 10, 25, 50 and 100 µg / mL) over PMA induced neutrophil degranulation were measured by the release of the MPO enzyme which was reduced in up to 51.2% by ESPACC and 87.6% by AV, while indomethacin (36 µg/mL), the standard drug, reduced about 78,1%. The evaluation of the effects of ESPACC, CM and AV on the oxidative metabolism of neutrophils activated by PMA was measured by chemiluminescence assay (luminol and lucigenin probes) to quantify the reactive oxygen species (EROs). The cytotoxicity of the drugs was assessed by the MTT test. The addition of ESPACC at the highest concentration reduced the production of EROs luminol-marked by 62.7% and lucigenin by 15.4%, quercetin (50 µg / mL), standard antioxidant, reduced the amount of 71.3% and 19.73% respectively. The AV (100µg / mL) lowered the production of EROs marked with luminol in 63.8% and by lucigenin in 13.9%, comparing with quercetin that decreased in 63.3% and 12.9%, respectively. The CM reduced to a lesser degree (up to 24%) the production of luminol-marked EROs and did not influence the production of lucigenin-marked EROs. None of the concentrations investigated interfered significantly with neutrophil cell viability in relation to the control group. Thus, the results evidenced that the anti-inflammatory effect is related, at least in part, to the presence of CM and AV, suggesting that they have potential in the treatment of inflammatory diseases.

Key words: *Amburana cearensis*, coumarin, vanillic acid, neutrophils, anti-inflammatory activity, antioxidant activity

LISTA DE ABREVIACÕES

| | |
|----------|---|
| % | Porcentagem |
| °C | Grau(s) centígrado(s) |
| µL | Microlitro(s) |
| g | Gramma(s) |
| mg | Miligramma(s) |
| mL | Mililitro |
| v.o. | Via oral |
| Abs | Absorvância |
| ANOVA | Análise de variância |
| ALT | Alanina transaminase |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| AV | Ácido vanílico |
| CESAC | Cápsulas do extrato seco de <i>Amburana cearensis</i> |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| CLAE-DAD | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Detecção de Arranjo de Iodos |
| CM | Cumarina |
| COX | Ciclooxigenase |
| CpG | Sequência não metilada de DNA |
| DAMP | Padrão molecular associados à danos |
| DMSO | Dimetil sulfoxido |
| EHA | Extrato hidroalcoólico |
| EPACC | Extrato Padronizado de <i>Amburana cearensis</i> Cultivada |
| EPM | Erro padrão da média |
| ERO | Espécie reativa de oxigênio |
| ESPACC | Extrato seco padronizado de <i>Amburana cearensis</i> cultivada |
| fMLP | Peptídeo N-formil-metil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina |
| HBSS | <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> |
| ICAM | Moléculas de adesão intercelular |
| INDO | Indometacina |
| IFN-γ | Interferon γ |
| Ig | Imunoglobulina |

| | |
|----------------|--|
| IL | Interleucina |
| I.P | Intraperitoneal |
| LDH | Lactato desidrogenase |
| LFA-1 | Antígeno-1 de função leucocitária |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| LTB4 | Leucotrieno B4 |
| MFFB | Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira |
| MPO | Mieloperoxidase |
| MTT | Brometo 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio |
| NADH | Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida |
| NET | <i>Neutrophil extracellular trap</i> |
| NO | Óxido nítrico |
| PAF | Fator de ativação plaquetária |
| PAMP | Padrão molecular associado a patógenos |
| PBS | Tampão fosfato salino |
| PG | Prostaglandina |
| PKC | Proteína quinase C |
| PMA | Forbol miristato acetato |
| PMN | Polimorfonuclear |
| PRR | Receptor de reconhecimento de padrões |
| QL | Quimioluminescência |
| RDC | Resolução da Diretoria Colegiada |
| Renisus | Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS |
| TMB | Tetrametilbenzidina |
| TNF - α | Fator de necrose tumoral alfa |
| VCAM | Molécula de adesão celular-vascular |
| WST-1 | 4-[3-(4-Iodo fenil)-2-(4-nitrofenil)-5-tetrazólio]-1,3-benzeno disulfonato |
| XTT | 3-sódio 1-fenil amino carbonil 3,4-tetrazólio benzeno sulfônico hidrato |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Etapas do processo de migração leucocitária..... | 14 |
| Figura 2: Envolvimento da MPO na função de neutrófilos..... | 17 |
| Figura 3: Mecanismos de defesas dos neutrófilos contra patógenos..... | 20 |
| Figura 4: Fotos de <i>Amburana cearensis</i> A.C. Smith: (A) silvestre (B) cultivada..... | 28 |
| Figura 5: Estruturas químicas isoladas de <i>Amburana cearensis</i> silvestre..... | 29 |
| Figura 6: Estruturas químicas de espécimes cultivados de <i>Amburana cearensis</i> | 31 |
| Figura 7: Perfis cromatográficos dos padrões ácido vanílico e cumarina (A) e extrato seco padronizado de <i>Amburana cearensis</i> cultivada (B) | 38 |
| Figura 8: Efeito do ESPACC sobre a degranulação de neutrófilos humano induzidos por PMA determinado pela inibição da liberação de MPO | 42 |
| Figura 9: Efeito do AV sobre a degranulação de neutrófilos humano induzidos por PMA determinado pela inibição da liberação de MPO..... | 43 |
| Figura 10: Perfil de quimioluminescência do ESPACC dependente de luminol (QL lumi) produzida por neutrófilos registrado por minuto (cpm) em função do tempo (minutos)..... | 45 |
| Figura 11: Efeito do ESPACC sobre a produção de quimioluminescência dependente de luminol (QL lum) por neutrófilos ativados com PMA..... | 46 |
| Figura 12: Perfil de quimioluminescência do ESPACC dependente de lucigenina (QL luci) produzida por neutrófilos registrado por minuto (cpm) em função do tempo (minutos)..... | 47 |
| Figura 13: Efeito do ESPACC sobre a produção de quimioluminescência dependente de lucigenina (QL luci) por neutrófilos ativados com PMA..... | 48 |
| Figura 14: Perfil de quimioluminescência da CM dependente de luminol (QL lumi) produzida por neutrófilos registrado por minuto (cpm) em função do tempo (minutos)..... | 49 |
| Figura 15: Efeito da CM sobre a produção de quimioluminescência dependente de luminol (QL lumi) por neutrófilos ativados com PMA..... | 50 |
| Figura 16: Perfil de quimioluminescência da CM dependente de lucigenina (QL luci) produzida por neutrófilos registrado por minuto (cpm) em função do tempo (minutos)..... | 51 |
| Figura 17: Efeito da CM sobre a produção de quimioluminescência dependente de lucigenina (QL luci) por neutrófilos ativados com PMA | 52 |
| Figura 18: Perfil de quimioluminescência do AV dependente de luminol (QL lumi) produzida por neutrófilos registrado por minuto (cpm) em função do tempo (minutos)..... | 53 |

| | |
|--|----|
| Figura 19: Efeito do AV sobre a produção de quimioluminescência dependente de luminol por neutrófilos ativados com PMA | 54 |
| Figura 20: Perfil de quimioluminescência do AV dependente de lucigenina (QL luci) produzida por neutrófilos registrado por minuto (cpm) em função do tempo (minutos) | 55 |
| Figura 21: Efeito do AV sobre a produção de quimioluminescência dependente de lucigenina por neutrófilos ativados com PM | 56 |
| Figura 22: Efeito do ESPACC sobre a viabilidade de neutrófilos humano determinada através do teste do MTT | 57 |
| Figura 23: Efeito do AV sobre a viabilidade de neutrófilos humano determinada através do teste do MTT | 58 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições operacionais para secagem por Spray-dryer do extrato etanólico de *Amburana cearensis* (cumaru) cultivada..... 36

Tabela 2: Condições cromatográficas utilizadas no método para identificação e quantificação por CLAE-DAD dos marcadores químicos de *Amburana cearensis* (cumaru) cultivada..... 37

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 01. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA | 12 |
| 1.1 Inflamação | 12 |
| 1.1.1 Aspectos históricos e gerais | 12 |
| 1.1.2 O papel dos neutrófilos | 15 |
| 1.1.3 Doenças inflamatórias e a farmacoterapia atual..... | 21 |
| 1.2. Plantas medicinais..... | 25 |
| 1.3. <i>Amburana cearensis</i> A.C. Smith: silvestre e cultivada | 26 |
| 1.3.1 Aspectos botânicos, geográficos, etnofarmacológicos e ecológicos..... | 26 |
| 1.3.2 Estudos químicos, farmacológicos e toxicológicos..... | 28 |
| 1.3.3 Aspectos tecnológicos | 32 |
| 02. OBJETIVOS | 34 |
| 2.1. Objetivo Geral..... | 34 |
| 2.2. Objetivos Específicos | 34 |
| 03. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 35 |
| 3.1. Materiais | 35 |
| 3.1.1 Aspectos éticos | 35 |
| 3.1.2 Material botânico..... | 35 |
| 3.1.3 Substâncias químicas e reagentes..... | 35 |
| 3.1.4 Local de execução | 35 |
| 3.1.5 Produção e padronização extrato seco padronizado de <i>Amburana cearensis</i> cultivada (ESPACC) | 36 |
| 3.2 Métodos | 39 |
| 3.2.1 Isolamento de polimorfonucleares | 39 |
| 3.2.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória | 39 |
| 3.2.3 Avaliação da atividade antioxidante mensurada por ensaio de quimioluminescência..... | 40 |

| | |
|---|----|
| 3.2.4 Avaliação da citotoxicidade do ESPACC e AV– Teste do MTT | 40 |
| 3.2.5 Análise estatística..... | 40 |
| 04. RESULTADOS | 41 |
| 4.1. Avaliação da atividade anti-inflamatória do ESPACC e AV em neutrófilos humano: degranulação induzida por PMA mensurada pela liberação da enzima mieloperoxidase (MPO)..... | 41 |
| 4.2. Efeito do ESPACC, CM e AV sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos mensurado por quimioluminescência | 44 |
| 4.3. Efeito do ESPACC e AV sobre a viabilidade celular de neutrófilos mensurado através do teste do MTT | 57 |
| 05. DISCUSSÃO | 59 |
| 06. CONCLUSÕES..... | 63 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 64 |

01. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 Inflamação

1.1.1 Aspectos históricos e gerais

A reação inflamatória é conhecida desde a antiguidade, tendo as suas características clínicas descritas pelos Egípcios em 3000 a.C. Mais tarde, Aulus Cornelius Celsus descreveu pela primeira vez os sinais clássicos da inflamação (STANKOV, 2012) sendo estes apresentados sob a forma de edema (inchaço), rubor (vermelhidão), calor (aumento de temperatura) e dor. Posteriormente, Rudolph Virchow acrescentou um outro sinal designado de perda de função, isto é, ele observou que o órgão perdia a sua função devido à inflamação (GONZÁLEZ-CHAVÉZ, 2010).

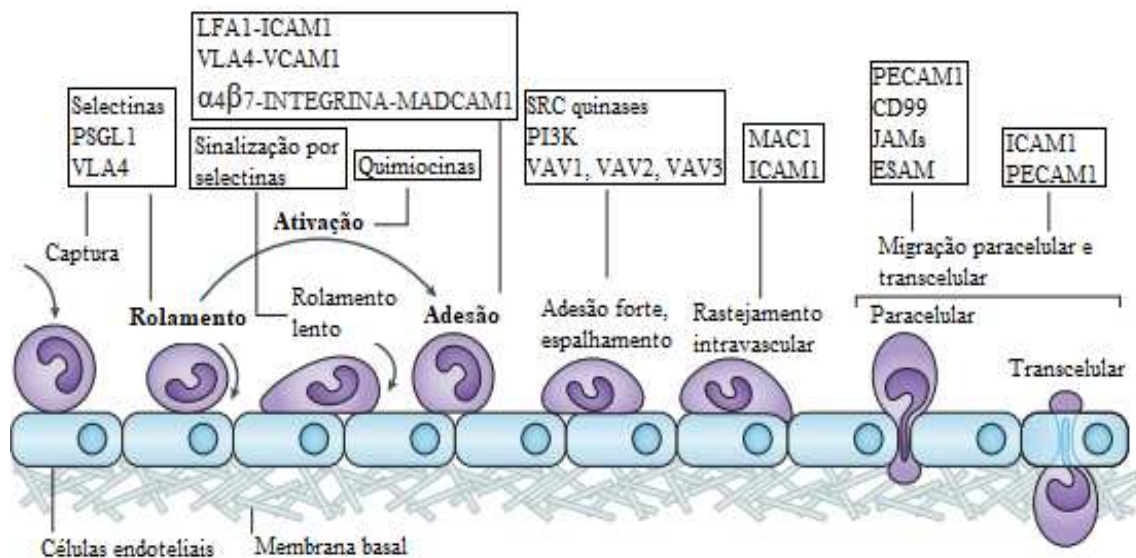
O processo inflamatório é um mecanismo de resposta tecidual dinâmico que se desenvolveu ao longo da evolução, sendo caracterizado por uma resposta natural e essencial proporcionada pelo sistema imune para assegurar a sobrevivência do tecido mediante um dano. As lesões podem ser causadas por patógenos, agentes físicos (radiação, trauma, queimaduras), químicos (toxinas, substâncias cáusticas), necrose tecidual ou reações imunológicas, promovendo a remoção do estímulo nocivo e a recuperação do tecido danificado. (CHANGODRASEKHARAN & SHARMA-WALIA, 2015; AHMED, 2011). O início do processo inflamatório se dá principalmente por uma resposta vascular com hiperemia e mudança na permeabilidade das paredes dos vasos sanguíneos. Na fase inicial, ocorrem alterações que aumentam a permeabilidade do endotélio vascular e levam a um influxo de líquido rico em proteínas do meio intravascular para o interstício, dessa forma há a formação de edema, seguida pelo processo de migração leucocitária que tem um papel importante, visto que amplifica a resposta inflamatória (KUMAR *et al.*, 2015).

A migração leucocitária (**Figura 01**) envolve as etapas de marginalização, rolamento, adesão, transmigração e migração para os tecidos. A ativação das células acontece por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que identificam estruturas moleculares características de patógenos microbianos, já os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) tais como o LPS (lipopolissacarídeo), sequências não metiladas de DNA (CpG), e RNA de dupla fita reconhecem também as moléculas intracelulares derivadas do hospedeiro que são liberadas diante de um dano ou morte

celular e os padrões moleculares associados a danos (DAMPs) – como quimiocinas (IL-8), citocinas (TNF- α), interleucinas (IL-1, IL-6). Quando essas moléculas são reconhecidas, ativam as células em que são expressas para promoverem suas funções antimicrobianas e pró-inflamatórias (KENNEDY & DELEO, 2009).

O primeiro passo da cascata inflamatória é conhecido como marginalização ou captura e é mediado pela família das selectinas, essas moléculas interagem com ligantes glicosilados da superfície de leucócitos levando à captura de leucócitos livres pela superfície dos vasos (KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013). Em seguida vem a etapa de rolamento, onde os leucócitos rolam na direção da inflamação, sendo esse processo também mediado por interações entre selectinas endoteliais e seus ligantes associados (MCDONALD *et al*, 2010). Após essa etapa vem a adesão, esse processo é realizado principalmente pela família das β 2-integrinas e ocorre tanto nas células endoteliais como na matriz extracelular (SCHYMEINSKY *et al*, 2007). O último passo é a migração dos leucócitos do vaso sanguíneo para o tecido inflamado, onde as células buscam dentro dos vasos uma forma de transmigrar causando o mínimo de dano à parede vascular (PHILLIPSON *et al*, 2006).

Os leucócitos polimorfonucleares, principalmente neutrófilos migram para a área lesionada seguindo um gradiente quimiotático, onde mediadores se ligam a receptores dos neutrófilos liberando cálcio e aumentando a motilidade dessas células. Nesse ambiente, os neutrófilos sofrem apoptose e, substituídos por monócitos, passam também a contribuir com o processo inflamatório diferenciando-se em macrófagos, aumentando assim a sua estrutura e capacidade metabólica. Dessa forma, essas células realizam suas funções fagocíticas promovendo a remoção de corpos apoptóticos, além de liberarem citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1. (OLCZYK *et al.*, 2014)

Figura 1: Etapas do processo de migração leucocitária

A cascata de adesão leucocitária atualizada. Os três passos originais são mostrados em **negrito**: **rolamento**, que é mediado por selectinas, **ativação**, mediada por quimiocinas e **adesão**, que é mediada por integrinas. As etapas adicionais: captura (ou amarração), rolamento lento, adesão forte e espalhamento, rastejamento intravascular e transmigração paracelular e transcelular. As principais moléculas envolvidas em cada etapa são indicado em caixas. ESAM, molécula de adesão seletiva de células endoteliais; ICAM1, molécula de adesão intercelular 1; JAM, molécula de adesão juncional; LFA1, antígeno 1 associado à função de linfócitos (também conhecido como $\alpha L \beta 2$ -integrina); MAC1, antígeno de macrófagos 1; MADCAM1, molécula de adesão celular de endereçamento vascular mucoso 1; PSGL1, P-selectina ligante de glicoproteína 1; PECAM1, molécula de adesão de plaquetas / células endoteliais 1; PI3K, 3-quinase de fosfoinosítídeo; VCAM1, molécula de adesão celular vascular 1; VLA4, antígeno 4 muito tardio (também conhecido como $\alpha 4 \beta 1$ -integrina). FONTE: LEY, 2007 adaptado.

Diante do processo inflamatório estabelecido, a inflamação pode se tornar aguda ou crônica. A primeira é uma resposta inicial às lesões, apresentando início rápido e curta duração (horas ou poucos dias), caracterizada pelo acúmulo predominante de neutrófilos, que são as primeiras células recrutadas para o foco inflamatório. Quando a inflamação aguda não é capaz de combater o dano e acaba não eliminando os agentes prejudiciais ao organismo a resposta inflamatória torna-se crônica, podendo apresentar-se por um extenso período (semanas a meses) e caracterizada pelo influxo de linfócitos e macrófagos com proliferação vascular associada e fibrose (cicatrização) (REUTER, 2010).

A resposta inflamatória normal geralmente é benéfica para os seres vivos e ocorre naturalmente. Dessa forma as estruturas e funções de órgãos e tecidos são reestabelecidas. Porém, quando deflagrada inadequadamente ou de maneira exacerbada, esta possui um papel importante na fisiopatologia de várias doenças como artrite reumatoide, asma, aterosclerose, doença de Alzheimer, câncer, obesidade, entre outros (HEADLAND & NORLING, 2015).

Dentre as células inflamatórias que tem um papel importante no desenvolvimento de doenças inflamatórias agudas e crônicas os neutrófilos se destacam.

1.1.2 O papel dos neutrófilos

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no corpo humano, no entanto possuem uma vida curta que é equilibrada por sua liberação contínua da medula óssea (ROSA, 2015). Essas células desempenham um papel crítico na defesa do hospedeiro contra os patógenos invasores, porém também são contribuintes críticos para danos nos tecidos em processos de doenças autoimunes, além de também estarem envolvidos fortemente em doenças do sistema cardiovascular, trombozes, e até vasculites (MÓCSAI, 2015).

