



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

HILMARA HELIA DE SOUSA AMARAL

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DE
BIOPRODUTOS OBTIDOS DE *Amburana cearensis*

FORTALEZA

2015

HILMARA HELIA DE SOUSA AMARAL

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DE
BIOPRODUTOS OBTIDOS DE *Amburana cearensis***

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

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- A514a Amaral, Hilmara Helia de Sousa.
 Avaliação da atividade anti-inflamatória e antioxidante de bioprodutos obtidos de *amburana cearensis* / Hilmara Helia de Sousa Amaral. – 2015.
 56 f.: il. color.
- Monografia (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia,
 Odontologia e Enfermagem, Departamento de Farmácia, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2015.
 Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.
1. Anti-Inflamatórios. 2. Antioxidantes. 3. Neutrófilos. I. Título.

CDD 615.329

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DE
BIOPRODUTOS OBTIDOS DE *Amburana cearensis***

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

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Rita Neuma Dantas Cavalcante de Abreu
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Me. Julliana Catharina de Sousa Neves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

À Deus, provedor da minha existência e realizador de todos os meus sonhos.

À minha família, minha mãe Dijé e meus irmãos Hildemara, Italo e Samara. Vocês são os maiores responsáveis por qualquer vitória que eu consiga, afinal tudo o que eu sou agradeço à vocês que são meus exemplos, meu alicerce e porto seguro, as pessoas com quem eu sempre poderei contar. Me orgulho de ter em mim muito de cada um de vocês. Obrigada pelo amor, cuidado e incentivo de sempre.

Aos meus sobrinhos, Guilherme e Alina, por tornarem a minha vida mais feliz.

Aos meus cunhados, Tony, Roberto e Aline, por serem parte tão importante da minha família. Especialmente ao Tony, por ser meu pai de brincadeira, pelo cuidado, carinho e incentivo sempre.

Ao Saulo, pelo apoio, companherismo, torcida, paciência em aguentar todos os meus estresses durante o curso e por sempre me fazer acreditar que sou capaz.

À Professora Kalyne, pela orientação, por investir em mim e acreditar em meu potencial.

À professora Juvenia pela orientação durante o período de monitoria e por todo o carinho que sempre demonstra por mim. Obrigada pelos ensinamentos e pela amizade. Minha admiração pela senhora é gigante.

Aos demais professores da Faculdade de Farmácia que colaboraram para minha formação. Tenho um carinho especial por alguns a quem tomo como exemplo de profissional e de ser humano. Muito obrigada!

À Taiana, pela parceria nesses anos de iniciação científica, pelas orientações, pelos conselhos enriquecedores, por chamar minha atenção quando necessário e principalmente pela amizade.

Ao Emmanuel, Talita e Rayanne pela companhia durante os experimentos, a disponibilidade em ajudar sempre com muita boa vontade, pelos momentos de descontração, por fazer os longos dias de experimentos se tornarem mais agradáveis e divertidos e tornar mais feliz nossa convivência no laboratório.

À todos do CEFAC por tornarem o ambiente de trabalho um lugar leve e agradável e pelos momentos de descontração tão importantes, especialmente à Jack e Ana Paula por tornarem as manhãs no laboratório mais alegres.

À Suely, minha amiga fora da faculdade e que divide todos os momentos comigo. Obrigada pelas conversas, incentivos e amizade de sempre.

E por último e não menos importante, obrigada as pessoas que foram essenciais durante esses 5 anos. As minhas companheiras durante essa caminhada. Passar por todas as dificuldades que o curso traz foi mais fácil por que eu tinha vocês ao meu lado, nos desesperos pré-provas, nas realizações de trabalhos, nas revisões de matéria, nos grupos de estudo durante o dia e também na madrugada! Nas alegrias e tristezas, dentro e fora da faculdade. Vocês são mais uma prova do cuidado de Deus com a minha vida. E como sou grata por isso. Grata à Ele por colocar vocês no meu caminho e grata à vocês por aceitarem dividir comigo todos esses momentos. Rayanne, Nara, Giovanna, Letícia, Érika e Aline, obrigada pela cumplicidade, pela amizade, pelas conversas, pelas risadas, pelas gordices e por fazerem parte da minha vida.