Todas as funções desempenhadas pelos neutrófilos durante a resposta inflamatória iniciam-se com sua ativação que pode ser regulada por fatores endógenos como interleucina-8 (IL-8), leucotrieno B4 (LTB4), fragmento C5a e fator de ativação plaquetária (PAF) ou fatores exógenos como o forbol miristato acetato (PMA) e o peptídeo N-formil-metil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina (fMLP) (SADIK *et al.*, 2011). A ligação desses fatores a receptores de membrana acoplados a uma proteína G ou

a ativação direta de enzimas intracelulares desencadeiam diversos mecanismos de sinalização intracelular, marcados pelo aumento intracelular dos níveis de cálcio. (SALMON & AHLUWALIA, 2010).

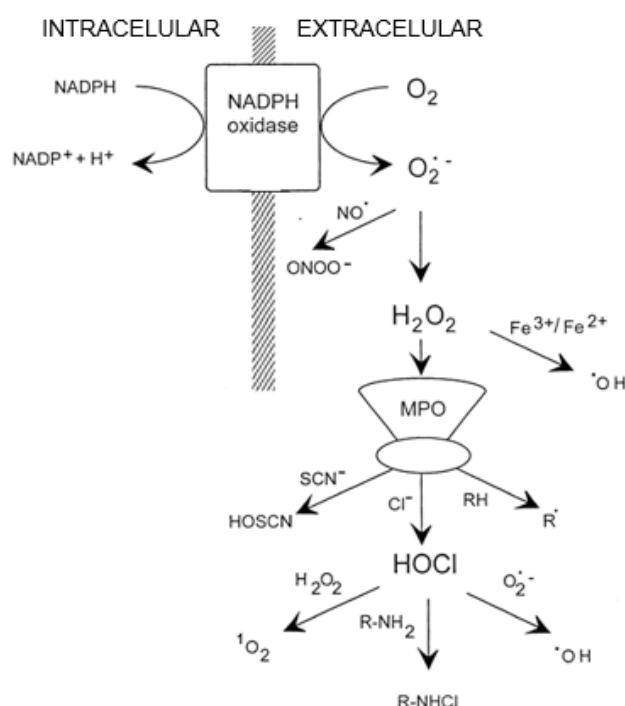
Essas células eliminam os microrganismos através de processos de fagocitose, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) via *burst* respiratório e liberação das substâncias microbidas dos grânulos citoplasmáticos (KOBAYASHI & DELEO, 2009).

O mecanismo de fagocitose dos neutrófilos está relacionado com a interação direta da célula com o microrganismo tanto pelo reconhecimento de PAMPs como mediada por receptores de membrana e do complemento (SILVA, 2016). Esses receptores de membrana são chamados de Fc (FcγRIIa/ CD32, FcγRIIIb/ CD16 e Fc RIV) e são capazes de formar extensões de pseudópodes para englobar as partículas opsonizadas por IgG. Já os receptores de complemento (CR) se ligam a partículas opsonizadas por fragmentos C3b inativados (iC3b), resultando na ativação do sistema complemento e na intensificação da fagocitose dos microrganismos pelo neutrófilo (DIACOVO *et al.*, 1996; STROKA *et al.*, 2013).

O *burst* respiratório é outro mecanismo característico de neutrófilos ativados, onde moléculas microbidas são produzidas pela ativação do complexo enzimático nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfatase-oxidase (NADPH oxidase), composto de proteínas oxidases (BRANZK & LUBOJEMSKA *et al.* 2014). A cascata das espécies reativas de oxigênio começa com a montagem do complexo NADPH oxidase na membrana plasmática e no fagossomo, inicialmente o oxigênio molecular é reduzido a superóxido (O_2^-). O superóxido, embora não seja um oxidante forte, rapidamente sofre dismutação, formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Superóxido também pode reagir com o óxido nítrico (NO), que é produzido em níveis elevados em focos inflamatórios, para formar peroxinitrito ($ONOO^-$), um oxidante forte. Após a degranulação no fagossomo, a MPO (mieloperoxidase) (**Figura 02**) pode reagir com o H_2O_2 para produzir várias espécies reativas, incluindo haletos ácidos como os ácidos hipocloroso (HOCl), hipobromoso (HOBr) e hipotiocianoso (HOSCN), além de radicais tirosil e intermediários reativos de nitrogênios. Esses intermediários podem causar efeitos na função celular, modificando proteínas, lipídeos e/ou DNA. O ácido hipocloroso (HOCl) é principal produto da MPO no fagossomo, sendo mais reativo que o superóxido e é antimicrobiano *in vitro* (WINTERBOURN *et al.*, 2006). Dessa forma, estudos tem demonstrado que existe uma relação entre o acúmulo de radicais livres, especificamente

as espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) e a evolução da inflamação (SALVEMINI et al., 2003).

Figura 2: Envolvimento da MPO na função de neutrófilos



FONTE: do autor

Os grânulos citoplasmáticos são produzidos na etapa final de maturação dos neutrófilos na medula óssea e classificados de acordo com sua afinidade com o corante azul A, seu tamanho, sua morfologia e pela presença da MPO, sendo muito importantes no processo de migração celular por conter uma quantidade elevada de receptores na vesícula secretória e proteínas importantes, necessárias para facilitar a migração pela membrana basal das células endoteliais (BORREGAARD, 2010; STROKA *et al.*, 2013). Dessa forma, esses grânulos são distribuídos em três grandes grupos: primários, também conhecidos como azurófilos ou MPO-positivos, contendo mieloperoxidase, defensinas, lisozima, neutrófilo elastase, proteína de aumento da permeabilidade /bactericida (BPI), protease 3 e catepsina 3; secundários, MPO-negativos ou específicos (lactoferrina e lisozima); e terciários, MPO-negativos ou gelatinase, com poucas proteínas antimicrobianas, mas que são estoque de metaloproteinases, tais como gelatinase, exercendo um papel importante em doenças inflamatórias onde causam danos teciduais (BORREGAARD, 2010; DIACOVO *et al.*, 1996; CARMAN *et al.*, 2007).

A MPO é uma heme-proteína encontrada em grandes quantidades em grânulos azurófilos de neutrófilos, monócitos e alguns macrófagos de tecido, incluindo micróglia, sendo ela fundamental para o *burst* respiratório. É sintetizada em grandes quantidades por promielócitos e promielomonócitos durante a diferenciação dos granulócitos na medula óssea (KLEBANOFF, 2005, MALLE *et al*, 2007). Os neutrófilos acabam liberando MPO por degranulação e pelo processo de morte celular, apoptose ou necrose, quando ativados por mediadores inflamatórios (ODOBASIC *et al*, 2014).

As ações de MPO são mediadas principalmente através de sua atividade enzimática e a geração de reativos intermediários. Porém, existem indícios que demonstram seus efeitos não-enzimáticos agindo na regulação da função de células imunes. (LAU *et al*, 2005, EL KEBIR *et al*, 2008). Além disso, os leucócitos podem aderir a MPO através da ligação de CD11b/CD18, que também pode contribuir para os efeitos pró-inflamatórios da MPO por potencializar o acúmulo de leucócitos nos locais de inflamação. Também já foi demonstrado que a MPO inativa pode aumentar a ativação de macrófagos, tais como a produção de citocinas e indução do *burst* respiratório *in vitro*. Sendo assim, a MPO caracteriza-se por apresentar atividades bactericida e enzimática e como um mediador pró-inflamatório (GRATTENDICK *et al*, 2002). Porém, em situações de intensa ativação celular, ocorre o excesso de atividade da MPO que pode ser prejudicial. A geração excessiva de oxidantes pela MPO está ligada ao dano tecidual em muitas doenças, especialmente aquelas caracterizadas pela inflamação aguda e crônica. (SCHIEVEN *et al.*, 2002).

O papel desempenhado pelos neutrófilos na imunidade passou muitos anos visto como restrito a fase aguda da inflamação e na resistência contra patógenos extracelulares (BORREGAARD, 2010). Essa visão é antiga e propõe que leucócitos polimorfonucleares percorrem a corrente sanguínea e migram para o local da infecção para fagocitar os patógenos. No entanto, recentemente vários estudos tem desafiado esse pensamento e colocado o neutrófilo como uma célula chave na imunidade adaptativa e na resolução da resposta inflamatória crônica (MANTOVANI *et al*, 2011, AMULIC *et al*, 2012).

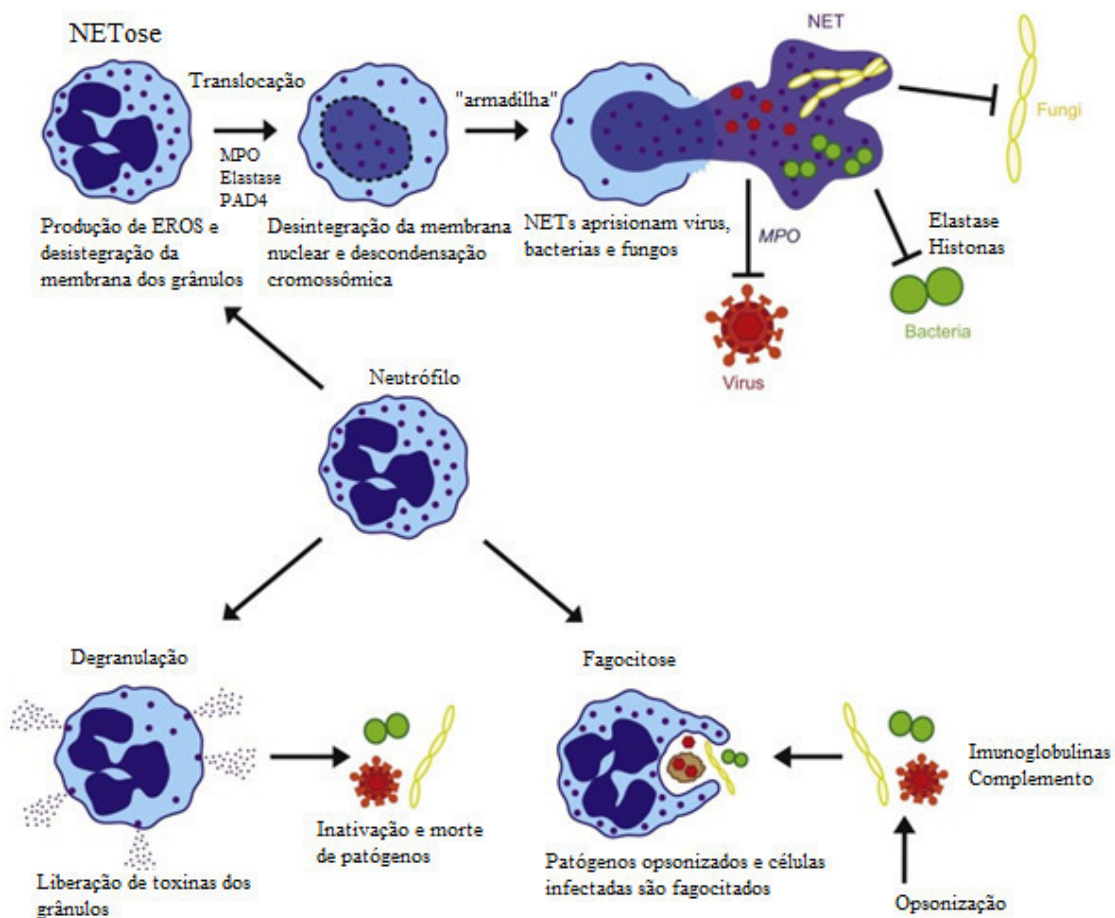
Diante dos mecanismos já citados, há alguns anos descobriu-se que os neutrófilos possuem outro mecanismo particular para o controle e eliminação de agentes infecciosos. Estudos realizados com bactérias mostraram que neutrófilos geram fibras extracelulares e formam espécies de armadilhas, compostas por constituintes dos grânulos e material nuclear, chamadas de “neutrophil extracellular traps” (NETs), que são

responsáveis por aprisionar e matar bactérias extracelularmente (BRINKMANN *et al.*, 2004). Os grânulos neutrofílicos relacionados à essa resposta são primários, secundários e terciários, isso inclui a presença de MPO, BPI (proteína de aumento da permeabilidade /bactericida), elastase, lactoferrina e gelatinase, mas não foram encontradas proteínas citoplasmáticas como actina, tubulina e várias outras, sendo o DNA o maior componente estrutural de NETs (BRINKMANN *et al.*, 2004).

Sabe-se que os neutrófilos ao serem ativados primeiro fagocitam, depois realizam a degranulação e, por fim, entram em apoptose ou NETose (**Figura 03**) (PILLAY *et al.*, 2013; MUNDER *et al.*, 2014). A NETose inicia-se no interior dos neutrófilos, onde a membrana nuclear destaca-se e separa os lóbulos do núcleo; a cromatina descondensa e ocorre a perda da integridade da membrana nuclear que se desagrega dentro das vesículas, onde a desintegração dos grânulos está ocorrendo concomitantemente; o material do nucleossoma das vesículas misturam-se com o citoplasma, formando uma massa homogênea; logo depois ocorre o rompimento da membrana celular, e essa massa formada é ejetada no meio extracelular formando NETs, uma rede de filamentos fibrosos lisos com diâmetros de aproximadamente 17 nm (BRINKMANN *et al.*, 2004) compostos de um amontoado de nucleossomas e domínios contendo proteínas granulares e ocupam um espaço de 10 a 15 vezes maiores que o volume das células que as originam (AMALUC *et al.*, 2012; PILLAY *et al.*, 2013; BRINKMANN *et al.*, 2004).

A liberação de NETs traz vantagens para as células hospedeiras por conter os patógenos, minimizar o dano ao tecido em relação ao mecanismo de liberação de proteínas antimicrobianas na degranulação e por ajudar na modulação da resposta imune. Porém, danos associados a esse tipo de morte celular podem trazer muitos prejuízos aos indivíduos que sofrem de doenças autoimunes, como a artrite reumatoide, lúpus e vasculite, pois NETs são uma fonte permanente de autoantígenos, o que propicia a formação de imunocomplexos e, em contrapartida, ativa DC plasmocitoide, que secretam altas quantidades de IFN1, conduzindo a uma resposta pró-inflamatória exacerbada e maléfica para os portadores desse tipo de patologia (MUNDER *et al.*, 2014; BRINKMANN; ZYCHLINSKY, 2012).

Figura 3: Mecanismos de defesas dos neutrófilos contra patógenos



Os neutrófilos sofrem o processo de NETose levando à formação de NETs sob a influência de vários gatilhos (citocinas, fungos, vírus, bactérias, etc). Essas NETs, consistindo de DNA extracelular embalado com proteínas nucleares (por exemplo, histonas) e grânulos (por exemplo, MPO, elastase), podem capturar e/ou neutralizar agentes patogênicos. Outras funções efetoras dos neutrófilos incluem os mecanismos clássicos de degranulação com secreção de proteínas antimicrobianas e fagocitose de agentes patogênicos. Este último processo é aprimorado através da opsonização pelo sistema do complemento ou imunoglobulinas (FONTE: CORTJENS, 2017).

1.1.3 Doenças inflamatórias e a farmacoterapia atual

Uma vez que o processo inflamatório atinge o seu objetivo, a remoção do agente patogênico, a presença de imunomodulação inflamatória faz-se necessária para resolver a inflamação e devolver a homeostase ao tecido. Porém, quando esta é insuficiente, pode levar à destruição tecidual secundária, contribuindo com a cronicidade de diversas doenças autoimunes e inflamatórias crônicas (BOGDAN *et al.*, 2000).

Como já citado a cronicidade da inflamação pode levar ao surgimento de doenças como a asma, artrite reumatoide, câncer, doenças neurodegenerativas e até a obesidade. O que se tem percebido é que junto ao componente inflamatório o estilo de vida moderno, onde há uma maior exposição a fatores de risco ambientais (alérgenos, radicais livres, radiação solar, entre outros), tem contribuído para o maior acometimento da população com essas doenças (ZIMMERMANN, 2016).

A asma atualmente é descrita pela *Global Initiative National of Asthma* (GINA) como uma doença heterogênea, caracterizada por uma inflamação crônica das vias aéreas, determinada por um histórico de sintomas que incluem chiado, falta de ar, aperto no peito e tosse, os mesmos variando de acordo com a limitação do fluxo aéreo expiratório desencadeadas por alérgenos ou irritantes (GINA, 2017), tais sintomas estão associados a uma complexa base genética (LIANG & WANG *et al.* 2013).

Tradicionalmente, a asma é considerada uma doença de origem alérgica (atópica), porém existe outro fenótipo, o não atópico. Ambas as formas são semelhantes na imunopatologia, mas clinicamente diferentes. A asma de caráter não atópico está associada a quadros de sintomas mais exacerbados e tem sido relacionada a fenótipos com inflamação neutrofílica das vias aéreas. A interleucina-17 (IL-17), uma citocina regulada positivamente nas vias aéreas de alguns pacientes asmáticos, parece ser responsável pela ativação e recrutamento de neutrófilos (MURCIA & VARGAS *et al.* 2016). Logo, a asma associada à produção de IL-17 e a presença predominante de neutrófilos é geralmente caracterizada por uma maior gravidade, obstrução do fluxo de ar e resistência a terapia tradicional (YANG & JIANG *et al.* 2016).

Já a artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória sistêmica, crônica e progressiva, que acomete preferencialmente a membrana sinovial das articulações podendo levar à destruição óssea e cartilaginosa, os sintomas gerais como febre, astenia, fadiga e mialgia podem preceder ou acompanhar o início das manifestações articulares (MOTA, 2013). Nessa patologia os neutrófilos possuem grande importância devido ao

seu poder citotóxico e liberação de moléculas imunorreguladoras. Em pacientes com AR essas células se apresentam ativadas, com aumento da capacidade de produção de EROs e expressão de receptores de membrana de alta afinidade (Fcγ), além de serem uma fonte de autoantígenos que impulsionam os processos autoimunes subjacentes a esta doença (WRIGHT *et al* 2014).

Outra patologia onde o neutrófilo exerce um papel importante é a Doença de Alzheimer (DA) caracterizada pela diminuição rápida e progressiva da memória recente, acompanhada de redução da capacidade motora. Esses sintomas são consequência da degradação de neurônios colinérgicos em áreas do Sistema Nervoso Central (SNC), além do acúmulo de placas senis no cérebro, formadas pelo peptídeo beta amiloide (βA) (RIBIZZI *et al.* 2010). Estudos com camundongos (ZENARO, 2015) mostraram que os neutrófilos estavam presentes em áreas com depósitos de placas senis, onde liberaram NETs e IL-17, além do que a depleção ou a inibição do tráfico de leucócitos, incluindo polimorfonucleares, através do bloqueio de LFA-1 (antígeno-1 de função leucocitária) reduziu a neuropatologia da doença de Alzheimer e melhorou a memória em camundongos que já apresentavam disfunção cognitiva. Outros estudos demonstram que próximo às placas β-amilóides localizadas no hipocampo de pacientes com Alzheimer foi encontrada certa quantidade da enzima mieloperoxidase, além do que a MPO serve como fonte de ferro livre que aumenta o estresse oxidativo celular piorando os processos neurodegenerativos da doença, indicando que a enzima pode contribuir para a patologia da doença. Dessa forma, entende-se que os neutrófilos contribuem para a patogênese da doença de Alzheimer e comprometimento cognitivo (RAY, 2016).

Frente as doenças de caráter inflamatório, desde a antiguidade o homem procura encontrar meios para aliviar a dor, a febre entre outros distúrbios similares relacionados à inflamação. No ano 30 a.C, Celsus utilizava a *Salix alba* (Salgueiro) para aliviar os sinais cardinais da inflamação e séculos depois, Leroux (1829) acabou purificando o princípio ativo do salgueiro (salicina) (VONKEMAN & VAN DE LAAR, 2010).

Atualmente, o tratamento farmacológico anti-inflamatório baseia-se em 3 classes: glicocorticoides, AINES (anti-inflamatórios não esteroidais) e, mais recentemente, terapias biológicas estão sendo utilizadas. Esses novos produtos têm como alvo a inibição dos principais componentes que desencadeiam o processo inflamatório, como linfócitos T e B e citocinas (TNFα e IL-1β) (KOEBERLE, 2014). Porém o uso dessas terapias acaba sendo limitado, visto que elas possuem um elevado custo de

produção e geralmente são disponíveis somente por via parenteral, além de possuírem efeitos colaterais a longo prazo e que podem ser difíceis de prever (BOTZ *et al*, 2016).

Os glicocorticoides, também chamados de corticoides ou corticosteroides, são substâncias derivadas do hormônio cortisol, naturalmente produzido pela glândula suprarrenal. Clinicamente, os glicocorticoides são utilizados na versão sintética, sendo produzidos laboratorialmente, a partir do hormônio cortisol. Os corticoides sintéticos foram formulados em meados do século XX, após inúmeras tentativas dos pesquisadores em encontrarem um composto que auxiliasse no tratamento de doenças reumáticas. Com resultados positivos, o uso do corticoide foi expandido na terapêutica de outras patologias de origem imunológica, por exemplo (PIZARRO, 2014).

Pinheiro (2015) afirma que a capacidade terapêutica dos glicocorticoides ocorre porque o mesmo consegue modular os processos inflamatórios e imunológicos do nosso organismo. Essa substância entra na célula e liga-se ao receptor de esteroides citoplasmático, esse complexo é translocado para o núcleo, onde reconhece sequências de DNA específicas. O complexo glicocorticoide-receptor liga-se a regiões promotoras de certos genes induzindo a síntese de proteínas anti-inflamatórias, como a lipocortina-1 e IκB e de proteínas que atuam no metabolismo sistêmico. Somando-se ao mecanismo de ação, essa substância apresenta distintas vias de administração (oral, tópica, intravenosa, inalatória e intra-articular), fato esse que muitas vezes contribui para a escolha terapêutica.

Apesar de todos os efeitos benéficos contra a inflamação existem várias complicações associadas à terapia prolongada com glicocorticoides. São descritos inúmeros efeitos adversos sistêmicos, entre eles os principais são osteoporose, fraturas ósseas, fraqueza do músculo esquelético, atrofia muscular principal, miopatia, alterações no equilíbrio hidroeletrolítico, no metabolismo de carboidratos, suscetibilidade aumentada a infecção, alterações oculares, dentre outras. Além disso, alguns pacientes tratados cronicamente podem desenvolver redução da sensibilidade ou até mesmo resistência a glicocorticoides, aumentando a vulnerabilidade a respostas inflamatórias exacerbadas (QUAX *et al*, 2013; RODRIGUEZ *et al*, 2016; VAN DER GOES *et al*, 2016).

Outra classe de anti-inflamatórios são os AINES (anti-inflamatórios não esteroidais) que se encontram entre os medicamentos mais prescritos em todo o mundo. São utilizados principalmente no tratamento da inflamação, dor e edema, como também nas osteoartrites, artrite reumatoide e distúrbios músculo-esqueléticos. Essa classe inclui

a aspirina (fármaco mais antigo da classe) e vários outros agentes inibidores da ciclo-oxigenase (COX), seletivos ou não (BATLOUNI, 2010).

Os AINES não seletivos são os mais antigos, designados tradicionais ou convencionais. Os seletivos para a COX-2 são designados COXIBEs. Nos últimos anos, tem sido questionada a segurança do uso dos AINES na prática clínica, particularmente dos inibidores seletivos da COX-2 em presença de determinadas condições e doenças, o que levou à retirada de alguns desses fármacos do mercado. O mecanismo de ação desses fármacos se baseia na ativação da enzima fosfolipase A₂, em resposta a vários estímulos, dessa forma há a hidrólise dos fosfolípidios da membrana, liberando ácido araquidônico no citoplasma. Este, por sua vez, serve de substrato para duas vias enzimáticas: ciclo-oxigenase e lipoxigenase. Pela via da COX é gerada a prostaglandina (PG) H₂, que estimula a formação de vários prostanoides, incluindo diversas prostaglandinas - PGI₂, PGD₂, PGE₂ PGF₂ α -, e tromboxano A₂. Pela via da lipo-oxigenase formam-se leucotrienos, lipoxinas e outros produtos (DAY & GRAHAM, 2013).

Os efeitos adversos desses fármacos acabam por limitar a utilização dos mesmos, visto que a toxicidade gastrointestinal é bastante severa. Os sintomas incluem náuseas, dispepsia e ulceração. Esses efeitos parecem estar relacionados ao papel de cada ciclooxigenase. Se inibida a ação da COX-1, responsável por formar algumas prostaglandinas homeostáticas (PGE₂ e PGI₂), consideradas protetoras da mucosa gástrica e também presentes nos rins, pode se levar a uma toxicidade gastrointestinal e renal (AURIEL *et al*, 2014). Para evitar esses efeitos adversos e manter a integridade da parede do estômago e revestimento mucoso, uma estratégia é o uso de AINES COX-2 seletivos e a administração concomitante de análogos da prostaglandina, ou alternativamente inibidores da secreção de ácido gástrico, como antagonistas dos receptores H₂ de histamina ou inibidores da bomba de prótons (IBP) (SOSTRES *et al*, 2010).

Diante do exposto, conclui-se que, embora necessária, a farmacoterapia atual para o tratamento da inflamação apresenta diversos efeitos adversos a serem superados. Dessa forma a pesquisa de novos produtos com potencial anti-inflamatório faz-se necessária, sendo importante destacar que esses compostos devem ser seguros, eficazes e mais vantajosos que a farmacoterapia tradicional. Assim, os produtos de origem vegetal surgem como uma fonte em potencial para novos fármacos.

1.2. Plantas medicinais

As plantas medicinais são utilizadas pelo homem desde o início de sua história e muito antes do surgimento da escrita a humanidade já utilizava ervas para fins medicinais (TOSCANO RICO, 2011). Atualmente, as plantas medicinais são utilizadas por grande parte da população mundial, como um recurso medicinal alternativo para o tratamento de diversas enfermidades, uma vez que em muitas comunidades, representam um recurso mais acessível em relação aos medicamentos alopáticos (BEVILACQUA, 2010).

No Brasil, os fitoterápicos são uma das opções terapêuticas que se adequam às necessidades de vários municípios no atendimento primário à saúde. Nesse sentido são definidos como fitoterápicos os medicamentos obtidos exclusivamente a partir de derivados de droga vegetal como extratos, óleos e tinturas, enquanto fitofármacos são medicamentos onde o ativo é uma substância isolada e purificada, obtida a partir de matéria-prima vegetal (BRASIL, 2011; BRASIL, 2014).

O maior marco da fitoterapia no país foi a criação do Projeto Farmácia Viva em 1983. Em uma iniciativa do professor Francisco José de Abreu Matos (pesquisador da Universidade Federal do Ceará), o projeto foi idealizado e implantado com o objetivo de produzir medicamentos fitoterápicos acessíveis à população carente. No programa estão presentes algumas espécies de plantas medicinais com destaque para *Amburuna cearensis* A.C. Smith (cumaru), além da *Justicia pectoralis* (chambá), *Lippia sidoides* (alecrim pimenta), *Mikania glomerata* Spreng (guaco), *Myracrodruon urundeuva* (aroeira do sertão), entre outras (MELO *et al*, 2016).

Diante do extenso uso popular das preparações de origem vegetal, o governo brasileiro tem mostrado interesse no assunto, destinando esforços para organizar e incentivar a pesquisa de plantas medicinais. Como exemplos desses esforços temos a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) N°26, de 13 de maio de 2014 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e notificação de produtos tradicionais fitoterápicos, além da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Rénisus), uma lista lançada pelo Ministério da Saúde onde constam 71 espécies brasileiras identificadas com potencial para gerar produtos de interesse ao SUS. A Rénisus tem a finalidade de orientar os estudos e pesquisas para o desenvolvimento de fitoterápicos a serem disponibilizados para uso da população (BRASIL, 2014; PORTAL DA SAÚDE, 2015).

Mais recentemente o Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira (MFFB) publicado pela Anvisa foi aprovado por meio da RDC nº 84 de 17 de junho de 2016 e lançado no Seminário de 10 anos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, realizado no mês de junho, em Brasília/DF. O objetivo do MFFB é orientar a prescrição de plantas medicinais e fitoterápicos a partir de evidências científicas, com informações sobre identificação, nomenclatura popular e científica, parte utilizada, indicações terapêuticas, contraindicações, precauções de uso, efeitos adversos, interações medicamentosas, formas farmacêuticas, vias de administração, posologia, tempo de utilização, superdosagem, prescrição, principais classes químicas, segurança, eficácia e referências (ABIFISA, 2016).

1.3. *Amburana cearensis* A.C. Smith: silvestre e cultivada

1.3.1 Aspectos botânicos, geográficos, etnofarmacológicos e ecológicos

Amburana cearensis A.C. Smith silvestre (**Figura 04**) é uma planta típica da caatinga do nordeste brasileiro, especialmente do Ceará, pertence à família das Leguminosae Papilionidae (Fabaceae), conhecida popularmente como imburana-de-cheiro, cerejeira e cumaru. Apresenta-se como uma árvore de até 20 metros de altura, caracterizando-se por possuir flores brancas, vagem achatada e escura, além da casca vermelha com odor característico de cumarina (CANUTO, 2007).

Do ponto de vista econômico, *A. cearensis* apresenta importância comercial na carpintaria e perfumaria (MAIA, 2004). Aquino *et al.* (2005) propõem a aplicação do pó da madeira em tonéis de aguardente de cana-de-açúcar com o objetivo de acelerar o processo de maturação da bebida devido à riqueza de compostos fenólicos.

Na medicina popular o cumaru possui amplo uso principalmente no tratamento de dores abdominais, reumatismo, tosse, bronquite e asma. As cascas do caule e as sementes são empregadas na medicina caseira em várias regiões do país, sobretudo no Nordeste, onde são utilizadas na forma de lambedor ou chá, no tratamento de resfriados, bronquites, gripes e asma. A casca do caule na forma de banho é empregada contra dores reumáticas, enquanto as sementes são utilizadas no alívio sintomático da dor de dente (ALMEIDA *et al.*, 2010).

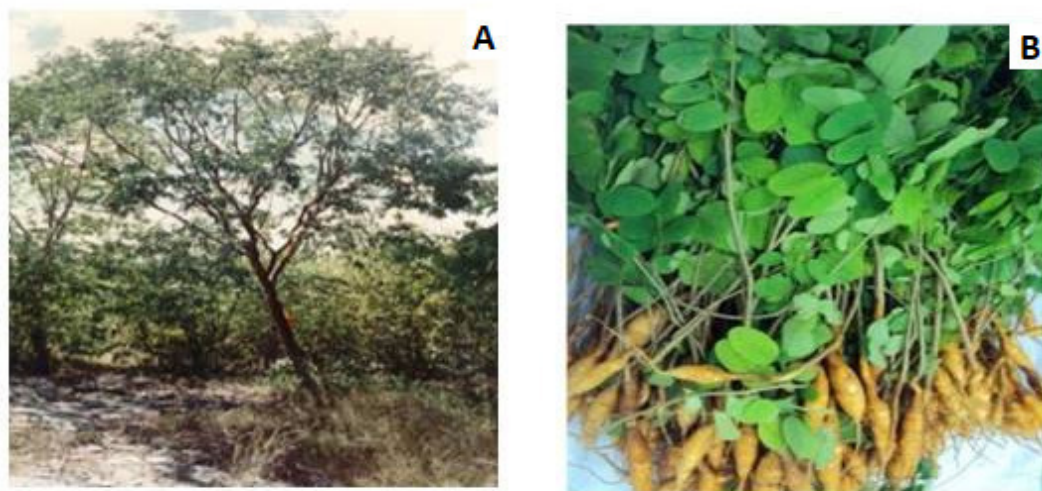
Assim, a crescente demanda na exploração econômica de *A. cearensis* silvestre, principalmente pelo seu uso madeireiro e medicinal, tem contribuído para uma

diminuição da disponibilidade dessa espécie, atualmente considerada ameaçada de extinção (RAMOS *et al.*, 2004; CANUTO; SILVEIRA; BEZERRA, 2010; AMERICAS REGIONAL WORKSHOP, 2013), pois a simples remoção da casca do caule para uso medicinal já causa graves danos à planta. Dessa forma, estudos com a planta cultivada (**Figura 04**) vem sendo realizados, principalmente aqueles voltados para o cultivo da espécie com finalidade de preservação. Dessa forma grupos de pesquisas química, agrônoma e farmacêutica tem unido esforços com o intuito de caracterizar a espécie cultivada, a fim de buscar evidências científicas que apoiem a utilização da mesma na produção de formulações farmacêuticas de *A. cearensis*.

Do ponto de vista de mercado, o cultivo controlado de plantas medicinais apresenta certas vantagens em relação à colheita de espécimes silvestres para a produção de medicamentos fitoterápicos, dentre elas, identificação botânica confiável e matéria-prima uniforme e de boa qualidade. Como as plantas silvestres são dependentes de muitos fatores que não podem ser controlados e a irregularidade da oferta é uma característica comum, o cultivo assegura uma fonte constante de matéria-prima, onde os preços e as quantidades podem ser mais facilmente negociáveis entre o agricultor e a indústria farmacêutica, possibilitando uma previsão de produção mais precisa, além de garantir o aproveitamento sustentável das espécies e evitar sua extinção (SCHIPPMANN; LEAMAN; CUNNINGHAM, 2002; CANTER; THOMAS; ERNST, 2005).

Diversos estudos agrônomicos, relacionados à descrição dos aspectos morfológicos e qualidade das sementes de *A. cearensis*, foram realizados com a finalidade de estabelecer as condições ideais para o desenvolvimento das plantas jovens de cumaru, além de avaliar os fatores poderiam interferir, dentre eles, irrigação, adubação, efeitos da cobertura morta no solo e dos diferentes níveis de sombreamento (CUNHA; FERREIRA, 2003; GUEDES *et al.*, 2010a,b; PIMENTEL; GUERRA, 2011; RAMOS *et al.*, 2004). Além disso, Guedes *et al.* (2010c) também estudaram os fatores que influenciam no processo germinativo, mostrando que a posição e a profundidade da semeadura têm influência direta sobre o desenvolvimento das plântulas de *A. cearensis*.

Figura 4: Fotos de *Amburana cearensis* A.C. Smith: (A) silvestre (B) cultivada

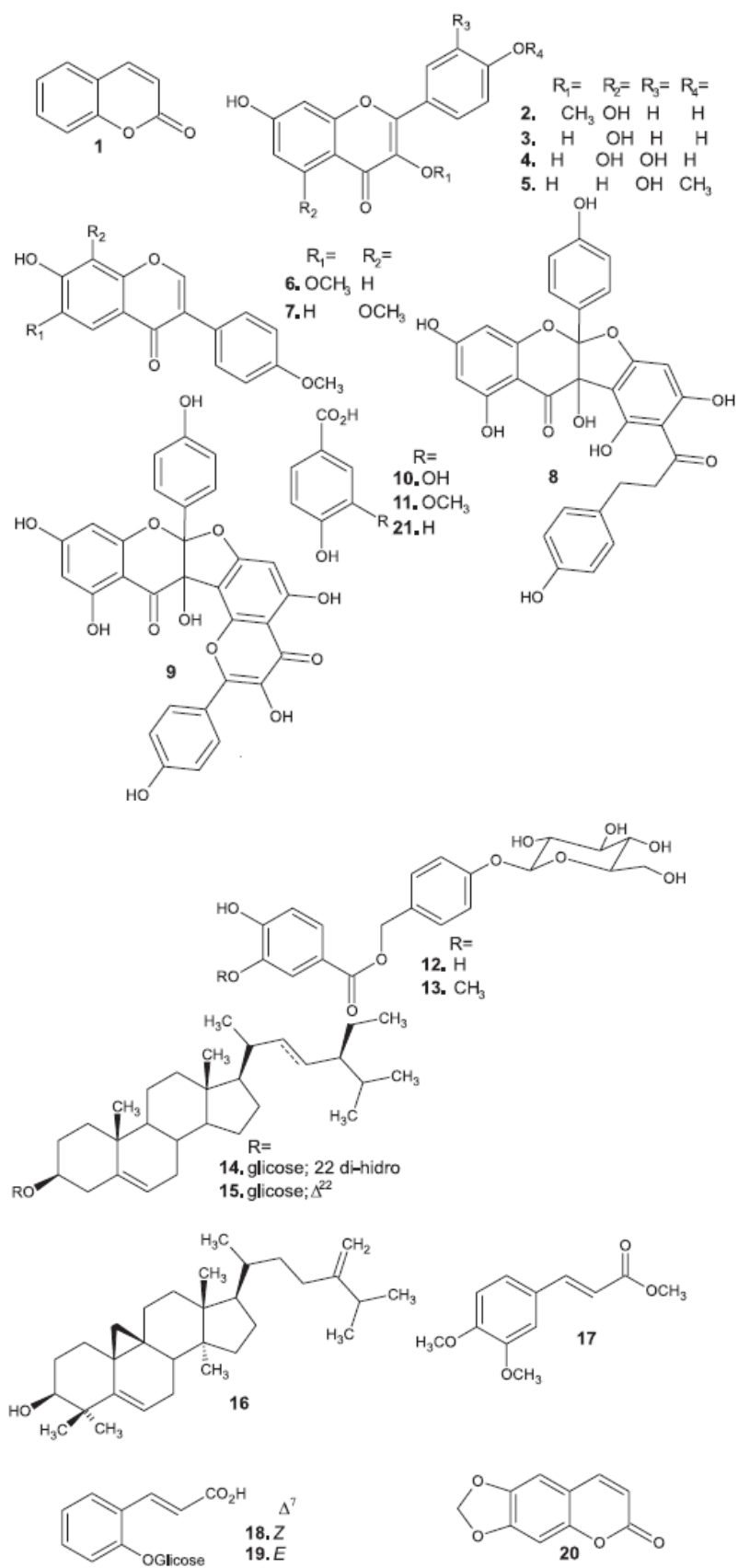


FONTE: LEAL, 2006. CANUTO *et al*, 2008.