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

RESUMO

Amburana cearensis é uma planta silvestre típica do nordeste brasileiro, conhecida como cumaru e popularmente usada na forma de lambedor para o tratamento de doenças respiratórias. Estudos químicos isolaram diversas substâncias das cascas do caule da planta (CANUTO, 2006), como a cumarina (CM) e amburosídeo A (AMB), princípios majoritários utilizados como marcadores para a padronização do seu extrato seco (CLAE-DAD) (ARARUNA, 2013). Estudos farmacológicos mostraram as atividades anti-inflamatória, antinociceptiva, relaxante muscular, antiedematogênica e antioxidante do extrato não padronizado e de algumas substâncias isoladas da casca do caule da planta (LEAL, 1995, 1997, 2000, 2003). Diante do potencial de *A. cearensis* o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade anti-inflamatória e antioxidante do extrato seco (otimizado e padronizado) e da fração fenólica de *A. cearensis* (ESAC e FFAC, respectivamente) em neutrófilos humano. Inicialmente foram investigados os efeitos do ESAC e FFAC sobre a desgranulação neutrofílica induzida por PMA (0,1 μ mol/L) mensurados pela liberação da enzima MPO que foi reduzida pelo ESAC (25, 50 e 100 μ g/mL) em até 75,2 % e pela FFAC (25, 50 e 100 μ g/mL) em até 89,8 %, com efeito comparável à indometacina, droga padrão, que reduziu em torno de 70 % a liberação de MPO. Para avaliar os efeitos do ESAC e FFAC sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos foi realizado ensaio de quimioluminescência (sonda luminol) para a quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelos neutrófilos ativados por PMA. Tanto o ESAC quanto a FFAC reduziram a produção de oxidantes, especialmente via sistema MPO-H₂O₂-HOCl com inibições máximas de 54.81% e 63.17%, respectivamente. Na avaliação da citotoxicidades destes produtos derivados (atividade de LDH e teste do MTT), pode ser observado a ausência de citotoxicidade destes, ratificando que os efeito anti-inflamatório determinado não está relacionado a um efeito tóxico. Diante dos resultados obtidos, tanto o ESAC quanto a FFAC possuem atividades anti-inflamatória e antioxidante por modularem mecanismos pro-inflamatórios de neutrófilo humano, alvos celulares de interesse no desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios

Palavras-chave: *Amburana cearensis*, Anti-Inflamatórios, Antioxidantes, Neutrófilos.

ABSTRACT

Amburana cearensis is a typical wild plant in the Northeastern Brazil, known as “cumaru” and popularly used in the form of “lambedor” for the treatment of respiratory diseases. Chemical studies isolated several substances from plant trunk bark (CANUTO, 2006), such as coumarin (CM) and amburosídeo A (AMB), majoritarian principles used as markers for the standardization of its dry extract (HPLC-DAD) (ARARUNA, 2013). Pharmacological studies showed anti-inflammatory activity, anti-nociceptive, muscle relaxant, antiedematogenic and antioxidante of non-standardized extract and some isolated compounds from the plant (Leal, 1995, 1997, 2000, 2003). Faced with the potential of *A. cearensis* the aim of the present study was to evaluate the anti-inflammatory and antioxidant activity of standardized dry extract (ESAC) and the phenolic fraction (FFAC) of *A. cearensis* in human neutrophils. It was initially evaluated the effects of ESAC and FFAC measured on neutrophil degranulation by the release of MPO enzyme was reduced by ESAC (25, 50 and 100 ug / ml) up to 75.26% and the FFAC (25, 50 and 100 ug / ml) up to 89.88% effect comparable to indomethacin, the standard drug which reduced the release of MPO in the 76.12 and 70.45%, respectively. To evaluate the effects of ESAC and FFAC on the oxidative metabolism of neutrophils was performed chemiluminescence assay (luminol probe) for the quantification of reactive oxygen species (ROS) produced by neutrophils activated by PMA. Any ESAC as FFAC reduced the production of oxidants, especially via H₂O₂-MPO-HOCl system with maximum inhibition of 54.81% and 63.17%, respectively. In the assessment of cytotoxicity of these derivatives (MTT and LDH activity test), the absence of cytotoxicity of these can be seen, confirming that the anti-inflammatory effect is determined not related to a toxic effect. Based on these results, both the ESAC as FFAC have anti-inflammatory and antioxidant activities by modulating pro-inflamatórios mechanisms of human neutrophils, cellular targets of interest in the development of anti-inflammatory drugs