1.3.2 Estudos químicos, farmacológicos e toxicológicos

Diante do amplo uso terapêutico na medicina popular, os estudos químicos e farmacológicos com *Amburana cearensis* se intensificaram na década de 90 e desde então diversas substâncias foram identificadas. Os estudos químicos com a planta silvestre foram direcionados principalmente à casca do caule, parte mais utilizada tradicionalmente. Assim, foi possível isolar e identificar vários metabólitos secundários (**Figura 05**): cumarina (1) e compostos fenólicos, principalmente flavonóides como isocampferídio (2), campferol (3); quercetina (4); 4'-metoxifisetina (5); afrormosina (6); 7-hidroxi-8,4'-dimetoxi-isoflavona (7) e os biflavonóides amburanina A (8) e B (9); ácido protocatecuico (10) e ácido vanílico (11); glicosídeos fenólicos, como amburosídeo A (12) e B (13) e esteróides glicosilados bsitosterol; (14) e estigmasterol (15); 24-metilenocicloartanol (16) e 3,4-dimetoxi-cinamato de metila (17) (CANUTO, 2008).

Posteriormente, a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do extrato etanólico das cascas do caule de cumaru mostrou que o amburosídeo A e a cumarina são os compostos majoritários presentes na planta silvestre adulta (LEAL *et al.*, 2011).

Figura 5: Estruturas químicas isoladas de *Amburana cearensis* silvestre

FONTE: CANUTO, 2008.

Outros estudos realizados (LEAL, 1995, 1997, 2003, 2003a, 2003b, 2005, 2006, 2008) demonstraram o perfil farmacológico e toxicológico de extratos e substâncias isoladas da casca do caule de *Amburana cearensis*. O extrato hidroalcoólico (EHA), a cumarina e a fração flavonóide, majoritariamente constituída por isocampferídio, obtidos da casca do caule de *A. cearensis*, apresentam atividades antinociceptiva, anti-inflamatória, antiedematogênica e relaxante muscular em traqueia isolada de cobaias, o que justifica o uso etnofarmacológico da planta como broncodilatador no tratamento de doenças do trato respiratório.

Além disso, outro estudo (LEAL *et al.*, 2008a) mostrou que o isocampferídio e o amburosídio A, isolados de *A. cearensis*, apresentam atividade anti-inflamatória que parece estar relacionada ao bloqueio da síntese e/ou liberação de mediadores como prostaglandinas, histamina e bradicinina, assim como pela inibição da migração de leucócitos para o foco inflamatório possivelmente por reduzir a degranulação de neutrófilos, mensurada pela liberação de mieloperoxidase. Além disso, foi demonstrado que o isocampferídio possui atividade músculo-relaxante que parece estar relacionada, pelo menos em parte, à abertura dos canais de K^+ sensíveis ao Ca^{2+} e ao ATP (LEAL *et al.*, 2006 a,b). O amburosídio A exibe atividade hepatoprotetora (LEAL *et al.*, 2008b) e neuroprotetora (LEAL *et al.*, 2005), em razão de sua atividade antioxidante.

Lopes (2010) demonstrou que as cápsulas do extrato seco de *A. cearensis* (CESAC) apresentam atividade anti-inflamatória em modelos experimentais de edema de pata, peritonite e broncoprovocação induzida por antígeno. De forma semelhante às CESAC, a afrormosina, um isoflavonóide isolado, também apresentou efeito anti-inflamatório, o qual está relacionado à inibição da ativação de neutrófilos, da atividade da mieloperoxidase e da elastase, além da redução dos níveis de $TNF-\alpha$.

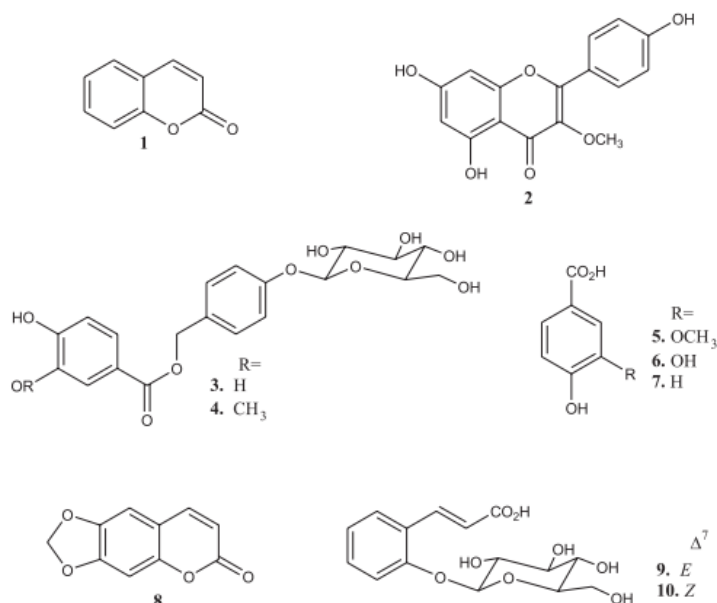
O estudo toxicológico agudo realizado com o EHA das cascas do caule de *A. cearensis*, administrado por via oral (v.o.) em ratos, revelou que a planta apresenta baixa toxicidade, tendo sido observadas mortes apenas pela administração por via intraperitoneal, cuja DL50 foi de $1,79 \pm 0,12$ g/Kg. Na avaliação toxicológica subcrônica, nenhum efeito tóxico significativo ou morte foi observado, embora o EHA na dose de 500 mg/Kg (v.o.), administrado diariamente por 4 semanas, tenha causado um aumento nos níveis da alanina transaminase (ALT). Nesse mesmo estudo, o EHA (500 mg/Kg, v.o.) administrado diariamente durante 50 dias em ratas não interferiu na gestação nem no desenvolvimento da primeira e segunda geração dos animais (LEAL *et al.*, 2003b).

Por outro lado, estudos de citotoxicidade também foram realizados, os quais demonstraram que o extrato seco de *A. cearensis* silvestre e a afrormosina não alteram a viabilidade celular de neutrófilos humanos, através de ensaios que avaliam a integridade da membrana e o metabolismo celular como LDH e MTT, respectivamente (LOPES, 2010).

Paralelamente aos estudos pré-clínicos, estudos clínicos foram realizados com o xarope de cumaru, os quais revelaram que a sua administração se mostrou segura, não causando efeitos tóxicos em voluntários sadios (SOARES *et al.*, 2007). Além disso, um estudo clínico randomizado mostrou que a administração do xarope de cumaru como terapia complementar proporcionou melhora significativa dos sintomas da asma, sem causar toxicidade sistêmica (CARVALHO, 2012).

Estudos químicos realizados com espécimes cultivados de *A. cearensis* permitiram o isolamento de 10 compostos (**Figura 06**), dentre eles 4 são inéditos no gênero, como ácido *p*-hidroxi-benzóico (7), aiapina (8) e os estereoisômeros (*E*) e (*Z*) do ácido *o*-cumárico glicosilado (9 e 10). Os demais compostos também são encontrados na casca do caule da planta silvestre como cumarina (1), isocampferídio (2), amburosídeos A e B (3 e 4), ácido vanílico (5) e ácido protocatecuico (6) (CANUTO; SILVEIRA; BEZERRA, 2010).

Figura 6: Estruturas químicas de espécimes cultivados de *Amburana cearensis*



FONTE: CANUTO, 2010

Estudos farmacológicos realizados com os extratos líquidos da planta cultivada (4, 7 e 9 meses) mostraram que, à semelhança do EHA da planta silvestre, apresentam atividade antinociceptiva em camundongos. Da mesma forma que os extratos, o ácido vanílico também apresentou atividade antinociceptiva por inibição de ambas as fases do teste da formalina. Esse efeito antinociceptivo ocorre, em parte, por um mecanismo dependente do sistema opióide. Por outro lado, o cumaru cultivado por 4 meses foi o que apresentou menor atividade antiedematogênica quando comparado ao de 7 e 9 meses. (LEAL *et al.*, 2004, 2011).

1.3.3 Aspectos tecnológicos

Nos últimos anos diversas pesquisas foram realizadas (ARARUNA, 2008; 2013; LEAL *et al.*, 2011) visando o desenvolvimento de formulações padronizadas usando como matéria-prima ativa o extrato da casca do caule de *Amburana cearensis*.

Dessa forma, foi desenvolvido e validado um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), para identificação e determinação do teor dos marcadores químicos (cumarina e amburosídeo A) nas matérias-primas e produto acabado. Foram determinadas as formas de preparação da droga vegetal e caracterização farmacognóstica, tendo como base os parâmetros de teor de umidade e marcadores na droga vegetal (ARARUNA, 2008).

Estudos seguintes determinaram as condições ideais para a produção da solução extrativa e do extrato seco por Spray dryer. A análise por CLAE mostrou que os marcadores químicos cumarina e amburosídeo A apresentaram teores de $123,0 \pm 0,08\text{mg/g}$ e $496,8 \pm 0,29\text{mg/g}$ de extrato, respectivamente (ARARUNA, 2013).

Já a prospecção química por CLAE dos extratos etanólicos de *A. cearensis* cultivada (parte aérea e xilopódio) coletada aos 4, 7 e 9 meses permitiu a identificação e quantificação de ácido vanílico e cumarina, os quais são os compostos majoritários da planta cultivada. Em relação aos períodos de cultivo, o cumaru cultivado por 7 meses apresentou maior teor de ácido vanílico e cumarina nas concentrações de 3,4 e 4,1 mg/100g de extrato, respectivamente, quando comparado aos demais períodos (4 e 9 meses) (LEAL *et al.*, 2011). Na prospecção fitoquímica do cumaru cultivado foi possível observar a presença de alguns metabólitos secundários, como taninos, alcaloides e cumarinas. Resultados semelhantes foram observados para a planta silvestre, na qual foi

possível identificar a presença de cumarinas e taninos, além de flavonoides e saponinas (LEAL *et al.*, 2000).

Diante disso, estudos farmacêuticos são necessários, principalmente aqueles voltados para o desenvolvimento e padronização da droga vegetal de *A. cearensis* cultivada, além da avaliação da segurança e eficácia, com ênfase para sua indicação como ferramenta terapêutica em doenças inflamatórias. Esses estudos fornecerão subsídios que justifiquem a utilização da planta cultivada como matéria-prima ativa para o desenvolvimento de fitoterápicos.

02. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória, antioxidante e a citotoxicidade do extrato seco padronizado de *Amburana cearensis* cultivada (ESPACC) e constituintes químicos, ácido vanílico e cumarina em neutrófilos humano.

2.2. Objetivos Específicos

- a. Avaliar os efeitos do ESPACC e AV sobre a degranulação de neutrófilos humano induzida por PMA;
- b. Avaliar os efeitos do ESPACC, AV e CM sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humano ativados por PMA;
- c. Investigar o efeito do ESPACC e AV sobre a viabilidade de neutrófilos humano.

03. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos e protocolos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana (COMEPE) da Universidade Federal do Ceará (CAAE 45668515.4.0000.5054).

3.1.2 Material botânico

Amburana cearensis foi cultivada a partir de sementes coletadas de plantas matrizes nativas localizadas na zona rural do município de Quixeramobim – Ceará (Brasil) e semeadas no setor de Horticultura/ Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, sob a coordenação do Prof. Dr. Marcos Esmeraldo.

As partes aéreas e xilopódios de *A. cearensis* foram coletadas aos 7 meses de cultivo. Exsiccatas da espécie (nº 52618 e 52619) estão depositadas no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará.

3.1.3 Substâncias químicas e reagentes

Cumarina, Ácido vanílico, forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), mieloperoxidase, indometacina, dimetilsulfóxido (DMSO), brometo 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), 5-amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinodiona (luminol), 10,10'-dinitrato de dimetil-bis-acrinidina (lucigenina), Triton X-100, 3,3',3,5'-tetrametilbenzidina (TMB), gelatina (Difco).

3.1.4 Local de execução

Os experimentos realizados foram executados no Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos (CEFAC) da Universidade Federal do Ceará.

3.1.5 Produção e padronização extrato seco padronizado de *Amburana cearensis* cultivada (ESPACC)

O extrato seco de *A. cearensis* cultivada foi preparado por maceração da droga vegetal, a mesma foi previamente pulverizada e submetida ao processo de extração por 24h a temperatura ambiente, em seguida foram realizados dois ciclos de turbólise de 5 minutos cada, sem que ultrapassasse a temperatura de 37°C. O solvente extrator utilizado foi etanol na proporção droga vegetal:solvente de 1:4 (m/v) de acordo com a metodologia descrita por Lima (2013) modificada.

A secagem do extrato foi realizada em Spray-dryer de acordo com metodologia descrita por Araruna *et al.* (2013) e o adjuvante utilizado foi aerosil 30% **(Tabela 01)**.

A determinação dos teores de marcadores, ácido vanílico e cumarina no extrato seco de cumaru cultivado foi realizada utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) contendo injetor automático e forno para coluna, Waters, modelo 2695, acoplado a detector de arranjo de diodos (DAD), Waters, modelo 2996. As separações foram realizadas em coluna analítica X-Terra (Waters) com fase reversa octadecilsílica (C18) de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro, preenchida com partículas esféricas de 5 µm. A fase móvel consistiu em duas soluções, tampão acetato de amônio 5 mM, pH 3,46 (Fase A) e acetonitrila grau CLAE (Fase B). As fases móveis foram filtradas a vácuo por membrana filtrante com poro de 0,45 µm (Millipore, EUA) e, em seguida, desgaseificadas em banho ultrassônico **(Tabela 02)**.

Tabela 1: Condições operacionais para secagem por Spray-dryer do extrato etanólico de *Amburana cearensis* (cumaru) cultivada

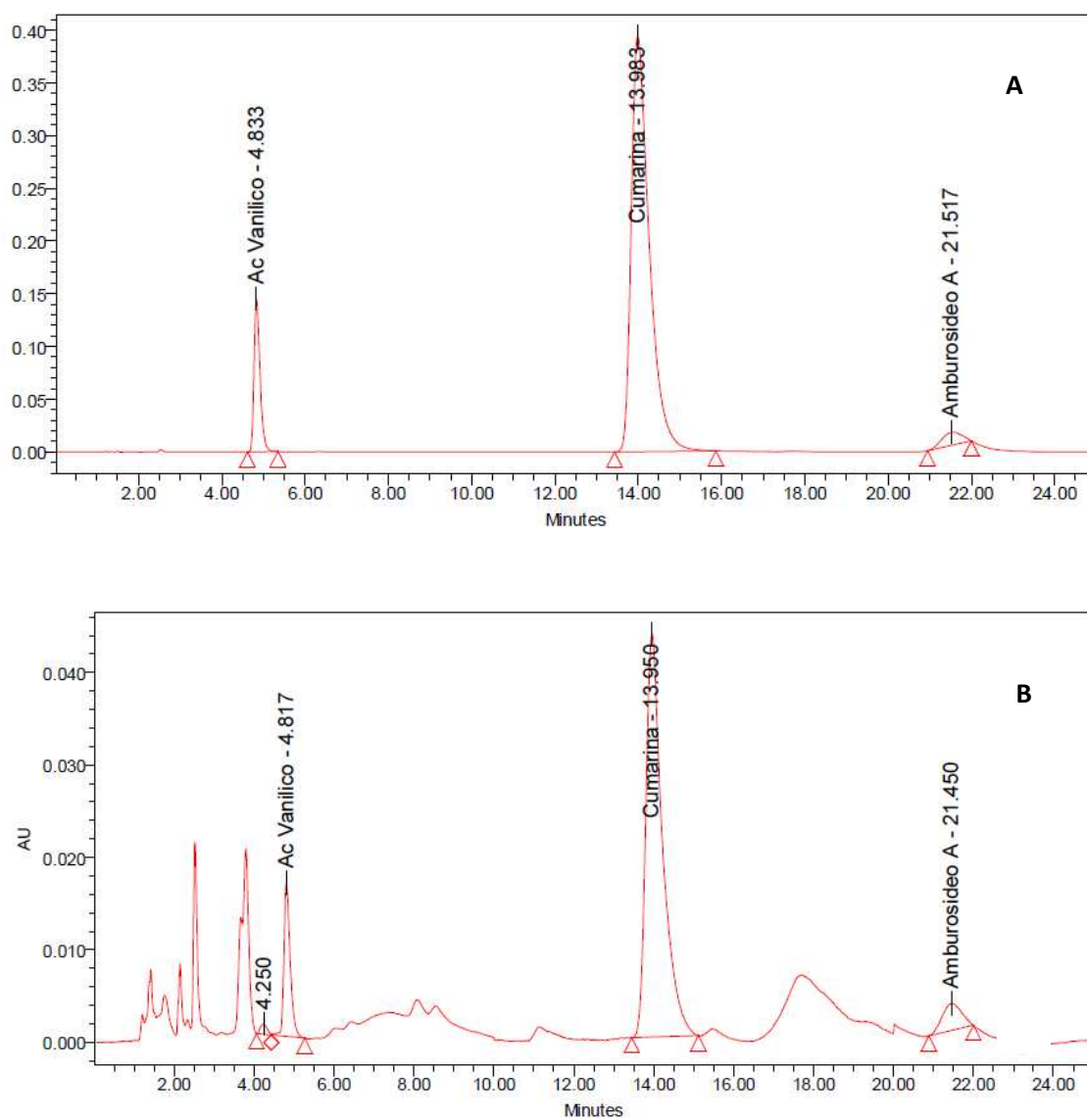
| PARÂMETROS | DADOS EXPERIMENTAIS |
|--|---------------------|
| Temperatura de saída do ar de secagem (°C) | 52 |
| Temperatura de entrada do ar de secagem (°C) | 100 |
| Fluxo de alimentação (mL/min) | 1 |
| Fluxo de ar (L/min) | 40 |

Tabela 2: Condições cromatográficas utilizadas no método para identificação e quantificação por CLAE-DAD dos marcadores químicos de *Amburana cearensis* (cumaru) cultivada

| PARÂMETRO | ESPECIFICAÇÃO |
|-------------------|---|
| Coluna | X-Terra C18 (250 x 4,6 mm), 5 µm |
| Pré-coluna | X-Terra C18 (20 x 3,9 mm), 5 µm |
| Temperatura | 32°C |
| Deteção | UV – DAD: 261 e 277 nm |
| Volume de injeção | 20 µl |
| Tempo de corrida | 25 min |
| Fase móvel | Fase A: acetonitrila Fase B: água |
| Solução diluente | Fase móvel, proporção 8:92 (Fase A:Fase B, v/v) |
| Eluição | Isocrática |

A análise por CLAE-DAD do extrato seco de *A. cearensis* cultivada permitiu a identificação e quantificação de dois marcadores químicos, ácido vanílico e cumarina. A identificação foi confirmada pela comparação do tempo de retenção dos padrões de trabalho (Sigma, EUA) (**Figura 7**) e os teores encontrados foram de: 2,55 mg/g de droga vegetal para o ácido vanílico e 14,25 mg/g de droga vegetal para a cumarina.

Figura 7: Perfis cromatográficos dos padrões ácido vanílico e cumarina (A) e extrato seco padronizado de *Amburana cearensis* cultivada (B)



3.2 Métodos

3.2.1 Isolamento de polimorfonucleares

Polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos (80 - 90%), foram isolados a partir de sangue humano cedido pelo Centro de Hemoterapia e Hematologia do Ceará – HEMOCE (resíduos de “buffy coat”) utilizando o método descrito por Henson (1971), modificado por Lucisano & Mantovani (1984). O sangue foi centrifugado, o plasma desprezado, a suspensão de células foi lavada diversas vezes com soluções salina e usou-se solução de gelatina 2,5% (p/v) para formar um gradiente de separação dos componentes sanguíneos. Depois de isolados, os neutrófilos foram mantidos no meio HBSS (*Hanks balanced salt solution*) em gelo. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de exclusão ao corante Azul de Tripán, a partir da contagem de células em microscópio óptico.

3.2.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória

A suspensão de neutrófilos (5×10^6 células/mL) foi incubada a 37°C com ESPACC e AV (1, 10, 25, 50 e 100 µg/mL), DMSO (controle), Hanks (células não tratadas) ou indometacina (100 µg/mL – droga padrão) por 15 minutos a 37°C. A seguir foi adicionado PMA (0,1 µM) por 15 minutos a 37°C. Decorrido esse tempo, o material foi centrifugado durante 10 minutos e o sobrenadante rico em MPO, liberada devido à estimulação, foi utilizado no ensaio (ÚBEDA, 2002).

Para determinação da concentração de mieloperoxidase foi adicionado ao sobrenadante obtido na centrifugação: PBS, tampão fosfato e H₂O₂ (0,012%). Após 5 minutos a 37°C foi acrescido 3,3',3,5'-tetrametilbenzidina (TMB 1,5 mM) e a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico (1,5 M; pH 3,0). A leitura foi realizada a absorbância de 620 nm.

3.2.3 Avaliação da atividade antioxidante mensurada por ensaio de quimioluminescência

Neutrófilos humano (5×10^6 células/mL) foram incubados a 37°C por 20 minutos com ESPACC, AV e CM (1, 10, 25, 50 e 100 µg/mL), e das sondas quimioluminescentes luminol (280 µM) ou lucigenina (150 µM). Após o período de incubação, foi adicionado o estímulo (PMA 0,1 µM) e acompanhou-se a produção de QL, em cpm (contagem de fótons por minuto), durante 40 minutos a 37°C com o auxílio de leitora de microplacas. Em todos os ensaios realizados foi mensurada a produção espontânea de QL lum ou QL luci das células na ausência de estímulo. A quercetina (50 µg/mL) foi utilizada como droga padrão. Os resultados são expressos em percentual de inibição da emissão de quimioluminescência (PAULA *et al*, 2009).

3.2.4 Avaliação da citotoxicidade do ESPACC e AV– Teste do MTT

Neutrófilos humano (5×10^6 células/mL) foram incubados por 30 minutos a 37°C com ESPACC e AV (1, 10, 25, 50 e 100 µg/mL), DMSO (veículo da droga), Hanks (células não-tratadas) ou Triton x-100 (0,2% v/v - padrão citotóxico) em placa de 96 poços. Após o período de incubação a placa foi centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 200 µL da solução de MTT (10 mg/mL) seguido de uma incubação de 3h a 37°C. Passado o período de incubação foi realizada uma segunda centrifugação nas mesmas condições da primeira, o sobrenadante foi descartado e adicionado 150 µL de DMSO para a solubilização do sal de formazam. A placa foi agitada durante 15 minutos com o auxílio de um agitador de placas e a absorbância foi medida em leitor de microplacas a 560 nm. A viabilidade celular foi expressa através do valor percentual em relação ao grupo controle.

3.2.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism 6.0 (USA). Todos os dados estão representados por média \pm erro padrão da média (E.P.M). A significância estatística das diferenças entre os grupos foi determinada por análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Tukey, quando $p < 0,05$.

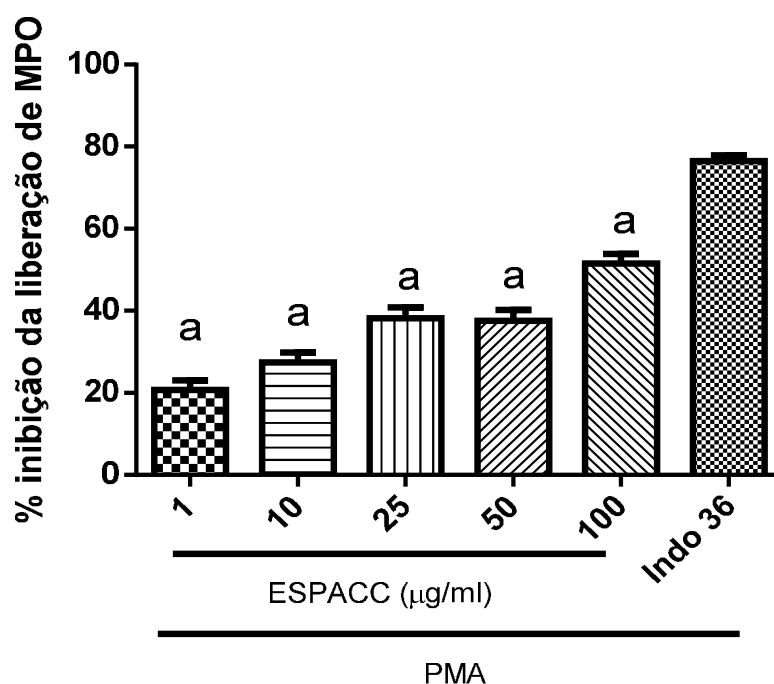
04. RESULTADOS

4.1. Avaliação da atividade anti-inflamatória do ESPACC e AV em neutrófilos humano: degranulação induzida por PMA mensurada pela liberação da enzima mieloperoxidase (MPO)

O efeito do ESPACC sobre a degranulação dos neutrófilos está representado na **Figura 8**. O ESPACC, após 15 minutos de incubação, inibiu a degranulação de neutrófilos induzida por PMA conforme suas concentrações, 1 µg/ml: $20,71 \pm 2,33\%$; 10 µg/ml: $27,42 \pm 2,47\%$; 25 µg/ml: $38,20 \pm 2,65\%$; 50 µg/ml: $37,68 \pm 2,5\%$ e 100 µg/ml: $51,50 \pm 2,33\%$. Já a indometacina (36 µg/mL), anti-inflamatório padrão, inibiu em $76,43 \pm 1,4\%$.

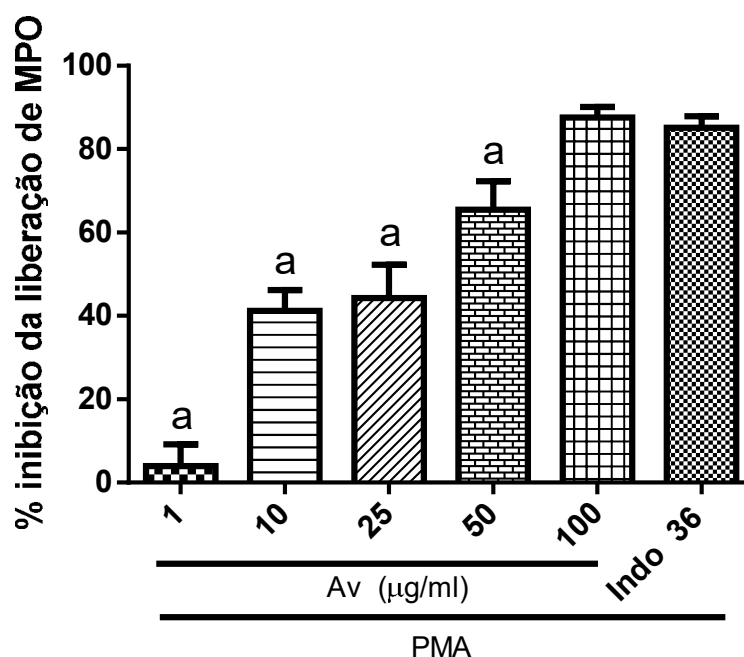
O AV reduziu a liberação de MPO induzida pela degranulação dos neutrófilos em até $87,64 \pm 0,87\%$ na maior concentração investigada (100µg/ml), proporcionando um efeito superior à indometacina (36µg/mL) que inibiu $79,85 \pm 1,7\%$ a liberação da enzima (**Figura 9**).

Figura 8: Efeito do ESPACC sobre a degranulação de neutrófilos humano induzidos por PMA determinado pela inibição da liberação de MPO



Neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados com ESPACC (1, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) e posteriormente incubados com PMA (0,1 µM). INDO: Indometacina, droga padrão. Os resultados obtidos na presença das drogas foram comparados ao grupo controle (100% de liberação de MPO). Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. (a: $p < 0,05$ vs. indometacina, ANOVA- Tukey).

Figura 9: Efeito do AV sobre a degranulação de neutrófilos humano induzidos por PMA determinado pela inibição da liberação de MPO



Neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados com AV (1, 10, 25, 50 e 100 µg/mL e posteriormente incubados com PMA (0,1 µM). INDO: Indometacina, droga padrão. Os resultados obtidos na presença das drogas foram comparados ao grupo controle (100% de liberação de MPO). Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. (a: $p < 0,05$ vs. indometacina, ANOVA- Tukey)

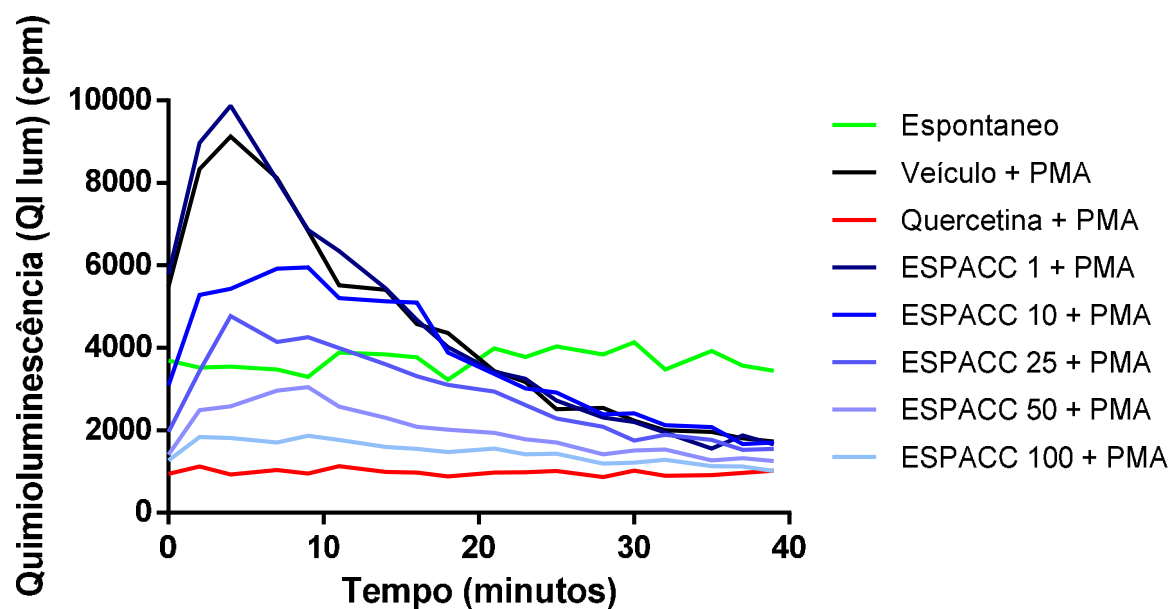
4.2. Efeito do ESPACC, CM e AV sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos mensurado por quimioluminescência

Para avaliar a atividade antioxidante do ESPACC, CM e AV foram realizados ensaios de quimioluminescência, utilizando como sondas o luminol (Ql lum) e a lucigenina (Ql luci). Pode-se observar que a adição de ESPACC em concentrações crescentes à suspensão de células reduziu a produção EROs marcadas pelo luminol em até 62,72%, enquanto que a quercetina, flavonol antioxidante, promoveu uma redução de 71.26% (**Figuras 10 e 11**). O ESPACC também reduziu, embora em menor extensão, até 15% a produção de EROs marcadas por lucigenina, a partir da concentração de 25 µg/ml (**Figuras 12 e 13**), dessa forma a redução causada pelo ESPACC pode ser comparada a quercetina, que obteve uma redução de 19,72%.

O tratamento das células com CM causou uma discreta, porém significativa redução de 23,49% nas EROs marcadas por luminol (**Figuras 14 e 15**), no entanto não foi capaz de reduzir a produção de EROs marcados por lucigenina (**Figuras 16 e 17**). Todavia, a quercetina obteve uma redução de 55,21% e 27,54%, para as EROs marcadas por luminol e lucigenina, respectivamente.

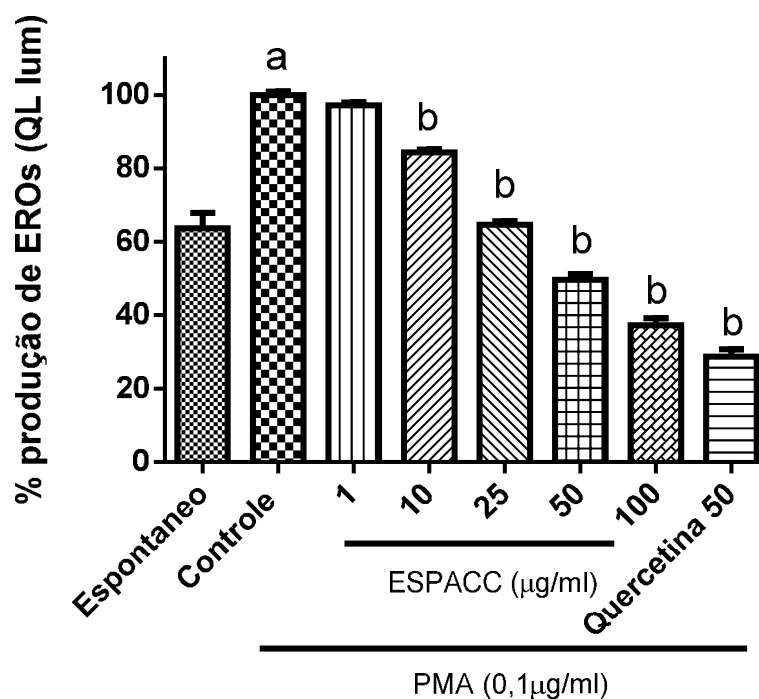
A adição de AV nas células promoveu uma redução na produção de EROs marcados por luminol (**Figuras 18 e 19**) a partir da concentração de 10µg/ml, obtendo uma inibição de até 62,82%, podendo ser comparada ao padrão antioxidante que inibiu em 63,28% a produção de EROs. O AV também gerou uma resposta similar a quercetina na redução de EROs marcados por lucigenina (**Figuras 20 e 21**), os quais reduziram em 13,9% e 12,9%, respectivamente.

Figura 10: Perfil de quimioluminescência do ESPACC dependente de luminol (QL lumi) produzida por neutrófilos registrado por minuto (cpm) em função do tempo (minutos)



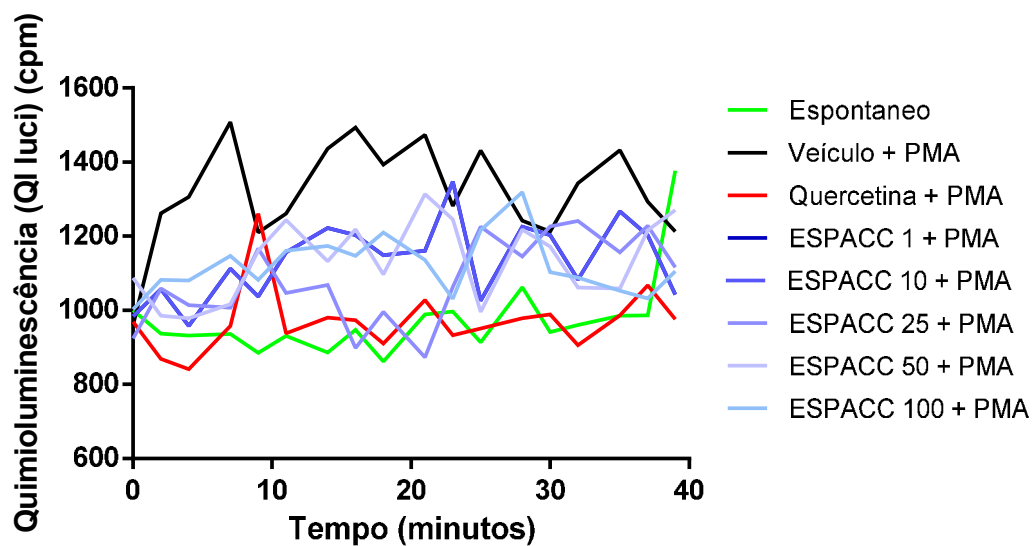
Neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados com ESPACC (1, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) na presença da sonda quimioluminescente luminol e posteriormente incubados com PMA (0,1 µM). Espontâneo: células não estimuladas. Controle: veículo (DMSO).