Key words: *Amburana cearensis*, Anti-Inflammatory Agents, Antioxidants, Neutrophils.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Amburana cearensis</i> A. C. Smith	13
Figura 2 - Estruturas químicas isoladas de <i>Amburana cearensis</i>	14
Figura 3 – Perfil cromatográfico do extrato etanólico, do extrato seco por “spray-drying” e dos marcadores químicos amburosídeo A (AMB) e cumarina (CM) de <i>A. cearensis</i> por CLAE-DAD.....	17
Figura 4 - Ativação de neutrófilos.....	21
Figura 5 - Formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio a partir de reações com HOCl, produto da enzima mieloperoxidase	22
Figura 6 - Espectro de RMN 1H (500 MHz, CD3OD) da fração ACCCE/RES-M-R (FFAC)	26
Figura 7 - Espectro de RMN 1H do amburosídeo A (CD3OD, 500 MHz).....	27
Figura 8 - Estrutura química do Amburosídeo A	27
Figura 9 - Efeito do ESAC sobre a desgranulação de neutrófilos induzidos por PMA determinado pela inibição da liberação de MPO.....	33
Figura 10 - Efeito da FFAC sobre a desgranulação de neutrófilos induzidos por PMA determinado pela inibição da liberação de MPO.....	34
Figura 11 - Perfil de quimioluminescência induzida por PMA em neutrófilos na ausência e na presença de ESAC	35
Figura 12 - Efeito do ESAC sobre a produção de quimiolumiluminescência dependente de luminol (QL lum) em neutrófilos ativados com PMA	36
Figura 13 - Perfil de quimioluminescência induzida por PMA em neutrófilos na ausência e na presença de FFAC	37
Figura 14 - Efeito do ESAC sobre a produção de quimioluminescência dependente de luminol (QL lum) de neutrófilos ativados com PMA.....	38
Figura 15 - Avaliação da toxicidade do ESAC em neutrófilos humanos através da mensuração da atividade de lactato desidrogenase (LDH).....	40
Figura 16 - Avaliação da toxicidade da FFAC em neutrófilos humanos através da mensuração da atividade de lactato desidrogenase (LDH).....	41

Figura 17 – Avaliação da citotoxicidade do ESAC em neutrófilos humano determinado através do teste do MTT	42
Figura 18 - Avaliação da citotoxicidade da FFAC em neutrófilos humano determinado através do teste do MTT	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Plantas medicinais como fonte de medicamentos	10
1.2 <i>Amburana cearensis</i>	12
1.2.1 Distribuição geográfica, descrição botânica, química e etnofarmacologia	12
1.2.2 Toxicologia e farmacologia	15
1.2.3 Aspectos tecnológicos	17
1.3 O processo inflamatório e os neutrófilos	18
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Materiais	24
3.1.1 Aspectos éticos	24
3.1.2 Material botânico	24
3.1.3 Substâncias químicas	24
3.1.4 Local de execução	24
3.1.5 Produção e padronização (CLAE-DAD) do Extrato seco de <i>Amburana cearensis</i> (ESAC) por “spray drying”	24
3.1.6 Obtenção e caracterização (RMN) da Fração fenólica de <i>Amburana cearensis</i> (FFAC) ...	25
3.2 Métodos	28
3.2.1 Isolamento de polimorfonucleados (PMN)	28
3.2.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória	28
3.2.3 Avaliação da atividade antioxidante	29
3.2.4 Avaliação da citotoxicidade	30
3.2.5 Análise Estatística	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória do ESAC e da FFAC em neutrófilos humano: desgranulação induzida por PMA mensurada pela enzima mieloperoxidase (MPO)	32