Figura 11: Efeito do ESPACC sobre a produção de quimioluminescência dependente de luminol (QL lum) por neutrófilos ativados com PMA



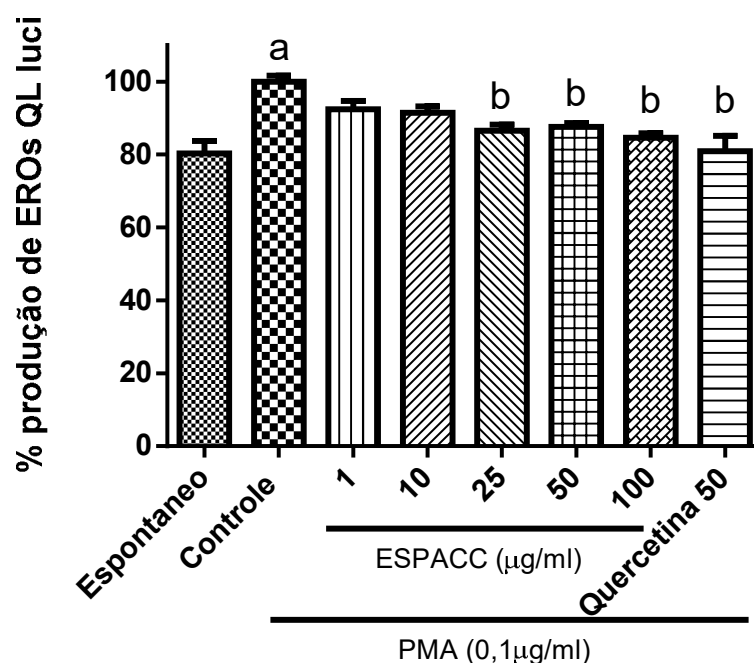
Neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados com ESPACC (1, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) na presença da sonda quimioluminescente luminol e posteriormente incubados com PMA (0,1 μM). Espontâneo: células não estimuladas. Controle: veículo (DMSO). Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. (a: $p < 0,05$ vs. espontâneo; b: $p < 0,05$ vs. controle, ANOVA- Tukey)

Figura 12: Perfil de quimioluminescência do ESPACC dependente de lucigenina (QL luci) produzida por neutrófilos registrado por minuto (cpm) em função do tempo (minutos)



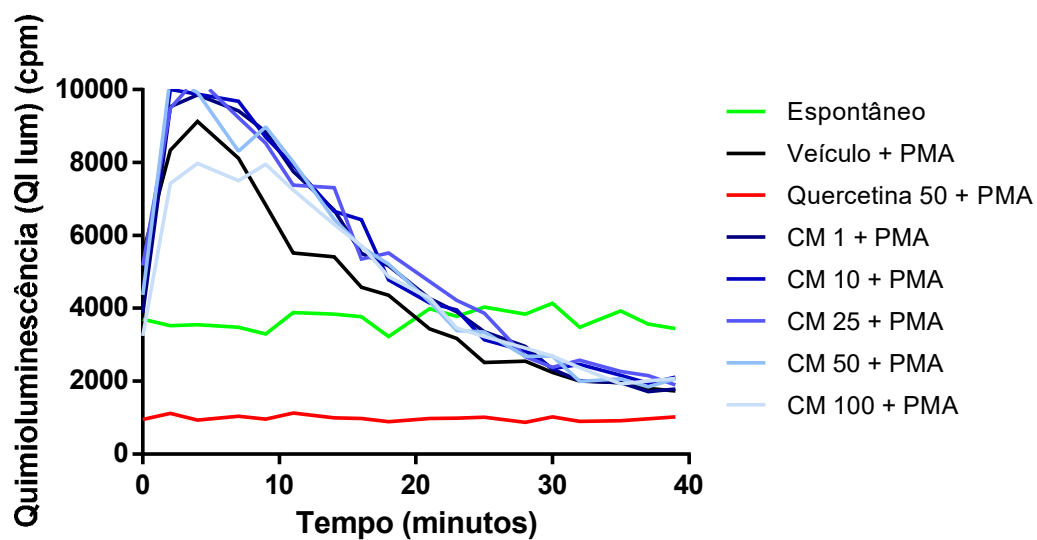
Neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados com ESPACC (1, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) na presença da sonda quimioluminescente luminol e posteriormente incubados com PMA (0,1 μM). Espontâneo: células não estimuladas. Controle: veículo (DMSO)

Figura 13: Efeito do ESPACC sobre a produção de quimioluminescência dependente de lucigenina (QL luci) por neutrófilos ativados com PMA



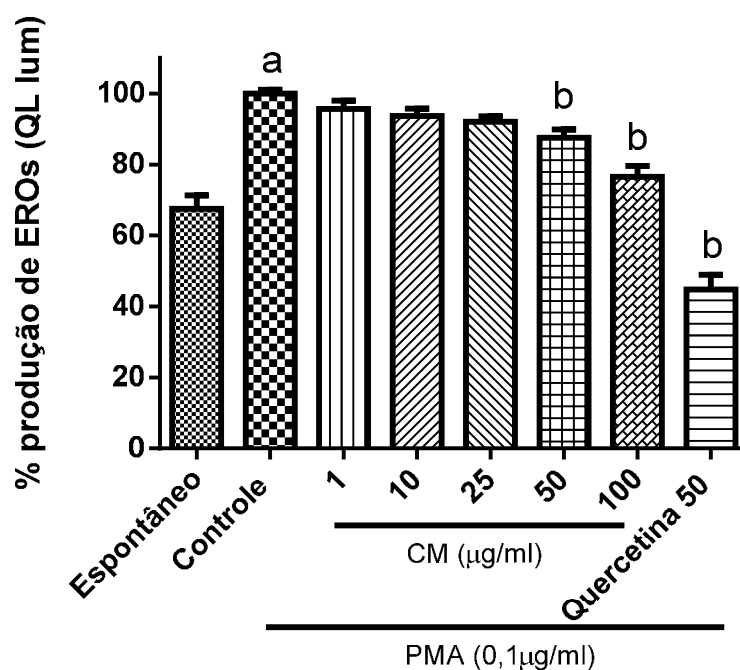
Neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados com ESPACC (1, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) na presença da sonda quimioluminescente lucigeninal e posteriormente incubados com PMA (0,1 μM). Espontâneo: células não estimuladas. Controle: veículo (DMSO). Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. (a: $p < 0,05$ vs. espontâneo; b: $p < 0,05$ vs. controle, ANOVA- Tukey)

Figura 14: Perfil de quimioluminescência da CM dependente de luminol (QL lumi) produzida por neutrófilos registrado por minuto (cpm) em função do tempo (minutos)



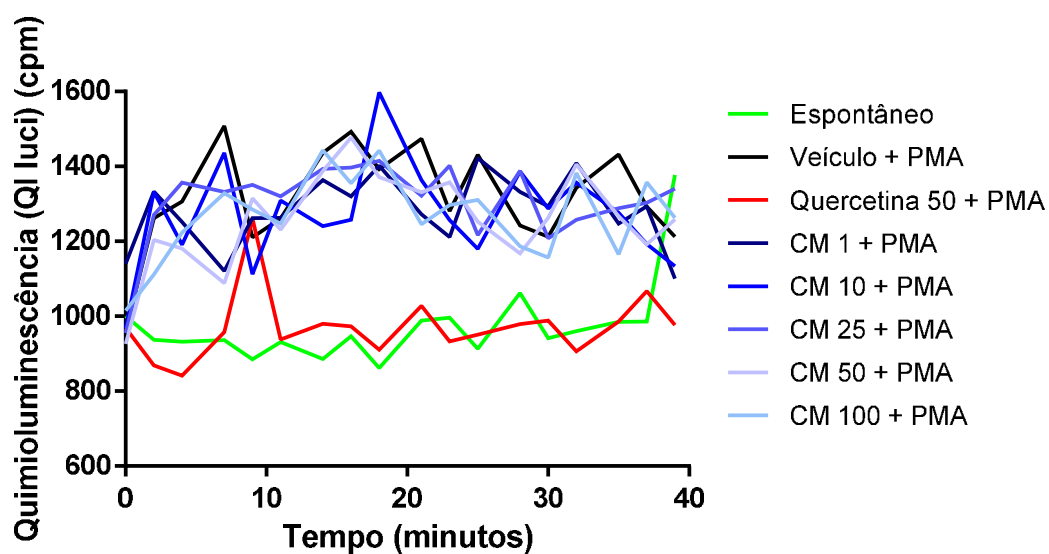
Neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados com CM (1, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) na presença da sonda quimioluminescente luminol e posteriormente incubados com PMA (0,1 μM). Espontâneo: células não estimuladas. Controle: veículo (DMSO).

Figura 15: Efeito da CM sobre a produção de quimioluminescência dependente de luminol (QL lumi) por neutrófilos ativados com PMA



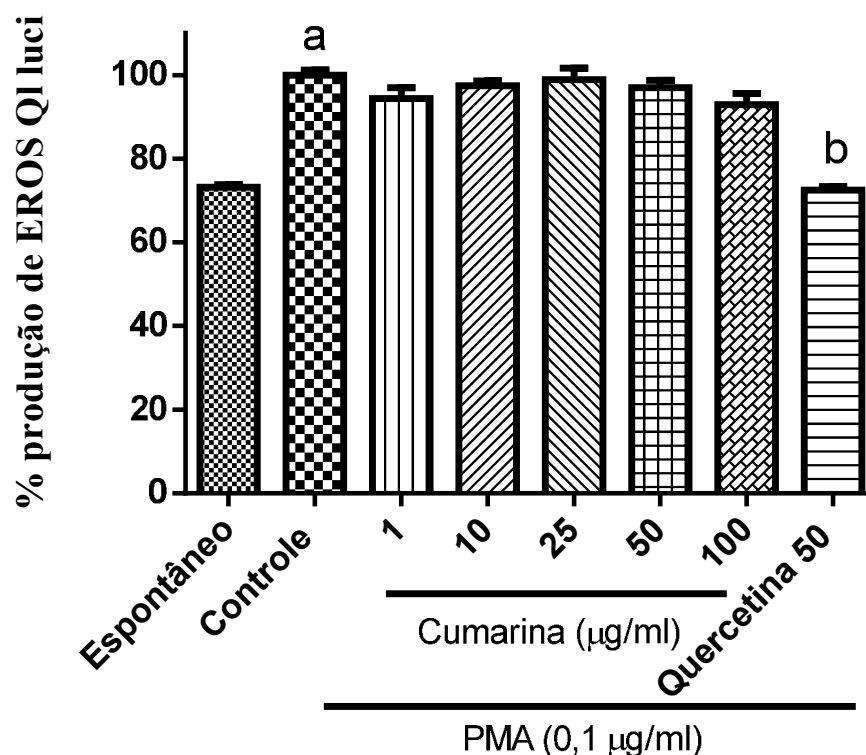
Neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados com CM (1, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) na presença da sonda quimioluminescente luminol e posteriormente incubados com PMA (0,1 μM). Espontâneo: células não estimuladas. Controle: veículo (DMSO). Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. (a: $p < 0,05$ vs. espontâneo; b: $p < 0,05$ vs. controle, ANOVA- Tukey)

Figura 16: Perfil de quimioluminescência da CM dependente de lucigenina (QL luci) produzida por neutrófilos registrado por minuto (cpm) em função do tempo (minutos)



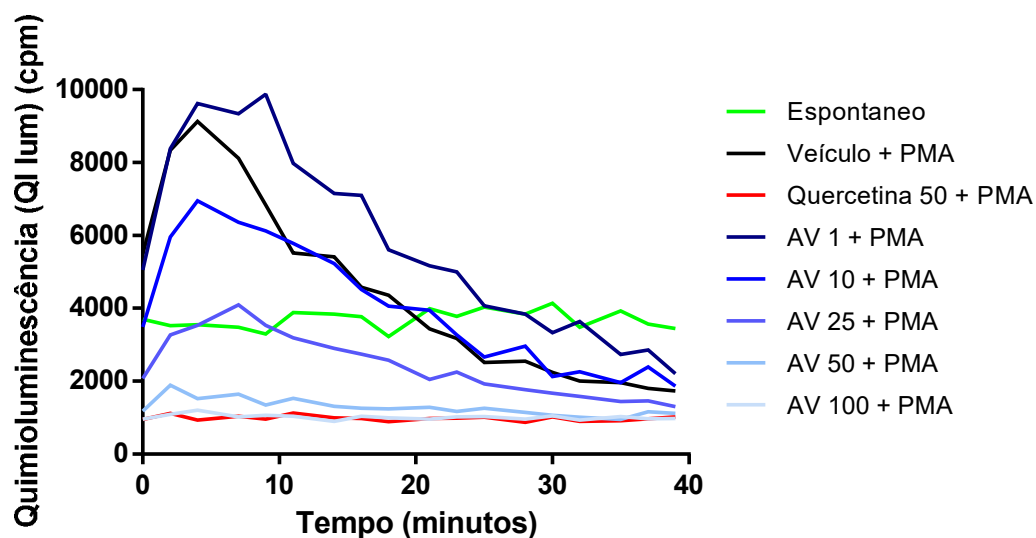
Neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados com CM (1, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) na presença da sonda quimioluminescente lucigenina e posteriormente incubados com PMA (0,1 μM). Espontâneo: células não estimuladas. Controle: veículo (DMSO)

Figura 17: Efeito da CM sobre a produção de quimioluminescência dependente de lucigenina (QL luci) por neutrófilos ativados com PMA



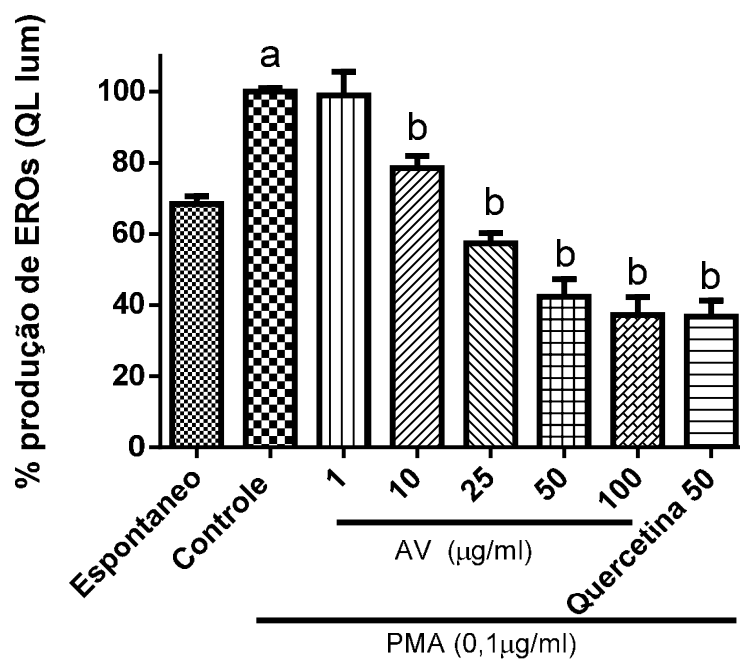
Neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados com CM (1, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) na presença da sonda quimioluminescente lucigeninal e posteriormente incubados com PMA ($0,1 \mu\text{M}$). Espontâneo: células não estimuladas. Controle: veículo (DMSO). Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. (a: $p < 0,05$ vs. espontâneo; b: $p < 0,05$ vs. controle, ANOVA- Tukey)

Figura 18: Perfil de quimioluminescência do AV dependente de luminol (QL lumi) produzida por neutrófilos registrado por minuto (cpm) em função do tempo (minutos)



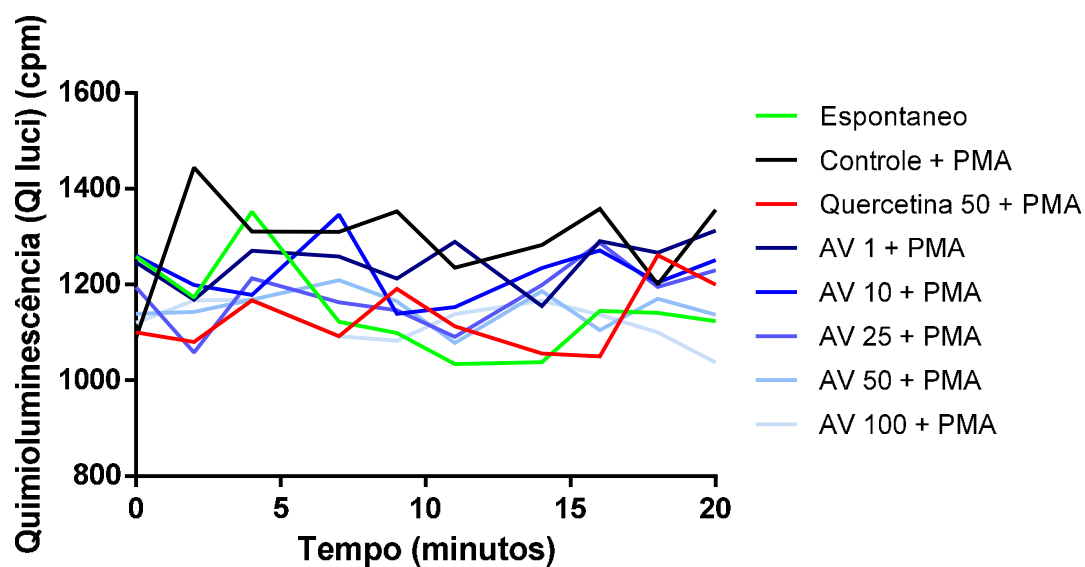
Neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados com AV (1, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) na presença da sonda quimioluminescente luminol e posteriormente incubados com PMA (0,1 μM). Espontâneo: células não estimuladas. Controle: veículo (DMSO)

Figura 19: Efeito do AV sobre a produção de quimioluminescência dependente de luminol por neutrófilos ativados com PMA



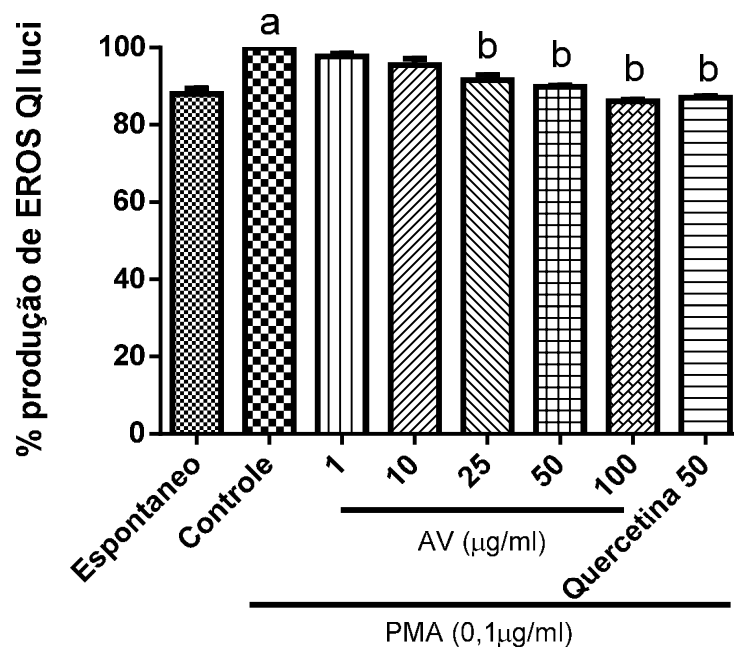
Neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados com AV (1, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) na presença da sonda quimioluminescente luminol e posteriormente incubados com PMA (0,1 μM). Espontâneo: células não estimuladas. Controle: veículo (DMSO). Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. (a: $p < 0,05$ vs. espontâneo; b: $p < 0,05$ vs. controle, ANOVA- Tukey)

Figura 20: Perfil de quimioluminescência do AV dependente de lucigenina (QL luci) produzida por neutrófilos registrado por minuto (cpm) em função do tempo (minutos)



Neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados com AV (1, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) na presença da sonda quimioluminescente lucigenina e posteriormente incubados com PMA (0,1 µM). Espontâneo: células não estimuladas. Controle: veículo (DMSO).