4.2. Efeito do ESAC e da FFAC sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos mensurado por quimioluminescência	32
4.3. Avaliação da citotoxicidade do ESAC e da FFAC em neutrófilos humano	39
5 DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 Plantas medicinais como fonte de medicamentos

O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico pelos povos faz parte da evolução humana. Desde os primórdios das civilizações sabe-se que o homem utilizava as plantas como alimentos ou remédios, descobrindo seus efeitos nocivos ou úteis de forma empírica (TOMAZZONI, 2006).

A maioria das plantas existentes no planeta é desconhecida sob o ponto de vista científico, onde entre 250 – 500 mil espécies, somente cerca de 5% têm sido estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem menor avaliada sob aspectos biológicos. Entretanto, o estudo de plantas medicinais assim como o de seus constituintes químicos, como frações e substâncias isoladas são de extrema importância para o desenvolvimento de novos medicamentos, pois podem ser usados como matéria-prima ativa ou como protótipos para medicamentos sintéticos (FILHO, 1998). 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).

Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis foram obtidos de forma direta ou indireta a partir de fontes naturais, destes 25% foram obtidos exclusivamente de plantas. Ainda, destaca-se que das 252 drogas consideradas essenciais para à saúde humana pela OMS, 11% são de origem vegetal e um número significativo das drogas sintéticas foram obtidas a partir de precursores naturais (RATES, 2001; CALIXTO, 2001).

Como exemplo da importância do estudo de plantas medicinais e seus compostos para o desenvolvimento de novos medicamentos, podemos citar alguns obtidos de fontes vegetais como o fármaco semissintético taxol (Paclitaxel; Taxol®), um diterpeno anticancerígeno isolado de plantas do gênero *Taxus*, indicado para o tratamento de câncer de ovários e pulmões (DENIS *et al.*, 1988). Também são obtidos de fontes vegetais os fitofármacos vincristina e vimblastina, alcalóides isolados das flores de *Catharanthus roseus* (Apocinaceae) indicados no tratamento de alguns tipos de cânceres (PETRY, 2012; OLIVEIRA, 2012). Outro exemplo é o do medicamento

fitoterápico Acheflan®, do laboratório brasileiro Aché, um produto anti-inflamatório obtido a partir da *Cordia verbenacea* DC (Boraginaceae), conhecida popularmente como erva Baleeira (ZANCHETT, 2013).

Além da importância terapêutica, o estudo e desenvolvimento de medicamentos obtidos a partir de plantas também tem importância econômica visto que o mercado mundial de medicamentos é estimado em cerca de 300 bilhões de dólares e aproximadamente 40% desse valor são oriundos direta ou indiretamente de fontes naturais (ZUANAZZI, 2010). Só o mercado mundial de fitoterápicos movimenta por ano cerca de US\$ 22 bilhões (PINTO *et al.*, 2002). No mercado brasileiro, não há dados oficiais atualizados, mas estima-se uma movimentação de aproximadamente US\$ 160 milhões ao ano e esse valor é gerado por 119 empresas que possuem registro de 512 fitoterápicos junto à ANVISA, órgão responsável pela regulamentação de plantas medicinais e seus derivados (CARVALHO, 2008).