Figura 21: Efeito do AV sobre a produção de quimioluminescência dependente de lucigenina por neutrófilos ativados com PM

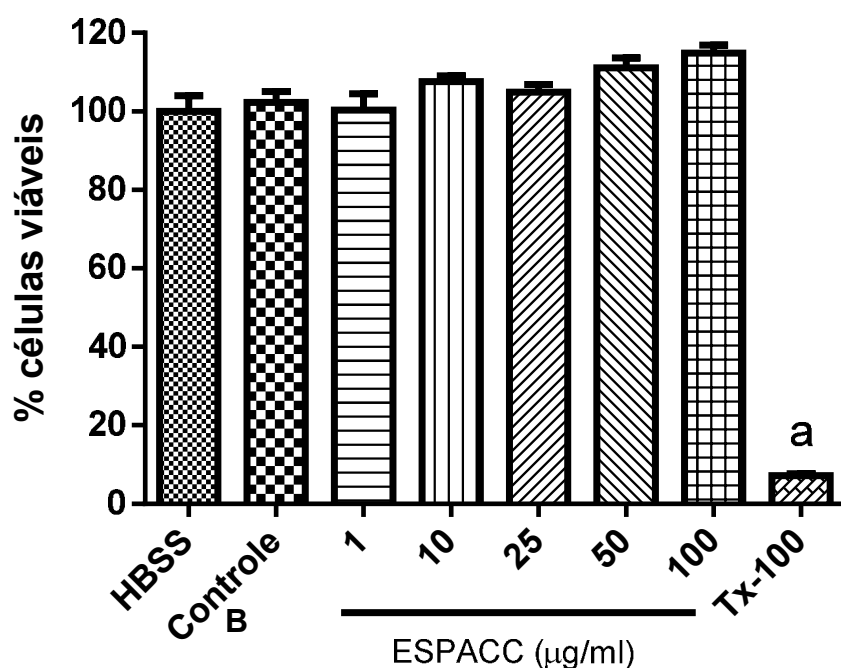


Neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados com AV (1, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) na presença da sonda quimioluminescente lucigenina e posteriormente incubados com PMA (0,1 μM). Espontâneo: células não estimuladas. Controle: veículo (DMSO). Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. (a: $p < 0,05$ vs. espontâneo; b: $p < 0,05$ vs. controle, ANOVA- Tukey

4.3. Efeito do ESPACC e AV sobre a viabilidade celular de neutrófilos mensurado através do teste do MTT

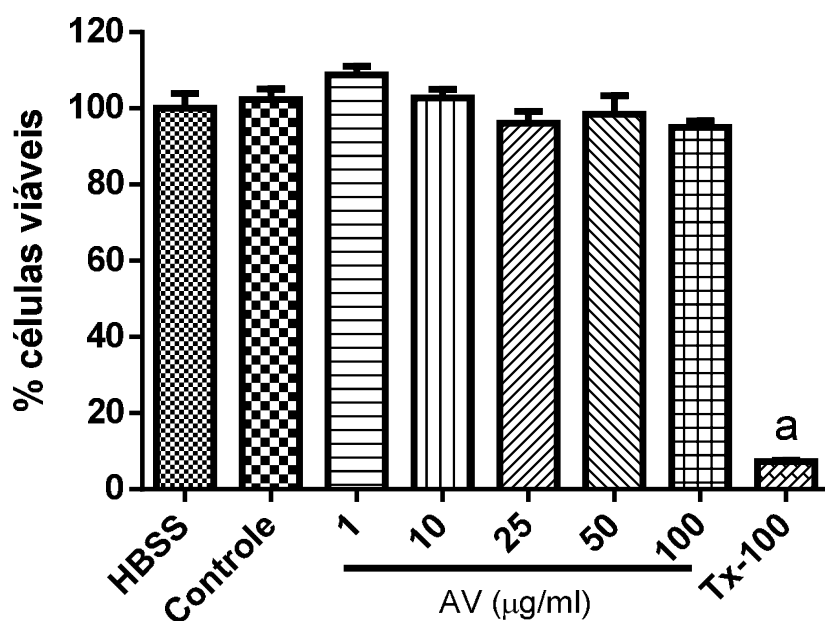
O efeito do ESPACC e AV sobre a viabilidade celular de neutrófilos humano está representado nas **figuras 22 e 23**, mostrando que neutrófilos incubados com ESPACC (1, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) não apresentaram nenhuma alteração da viabilidade celular, nem mesmo na maior concentração destes (% células viáveis: 114.9 ± 1.96) quando comparados ao controle (% células viáveis 102.4 ± 2.7). Entretanto o Triton X-100 (0,2% v/v padrão citotóxico) apresentou uma expressiva redução no percentual de células viáveis (7.21 ± 0.4). Resposta similar ao ESPACC foi obtida no tratamento com AV (100 $\mu\text{g/mL}$: 95.6 ± 1.7), quando comparado ao grupo controle (102.4 ± 2.7).

Figura 22: Efeito do ESPACC sobre a viabilidade de neutrófilos humano determinada através do teste do MTT



Neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados com ESPACC (1, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) e 3h depois foi avaliada a viabilidade celular por espectrofotometria. HBSS: células não tratadas. Controle: veículo (DMSO). Tx-100: triton X-100 – padrão citotóxico. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. (a: $p < 0,05$ vs. controle, ANOVA- Tukey).

Figura 23: Efeito do AV sobre a viabilidade de neutrófilos humano determinada através do teste do MTT



Neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados com AV (1, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) e 3h depois foi avaliada a viabilidade celular por espectrofotometria. HBSS: células não tratadas. Controle: veículo (DMSO). Tx-100: triton X-100 – padrão citotóxico. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. (a: $p < 0,05$ vs. controle, ANOVA-Tukey).

05. DISCUSSÃO

No presente estudo, foram avaliados os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes do ESPACC, bem como de seus compostos químicos bioativos majoritários como a CM e AV, em cultura de neutrófilos.

É importante ressaltar que o uso de sistemas *in vitro* permite uma maior eficácia no controle das condições do ensaio, diminuindo a variabilidade entre as experiências, produzindo uma menor quantidade de resíduos tóxicos e proporcionando a obtenção mais rápida de resultados, além de contribuir para a elucidação do mecanismo de ação. Além disso, existe uma considerável redução nos custos, visto que o não uso de animais torna dispensável a existência de uma infraestrutura específica. Por outro lado, esses ensaios apresentam algumas limitações por não considerarem os efeitos integrados que ocorrem no organismo como um todo, bem como o efeito da biotransformação de compostos (VICTAL *et al.*, 2014).

A avaliação do potencial biológico de novos fármacos anti-inflamatórios com o emprego de modelos experimentais em neutrófilos humano pode contribuir consideravelmente no desenvolvimento de novos fármacos, considerando que essas células formam a primeira linha de defesa na imunidade inata apresentando um papel importante na resposta inflamatória aguda e crônica induzida por diferentes estímulos. Dessa forma, a modulação da liberação do conteúdo celular de neutrófilos é estratégico para o controle/tratamento da inflamação. Por estas razões, modelos experimentais que empregam células inflamatórias como os neutrófilos podem ser aplicados de modo a complementarem pesquisas farmacológicas, sempre que o fim o justifique (PRESGRAVE, 2010), visto que muitas doenças envolvem inflamação crônica e representam a maior carga de morbimortalidade no Brasil (DUNCAN *et al.*, 2012).

O ESPACC e o AV inibiram a produção de mieloperoxidase induzida por PMA em neutrófilos humano, ressaltando que o AV na maior concentração conseguiu um efeito inibitório na liberação de MPO comparável à indometacina, um anti-inflamatório não esteroideal inibidor inespecífico de cicloxigenase.

O PMA (forbol-miristato-acetato) é um representante dos análogos de ésteres de forbol, que ativa a transdução de sinais no neutrófilo sem a necessidade de um receptor de membrana (THELEN *et al.*, 1993), agindo diretamente sobre proteína quinase C (PKC). A PKC é responsável por desencadear a liberação de Ca^{2+} das reservas intracelulares aumentando sua concentração no interior da célula, gerando dessa forma a

degranulação dos neutrófilos (FAURSCHOU, 2003). Assim, sugere-se que tanto o ESPACC quanto o AV parecem modular uma ou mais etapas relacionadas à ativação dos neutrófilos por PMA, relacionado, por exemplo, a uma inibição de PKC e do influxo de Ca^{2+} intracelular. Esse resultado foi ratificado por um estudo anterior (LIMA, 2013), que mostrou a habilidade do extrato padronizado de *Amburana cearensis* cultivada (EPACC) na forma líquida em inibir a liberação de MPO. Dessa forma, a agregação de tecnologia ao extrato de cumaru cultivado (secagem por Spray dryer) não comprometeu seu efeito modulador da ativação de neutrófilos humano.

Estudos (LEAL *et al* 95; 97) realizados com o extrato hidroalcolólico (EHA) não padronizado, a cumarina e uma fração flavonoídica obtidos da casca do caule de *A. cearensis* silvestre, mostraram que esses compostos possuem atividade anti-inflamatória determinada através dos modelos de edema de pata induzido por carragenina ou dextrano em ratos e peritonite induzida por carragenina em ratos. As drogas testadas apresentaram atividade antiedematogênica e reduziram o acúmulo de células inflamatórias no peritônio dos animais.

Outro estudo realizado por Marinho e colaboradores (2004) também demonstrou o efeito anti-inflamatório dessa espécie, onde a administração do EHA de *A. cearensis* silvestre (400 mg/kg, v.o. e 200 mg/kg, i.p.) e cumarina (10 ou 20 mg/kg) em camundongos Balb/c, promoveu efeito antiedematogênico no modelo de edema de pata induzido por ovalbumina.

Estudo (KIM *et al.* 2011) realizado com o AV mostrou que este foi capaz de inibir a produção de mediadores inflamatórios como IL-6, TNF- α e PGE2, além da expressão de COX-2, por suprimir a ativação de NF- κ B induzida por LPS em macrófagos peritoneais de ratos. Ainda, o tratamento de camundongos com o AV apresentou atividade antinociceptiva por inibir a segunda fase do teste da formalina, além de inibir a hiperalgesia mecânica induzida por CFA (adjuvante completo de Freund), o edema de pata induzido por carragenina e a atividade da MPO. Foi demonstrado que essas atividades estavam envolvidas com efeitos antioxidantes e a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias relacionadas ao NF- κ B (CALIXTO- CAMPOS *et al.*, 2015).

Como já mencionado vários mecanismos estão envolvidos na degranulação de neutrófilos, entre eles a produção de EROs que possui um papel importante na ativação celular. A técnica de quimioluminescência é amplamente utilizada por ser uma metodologia sensível e exata para a avaliação da capacidade de produção de EROs em neutrófilos. Para amplificar a quimioluminescência produzida por fagócitos durante o

burst oxidativo tem sido utilizadas sondas quimioluminescentes, como o luminol e a lucigenina (WARDMAN, 2007). O luminol reage com as EROs geradas pelos neutrófilos produzindo o ânion aminoftalato excitado que emite fótons de luz ao retornar ao estado fundamental (ALLEN & LOOSE, 1976). O luminol é capaz de detectar diversas espécies reativas, inclusive o O_2^- , no entanto possui uma maior sensibilidade para $HOCl^-$, por isso trata-se de uma quimioluminescência com ótima sensibilidade para o sistema $MPO-H_2O_2-HOCl^-$ (MAHOMOODALLY *et al.*, 2012). Um estudo (LI *et al.*, 1999) mostrou a lucigenina como um detector específico do radical O_2^- . Antes de reagir com esse radical, a lucigenina deve ser reduzida por um elétron para produzir o radical cátion lucigenina. Esse radical reage com O_2^- para produzir um intermediário instável, lucigenina dioxetano, se decompondo em duas moléculas de N-metilacridona, onde uma das quais está em um estado eletronicamente excitado, que retorna ao estágio basal emitindo fóton.

No presente estudo foi observado com o auxílio da QL que a adição de ESPACC na maior concentração conseguiu reduzir a produção de EROs marcadas por ambas as sondas utilizadas (luminol e lucigenina). O AV também se comportou de forma semelhante ao extrato, porém chegou a se comparar com a quercetina. Já a CM não reduziu a produção de EROs marcadas por lucigenina. Sendo assim, nos ensaios de quimioluminescência dependente de luminol, tanto ESPACC quanto AV exibiram atividade modulatória do metabolismo oxidativo dos neutrófilos bastante expressiva, já a CM, por reduzir em menor grau a produção de EROs, apresentou um menor efeito antioxidante dentre as drogas testes investigadas. No entanto, na quimioluminescência dependente de lucigenina as atividades modulatórias foram menores, sugerindo que os efeitos antioxidantes do ESPACC sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos parecem estar mais relacionados ao sistema $MPO-H_2O_2-HOCl$.

Diante desses resultados, é possível afirmar que a modulação dos mecanismos pró-inflamatórios dos neutrófilos humano pelo ESPACC e seus metabólitos secundários constitui uma propriedade importante para um anti-inflamatório, que poderá controlar a inflamação ainda na sua fase aguda, possivelmente por reduzir a migração e a ativação de polimorfonucleares, como os neutrófilos para o foco inflamatório. Nesse contexto, é importante destacar que a ativação inapropriada ou exacerbada de neutrófilos no organismo humano está relacionada a fisiopatologia de várias doenças inflamatórias como a asma exacerbada. Isso é interessante considerando que o principal uso na medicina tradicional de *Amurana cearensis* é no tratamento da asma.

Para verificar se os efeitos anti-inflamatórios do ESPACC e AV obtidos anteriormente não estão relacionados a uma possível toxicidade, foi então investigado o efeito destes sobre a viabilidade de neutrófilos através do teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5- difeniltetrazólio). Trata-se de um método rápido, sensível e barato que foi descrito primeiramente por Mosmann (1983), se baseia no fato de o sal (MTT) de cor amarela ser reduzido, principalmente por enzimas mitocondriais (sistema succinato-tetrazol redutase) a um sal de formazan de cor roxa. Portanto, a atividade deste sistema enzimático reflete a funcionalidade metabólica das mitocôndrias, sendo a ausência da redução do MTT indicativo de diminuição de atividade metabólica e viabilidade celular. Para mensuração desse efeito o sal de formazan é quantificado espectrofotometricamente, sendo a intensidade desta cor proporcional a atividade metabólica da célula (VERMA *et al.*, 2010). Esses sais foram primeiramente utilizados como substratos para sistemas de transferência de elétrons em bactérias e células mamárias. O método também é amplamente utilizado na avaliação *in vitro* da viabilidade ou atividade metabólica de cultura de células, seja de mamíferos ou de protozoários, como promastigotas e amastigotas do gênero *Leishmania* (SERENO & LEMESRE, 1997).

A redução do MTT, diferente de outros sais de formazan como o XTT e o WST-1, não é afetado pela enzima superóxido dismutase (SOD) ou pela adição de coenzimas como a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (BERRIDGE *et al.*, 1996).

A adição de concentrações crescentes de ESPACC e AV à suspensão de neutrófilos não alterou significativamente a viabilidade celular avaliada através do teste do MTT. Dessa forma, nenhum dos efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes determinados para o ESPACC e AV estiveram relacionados a uma possível toxicidade celular.

Estudo anterior realizado em nosso laboratório (LIMA, 2013), mostrou que o extrato líquido não foi citotóxico em neutrófilos humano determinado pela atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), sugerindo, portanto que *Amburana cearensis* cultivada parece não provocar alterações na integridade da membrana plasmática de neutrófilos.

06. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo com o ESPACC (extrato seco padronizado de *Amburana cearensis* cultivada), AV (ácido vanílico) e a CM (cumarina) permitiram as seguintes conclusões:

- O ESPACC e AV mostraram atividade anti-inflamatória por modularem um dos mecanismos pró-inflamatório em neutrófilos humano, em particular a degranulação induzida por PMA, mensurada pela atividade da mieloperoxidase;
- O ESPACC, AV e CM mostraram efeito antioxidante ao inibirem a produção de EROs envolvendo tanto o ânion superóxido quanto o produto do sistema MPO-H₂O₂-HOCl;
- Os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes do ESPACC e AV deram-se sem comprometer a viabilidade de neutrófilos, em particular sobre o metabolismo celular.

Dessa forma, os resultados mostraram que o efeito anti-inflamatório está relacionado pelo menos em parte à presença de CM e AV, sugerindo que estes possuem potencial no tratamento de doenças inflamatórias.

A comprovação do potencial anti-inflamatório e antioxidante do ESPACC e seus metabólitos secundários, ressaltando a ausência de citotoxicidade, é relevante considerando que se pode agregar estas propriedades com as vantagens tecnológicas desse novo extrato a ser empregado na formulação de um fitoterápico útil no tratamento de doenças inflamatórias. Além disso, os resultados obtidos ratificam a importância de prosseguir os estudos farmacológicos dessa espécie e princípios ativos, incluindo estudos para melhor compreensão do mecanismo de ação e toxicidade, além de avaliações *in vivo*. Assim, somando os resultados obtidos no presente estudo a outros a serem realizados futuramente será possível justificar o uso de *Amburana cearensis* cultivada e seus constituintes químicos como uma ferramenta farmacológica no tratamento de doenças inflamatórias como a asma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIFISA - **Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico**. Conheça o Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira publicado pela Anvisa. Disponível em: <<http://www.abifisa.org.br/noticia/23-07-2016-conheca-o-memento-fitoterapico-da-farmacopeia-brasileira-publicado-pela-anvisa>>. Acesso em: 18 de setembro de 2017.

AHMED, A. U. An overview of inflammation: Mechanism and consequences. **Frontiers of Biology**, v. 6, n. 4, p. 274–281, 2011

ALLEN, R. C.; LOOSE, L. D. Phagocytic activation of a luminol-dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 69, n. 1, p. 245–252, 1976.

ALMEIDA, J. R. G. S. *et al.* *Amburana cearensis* – uma revisão química e farmacológica. **Scientia Plena**, v. 6, p. 1-8, 2010.

AMERICAS REGIONAL WORKSHOP (Conservation & Sustainable Management of Trees, Costa Rica, November 1996) 1998. *Amburana cearensis*. In: **IUCN 2012**. IUCN Red list of threatened species. Version 2012.2.

AMULIC, B.; CAZALET, C.; HAYES, G. L.; METZLER, K. D.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annu Rev Immunol**, v. 30, p. 459–489, 2012.

ARARUNA, S. M. **Desenvolvimento e padronização do extrato seco por spray-dryer de *Amburana cearensis* A. C. Smith (cumaru)**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

ARARUNA, S. M. *et al.* Influence of process conditions on the physicochemical characteristics of cumaru (*Amburana cearensis*) powder produced by spray drying. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, p. 134-135, 2013.

AQUINO, F. W. B.; RODRIGUES, S.; NASCIMENTO, R. F.; CASIMIRO, A. R. S. Phenolic compounds in imburana (*Amburana cearensis*) powder extracts. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 221, p. 739-745, 2005.

AURIEL, E.; REGEV, K.; KORCZYN, A. D. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs exposure and the central nervous system. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 119, p. 577–584, 2014.

BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cerebrovasculares e renais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. vol.94 no.4 São Paulo Apr. 2010

BERRIDGE, M.V., TAN, A.S., McCOY, K.D., WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.

BEVILACQUA, H. G. C. R. Planejamento de horta medicinal e comunitária. Divisão Tec. Esc. Municipal de Jardinagem / Curso de Plantas medicinais – São Paulo, 2010.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current Opinion in Immunology*, v. 12, n. 1, p. 64-76, mar. 2000.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p.657–670, 2010.

BOTZ, B.; BÖLCSKEI, K.; HELYES, Z. Challenges to develop novel anti-inflammatory and analgesic drugs. **Wiley Interdisciplinary Reviews : Nanomedicine and Nanobiotechnology**, 2016.

BRANZK, N., A. LUBOJEMSKA, *et al.* Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. **Nat Immunol** 15(11): 1017-1025. 2014

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada N°24 de 14 de junho de 2011. Dispõe sobre o registro de medicamentos específicos. (ANVISA) e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada N°26 de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. (ANVISA) e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2014.

BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 2004.

CALIXTO-CAMPOS, C. *et al.* Vanillic acid inhibits inflammatory pain by inhibiting neutrophil recruitment, oxidative stress, cytokine production, and NFκB activation in mice. **Journal of natural products**, v. 78, n. 8, p. 1799-1808, 2015.

CANTER, P. H.; THOMAS, H.; ERNST, E. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 23, p. 180-185, 2005.