O Brasil é um dos países de maior biodiversidade do planeta com 40.989 espécies, sendo destas 18.932 endêmicas (FORZZA, 2012). Contudo, dos fitoterápicos com registro no País, menos de 30% são de espécies nativas da América do Sul e uma porcentagem ainda menor são de espécies brasileiras. A maioria das espécies vegetais utilizadas como matéria-prima ativa dos fitoterápicos registrados são de origem asiática e européia somando 55,56% dos registros junto à ANVISA (CARVALHO, 2008).

Assim o governo brasileiro tem mostrado interesse, destinando esforços para organizar e incentivar a pesquisa de plantas nacionais. 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, e a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Rennis), uma lista lançada pelo Ministério da Saúde onde constam 71 espécies brasileiras identificadas com potencial para gerar produtos de interesse ao SUS. A Rennis 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).

No Nordeste do Brasil algumas das espécies de plantas medicinais tem sido estudadas por pesquisadores da UFC, como *Myracrodruon urundeuva* (Aroeira-do-deserto), *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta), *Spondias mombin* (cajá), *Ocimum gratissimum* (alfavaca) e a *Amburana cearensis* (Cumaru) que tem sido utilizada para o

tratamento de doenças respiratórias e que há décadas é estudada por nosso grupo de pesquisa (MATOS, 2000; VIANA *et al.*, 2011; LEAL, 1995, 1997, 2003, 2003a, 2003b, 2005, 2006, 2008).

1.2 *Amburana cearensis*

1.2.1 Distribuição geográfica, descrição botânica, química e etnofarmacológica

Amburana cearensis A.C. Smith é uma planta típica da caatinga do nordeste brasileiro, especialmente do Ceará, mas que também pode ser encontrada em praticamente toda a América do Sul (**Figura 1**). É uma planta da família das Leguminosaeae Papilionidaeae (Fabaceae) conhecida popularmente como cumaru, imburana-de-cheiro ou cerejeira. É uma árvore frondosa que pode atingir até 15 m de altura e 50 cm de diâmetro, possui flores brancas, vagem achatada e escura e casca do caule vermelha (MATOS, 2000).

As cascas do caule são tradicionalmente utilizadas na medicina popular na forma de lambedor (bebida açucarada caseira) para o tratamento de doenças respiratórias como gripe, asma, tosse e bronquite (MATOS, 2000). Industrialmente, existe apenas uma forma farmacêutica disponível, o xarope de cumaru, produzido pelo Programa Farmácias Vivas, Farmácia Escola/UFC e por algumas empresas privadas, como o Selachii e o Bionatus (MATOS, 2000; CANUTO *et al.*, 2008).