CANUTO, K. M. Aspectos químicos do estudo interdisciplinar (Química-Agronomia-Farmacologia) de *Amburana cearensis* A.C. Smith. 2007. **Tese (Doutorado em Química Orgânica)** – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007

CANUTO, K. M., SILVEIRA, E. R., BEZERRA, A. M. E. Estudo fitoquímico de espécimens cultivados de cumaru (*Amburana cearensis* A. C. Smith). **Quím. Nova**, v. 33, p. 662-666, 2010

CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R.; BEZERRA, A. M. E.; LEAL, L. K. A. M.; VIANA, G. S. de B. **Uso de Plantas Jovens de *Amburana cearensis* A. C. Smith: Alternativa para Preservação e Exploração Econômica da Espécie.** Petrolina – PE: Embrapa Semi-árido, 2008. Documentos online.

CARMAN, C. V *et al.* Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity*, v. 26, n. 6, p. 784-797, jun. 2007.

CARVALHO, E. M. Efficacy and safety of cumaru syrup as complementary therapy in mild persistent asthma: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**. vol.48 no.4 São Paulo Oct./Dec. 2012

CHANDRASEKHARAN, J. A.; SHARMA-WALIA, N. Lipoxins: nature's way to resolve inflammation. **J Inflamm Res**. 2015; 8: 181–192.

CORTJENS, B. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps in Respiratory Disease: guided anti-microbial traps or toxic webs?, **Pediatric Respiratory Reviews**. January 2017 Volume 21, Pages 54–61

CUNHA, M. C. L.; FERREIRA, R. A. Aspectos morfológicos da semente e do desenvolvimento da planta jovem de *Amburana cearensis* (Arr. Cam.) A.C. Smith - Cumaru - Leguminosae Papilionoideae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, p. 89-96, 2003.

DAY, R. O.; GRAHAM, G. G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). **British Journal of Sports Medicine**, v. 48, n. 18, p. 1396–1396, 2013.

DIACOVO, T. G., PURI, K. D., WARNOCK, R. A., SPRINGER, T. A., and VON ANDRIAN, U. H. (1996). Platelet-mediated lymphocyte delivery to high endothelial venules. **Science** 273, 252–255.

DE YOUNG, L.M.; KHEIFETS, J.B.; BALLARON, S.J.; YOUNG, J.M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separated and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions**, v.26, p.335-41, 1989.

DUNCAN, B. B.; CHOR, D.; AQUINO, E. M. L.; *et al.* Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: prioridade para enfrentamento e investigação. **Revista de Saúde Pública**, v. 46, p. 126–134, 2012. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

EL KEBIR, D.; JÓZSEF, L.; PAN, W.; FILEP, J. G. Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation. **Circulation Research**, v. 103, n. 4, p. 352–359, 2008.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 14, p. 1317–1327, 2003.

GINA. Global Initiative for Asthma. **The Global Strategy for Asthma Management and Prevention** <http://ginasthma.org/2017-pocket-guide-for-asthma-management-and-prevention/> Acesso: 18, out de 2017.

GOZALEZ-CHAVEZ, A., Elizondo-Argueta, S., Guitiérrez-Reyes, G., & León-Pedroza, J. I. Pathophysiological implications between chronic inflammation and the development of diabetes and obesity. **Cirugía y Cirujanos**, 79(2), 190-197. 2010

GRATTENDICK, K.; STUART, R.; ROBERTS, E.; *et al.* Alveolar Macrophage Activation by Myeloperoxidase A Model for Exacerbation of Lung Inflammation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 26, n. 6, p. 716 722, 2002.

GUEDES, R. S. *et al.* Qualidade fisiológica de sementes armazenadas de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, p. 331-342, 2010a.

GUEDES, R. S. *et al.* Substratos e temperaturas para testes de germinação e vigor de sementes de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith, **R. Árvore**, v. 34, p. 57-64, 2010b.

HEADLAND, S. E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 3, p. 149–160, 2015.

HENSON, P. M. The immunology release of constituents from neutrophils leukocytes. **The Journal of Immunology**. v. 107, p. 1535, 1971.

KENNEDY, A., and DELEO, F. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol. Res.* 43, 25–61. 2009.

KIM, M. C. *et al.* Vanillic acid inhibits inflammatory mediators by suppressing NF- κ B in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 33, n. 3, p. 525-532, 2011.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase : friend and foe. **Journal of leukocyte biology**, v. 77, p. 598–625, 2005.

KOBAYASHI, S. D.; DELEO, F. R. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. **Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine**, v. 1, n. 3, p. 309–33, 2009.

KOEBERLE, A.; WERZ, OLIVER. Multi-target approach for natural products in inflammation. *Drug Discovery Today* _ Volume 19, Number 12 _ December 2014

KOLACZKOWSKA, E., KUBES P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, p. 159-175, Mar 2013.

KUMAR, VINAY, ABUL K. ABBAS, NELSON FAUSTO, JON C. ASTER. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Philadelphia: Elsevier Saunders. 2015.

LAU, D.; MOLLNAU, H.; EISERICH, J. P.; *et al.* Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 2, p. 431–6, 2005.

LEAL, L. K. A. M. **Estudos farmacológicos do extrato hidroalcoólico e constituintes químicos de *Torresea cearensis* Fr. Allem.** 1995. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1995.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Antinociceptive and antiedematogenic effects of the hydroalcoholic extract and coumarin from *Torresea cearensis* Fr. All. **Phytomedicine**, v.4, p.221-227, 1997.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, p. 151-159, 2000.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical constituents from *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Phytotherapy Research**, v.17, p.335-340, 2003a.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Toxicological study of the hydroalcoholic extract from *Amburana cearensis* in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, p. 308-314, 2003b.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Análise de timol por CLAE na tintura de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta) produzida em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 13, p. 9-11, 2003c.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Atividade antinociceptiva e antiedematogênica de *Amburana cearensis* (cumaru), silvestre e cultivada, em camundongos – um estudo comparativo. *In: XVIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*, Manaus, 2004.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Amburoside A, a glucoside from *Amburana cearensis*, protects mesencephalic cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. **Neurosciencs Letters**, v. 388, p. 86-90, 2005.

LEAL, L. K. A. M. **Contribuição para a validação do uso medicinal de *Amburana cearensis* (cumaru): estudos farmacológicos com o isocampferídio e o amburosídeo.** 2006. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006a.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Mechanisms underlying the relaxation induced by isokaempferide from *Amburana cearensis* in the guinea-pig isolated trachea. **Life Sciences**, v. 79, p. 98-104, 2006b.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Effects of amburoside A and isokaempferide, polyphenols from *Amburana cearensis*, on rodent inflammatory processes and myeloperoxidase activity in human neutrophils. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 104, p. 198-205, 2008a.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Protective effects of amburoside A, a phenol glucoside from *Amburana cearensis*, against CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. **Planta Med.**, v. 74, p. 497-502, 2008b.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* A comparative chemical and pharmacological study of standardized extracts and vanillic acid from wild and cultivated *Amburana cearensis* A.C. Smith. **Phytomedicine**, v. 18, p. 230-233, 2011.

LEY, Klaus *et al.* Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 9, p. 678-689, 2007.

LI, Y.; ZHU, H.; TRUSH, M. A. Detection of mitochondria-derived reactive oxygen species production by the chemilumigenic probes lucigenin and luminol. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1428, p. 01-12, 1999.

LIANG, R., L. WANG, *et al.* (2013). New insight into genes in association with asthma: literature-based mining and network centrality analysis. **Chin Med J (Engl)** 126(13): 2472-2479.

LIMA, N. R. Desenvolvimento farmacêutico e avaliação farmacológica do extrato padronizado (CLAE-DAD) e constituintes químicos de *Amburana cearensis* (cumaru) cultivada. **Dissertação de mestrado em ciências farmacêuticas, Universidade Federal do Ceará (2013)**

LOPES, A. A. Avaliação da atividade anti-inflamatória e antioxidante das cápsulas do extrato seco padronizado e da afrormosina, isoflavonóide, obtidos de *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia)** – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

LUCISANO, Y. M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorfonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and IgG. **The Journal of Immunology**. v.132, p. 2015-2020, 1984.

MAHOMOODALLY, F.; MESAİK, A.; CHOUDHARY, I. M.; SUBRATTY, A. H.; GURIB-FAKIM, A. In vitro modulation of oxidative burst via release of reactive oxygen species from immune cells by extracts of selected tropical medicinal herbs and food plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 440–447, 2012.

MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D & Z Editora, 2004. 413 p. 159-169.

MALLE, E.; FURTMÜLLER, P. G.; SATTLER, W.; OBINGER, C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? **British journal of pharmacology**, v. 152, n. 6, p. 838–54, 2007.

MANTOVANI, A.; CASSATELLA, M. A.; COSTANTINI, C.; JAILLON, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 8, p. 519–531, 2011.

MARINHO, M. D. G. V., BRITO, A. G., CARVALHO, K. A., BEZERRA, C. R., ANDRADE, L. D. H. C., BARBOSA, J. M., & PIUVEZAM, M. R. (2004). Amburana cearensis e Cumarina Imunomodulam os Níveis de anticorpos antígeno-específico em Camundongos BALB/c sensibilizados com Ovalbumina. **Latin American Journal of Pharmacy**, 23, 47-52.

MCDONALD, B.; PITTMAN, K.; MENEZES, G. B.; *et al.* Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. **Science (New York, NY.)**, v. 330, n. 6002, p. 362–366, 2010.

MELO, T.S., LIMA, P.R.S., COSTA, R.A., NASCIMENTO, A.A. Padronização de excipientes para manipulação de cápsulas gelatinosas duras contendo extrato seco de valeriana (*Valeriana officinalis*), produzidas no Projeto Farmácia Viva em Sobral, CE, Brasil. **Infarma – Ciências Farmacêuticas**. V-28. 2016. pp105-112

MÓCSAI, A.; WALZOG, B.; LOWELL, C. A. Intracellular signalling during neutrophil recruitment. **Cardiovascular Research**, v. 107, n. 3, p. 373–385, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, p. 55-63, 1983.

MOTA L. M, CRUZA B. A, BRENOL C.V, PEREIRA I. A, REZENDE-FRONZA L. S, BERTOLO M. B *et al.* Diretrizes para diagnóstico da artrite reumatoide. **Rev. bras. reumatol.** [periódico online]. 2013; 53(2):141-157.

MUNDER, M. *et al.* Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. **Blood**, p. 1.627-1.634, 2014.

MURCIA, R. Y., A. VARGAS, *et al.* (2016). The Interleukin-17 Induced Activation and Increased Survival of Equine Neutrophils Is Insensitive to Glucocorticoids. **PLoS One** **11**(5): e0154755.

ODOBASIC, D.; KITCHING, A R.; YANG, Y.; et al. Regular Article Neutrophil myeloperoxidase regulates T-cell 2 driven tissue inflammation in mice by inhibiting dendritic cell function. **Blood**, v. 121, n. 20, p. 1–3, 2014.

OLCZYK PAWEL, MENCNER ŁUKASZ, AND KOMOSINSKA-VASSEV KATARZYNA, The Role of the Extracellular Matrix Components in Cutaneous Wound Healing, *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 747584, 8 pages, 2014.

PAULA, F. S.; KABEYA, L. M.; KANASHIRO, A.; et al. Modulation of human neutrophil oxidative metabolism and degranulation by extract of *Tamarindus indica* L. fruit pulp. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 1, p. 163–170, 2009.

PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. **Nature Medicine**, v. 17, n. 11, p. 1381–1390, 2011.

PILLAY, J. *et al.* Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 70, n. 20, p. 3.813-3.827, out. 2013.

PIMENTEL, J. V. F.; GUERRA, H. O. C. Irrigação, matéria orgânica e cobertura morta na produção de mudas de cumaru (*Amburana cearensis*). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, p. 896-902, 2011.

PINHEIRO, Pedro. Prednisona e outros corticoides: efeitos colaterais e indicações. **Revista online MD.Saúde**, 2015.

PIZARRO, Francisco. Viñeta Histórica: Historia de Los Corticoides. Departamento de Anestesiología. Clínica Las Condes. **Revista Medicina Clínica. Condes**, 2014. Edição 25. pp. 858-860.

PORTAL DA SAÚDE – SUS. **Plantas de interesse ao SUS**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/465-sctie-raiz/daf-raiz/ceaf-sctie/fitoterapicos-cgafb/11-fitoterapicos/12552-plantas-de-interesse-ao-sus>>. Acesso em: 18 de setembro de 2017.

PRESGRAVE, F. A. O. *et al.* Métodos Alternativos ao Uso de Animais: Uma Visão Atual. *Ciênc. vet. tróp.*, v. 13, suplemento 1, p. 106 – 117. Ago 2010.

QUAX, R. A.; MANENSCHIJN, L.; KOPER, J. W.; *et al.* Glucocorticoid sensitivity in health and disease. **Nat Rev Endocrinol**, v. 9, n. 11, p. 670–686, 2013.

RAMOS, K. M. O. *et al.* Desenvolvimento inicial e repartição de biomassa de *Amburana cearensis* (Allemão) A. C. Smith, em diferentes condições de sombreamento. **Acta bot. bras.**, v. 18, p. 351-358, 2004.

RAY, R. S.; KATYAL, A. Myeloperoxidase: bridging the gap in neurodegeneration. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 68, p. 611-620, 2016.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M.M. BHARAT B. Aggarwal Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 1603 - 1616, 2010.

RIBEIRO, D.; FREITAS, M.; LIMA, J.L.F.C.; FERNANDES, E. Proinflammatory Pathways: The Modulation by Flavonoids. **Rev. Medicinal Research Reviews**, v.35, n. p.877-936, 2015.

RIBIZZI, G. et al. Cytokine polymorphisms and Alzheimer disease: possible associations. **Neurological Sciences**, v. 31, n. 3, p. 321-325, 2010.

ROCHA, T. M. Efeito anti-inflamatório e antinociceptivo de alcaloides imidazólicos de *Pilocarpus microphyllus*: estudo in vitro, in vivo e in silico. 2017. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Ceará.

RODRIGUEZ, J. M.; MONSALVES-ALVAREZ, M.; HENRIQUEZ, S.; LLANOS, M.N.; TRONCOSO, R. Glucocorticoid Resistance in Chronic Diseases. **Steroids**, v. 115, p.182–192, 2016.

ROSA, R.G; Desfechos clínicos em neutropenia febril. **Tese de doutorado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2015

SADIK, C. D.; KIM, N. D.; LUSTER, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 10, p. 452–460, 2011.

SALMON, M. D.; AHLUWALIA, J. Pharmacology of receptor operated calcium entry in human neutrophils. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 2, p. 145–148, 2010.

SALVEMINI, D.; ISCHIROPOULOS, H.; CUZZOCREA, S. Roles of nitric oxide and superoxide in inflammation. **Inflammation Protocols**. v. 225, p. 291-304, 2003.

SCHIEVEN, G. L.; de FEX, H.; STEPHENSON, L. Hypochlorous acid activates tyrosine phosphorylation signal pathways leading to calcium signaling and TNF alpha production. **Antioxid Redox Signal**. v. 4, p. 501-07, 2002.

SCHIPPMANN, U.; LEAMAN, D. J.; CUNNNINGHAM, A. B. Impact of cultivation and gathering of medicinal plants on biodiversity: global trends and issues. **FAO**, p. 1–21, 2002.

SCHYMEINSKY, J.; MÓCSAI, A.; WALZOG, B. Molecular mechanisms and clinical

implications. **Thromb Haemost**, v. 98, p. 262–273, 2007.

SERENO, D., LESMERO, J.L. Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stages of *Leishmania amazonensis* *in vitro*. **Parasitology Research**, v. 83, p. 401-403

SILVA, Í. C.. Neutrófilos: aspectos clássicos, plasticidade e novas funções imunorregulatórias. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais-Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies**, v. 7, n. 1, 2016.

SOARES, A. K. A. *et al.* Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico composto de *Torresea cearensis* em voluntários saudáveis. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 9, p. 55-60, 2007.

SOSTRES, C.; GARGALLO, C. J.; ARROYO, M. T.; LANAS, A. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best practice & research. Clinical gastroenterology**, v. 24, n. 2, p. 121–132, 2010.

STANKOV, S. V. Definition of Inflammation, Causes of Inflammation and Possible Anti-inflammatory Strategies. **The Open Inflammation Journal**, 5, 1-9. 2012

STROKA KM, Hayenga HN, Aranda-Espinoza H. Human neutrophil cytoskeletal dynamics and contractility actively contribute to trans-endothelial migration. **PLoS ONE**. 2013; 8:e61377. [PubMed: 23626676]

THELEN, M.; DEWALD, B.; BAGGIOLINI, M. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. **Physiological Reviews**, v. 797-821, 1993.

TOSCANO RICO, J. M. Plantas Medicinais. Academia das Ciências de Lisboa, Instituto de Estudos Acadêmicos para Seniores, Lisboa, 2011.

ÚBEDA, A.; FERRÁNDIZ, M. L.; HERENCIA, F. Activación celular: desgranulación leucocitária. In: ALCARAZ, M. J.; CALIXTO, J. B.; DELGADO, R. **Técnicas *in vitro* para el estudio de fármacos antiinflamatório**. CYTED – Subprograma X Proyecto X.6. Espanha, 2002.

VAN DER GOES, M.; STREHL, C.; BUTTGEREIT, F.; BIJLSMA, J.; JACOBS, J. Can adverse effects of glucocorticoid therapy be prevented and treated? **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 6566, n. September, 2016.

VERMA, N.; TRIPATHI, S.K.; SAHU, D.; DAS, H.R.. Evaluation of inhibitory activities of plant extracts on production of LPS-stimulated pro-inflammatory mediators in J774 murine macrophages. *Mol. Cell. Biochem*, v. 336, p.127-35, 2010.

VICTAL, J. C., VALÉRIO, L. B., OSHIRO, M. C., BAPTISTA, S. C., PINHEIRO, F. Métodos alternativos in vitro e in silico: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 36-57, jun. 2014.

VONKEMAN, H. E.; LAAR, M. A. F. J. VAN DE. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Adverse Effects and Their Prevention. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 39, n. 4, p. 294–312, 2010.

WARDMAN, P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. **Free radical biology & medicine**, v. 43, n. 7, p. 995–1022, 2007.

WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B.; LIVESEY, J. H.; KETTLE, A. J. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: Implications for microbial killing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 52, p. 39860–39869, 2006.

WRIGHT, H. L. *et al.* The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. **Nat. Rev. Rheumatol.** advance online publication 10 June 2014

YANG, X., Y. JIANG, *et al.* (2016). Does IL-17 Respond to the Disordered Lung Microbiome and Contribute to the Neutrophilic Phenotype in Asthma? **Mediators Inflamm** 2016: 6470364.

ZENARO, E., PIETRONIGRO, E., DELLA BIANCA, V., PIACENTINO, G., MARONGIU, L., BUDUI, S., ... & MONTRESOR, A. (2015). Neutrophils promote Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. **Nature medicine**, 21(8), 880-886.

ZIMMERMANN, A. M.; KIRSTEN, V. R. Alimentos com função antioxidante em doenças crônicas: uma abordagem clínica. **Disciplinarum Scientia| Saúde**, v. 8, n. 1, p. 51-68, 2016.