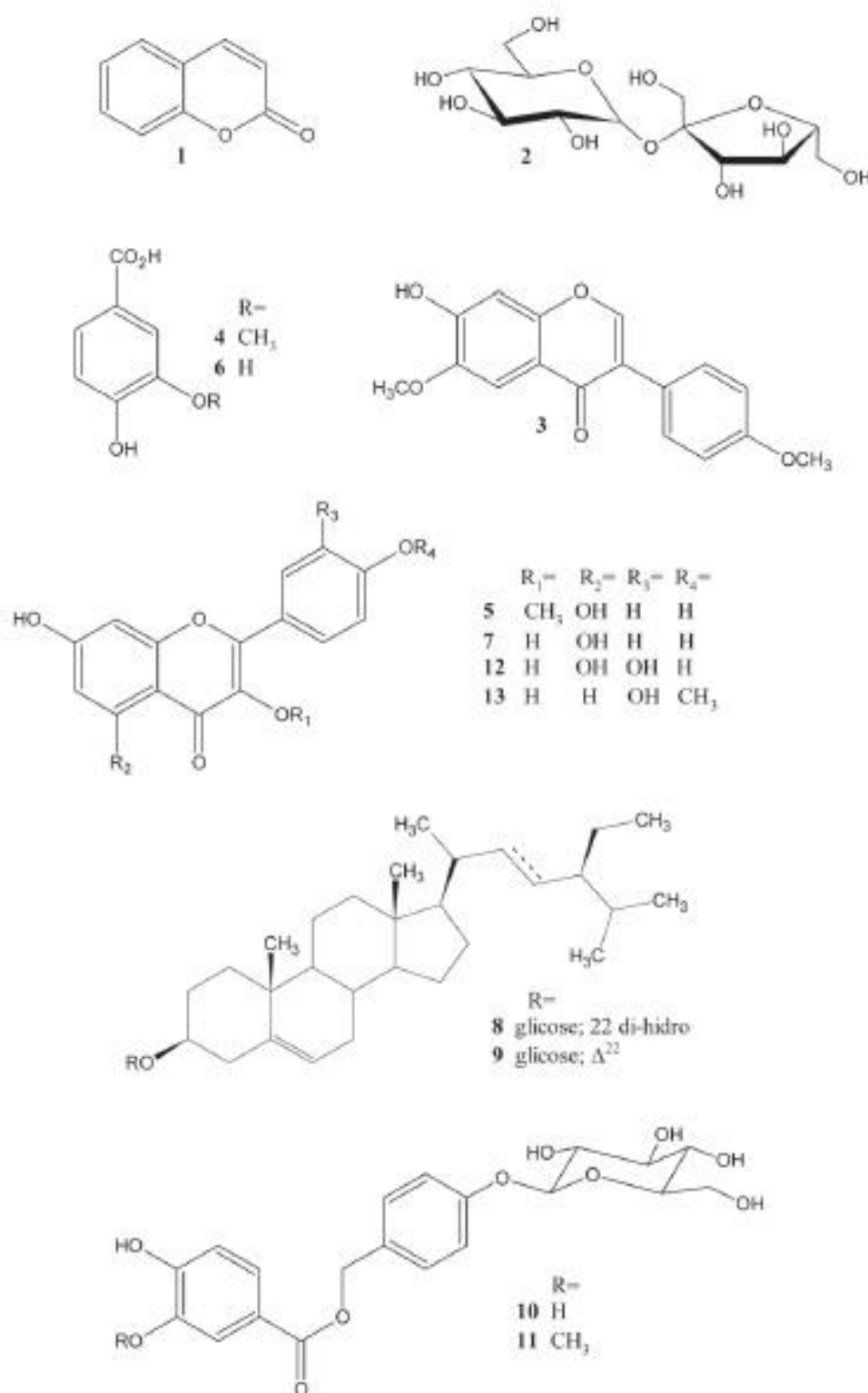
O estudo fitoquímico das sementes de *A. cearensis* mostrou que estas possuem aproximadamente 23% de óleo fixo constituído principalmente do glicerídeo dos ácidos: palmítico (18,6%), linoléico (7,1%), oléico (53,1%) e esteárico (8%), além de 4% de uma mistura de cumarina e 6-hidroxycumarina (SOUSA, 1991; MORS, 2000).

Estudos realizados com as cascas do caule de *A. cearensis* permitiram isolar e identificar 11 constituintes da planta: cumarina, dois ácidos fenólicos (ácido vanílico e ácido protocatecuico), um heterosídeo fenólico (amburosídeo A), a mistura de β -sitosterol e estigmasterol glicosilados e cinco flavonoides (aformosina, isocampferídeo, campferol, quercetina e 4'-metoxi-fisetina). Além dos compostos isolados ainda obteve-se sacarose a partir do extrato etanólico (CANUTO E SILVEIRA, 2006) (**Figura 2**). Dentre os compostos identificados o amburosídeo A e a cumarina apresentaram-se como os compostos bioativos majoritários (CANUTO *et al.*, 2002; 2004).

Figura 1 - *Amburana cearensis* A. C. Smith



(Fotos: SILVEIRA; LORENZI E MATOS, 2008).

Figura 2 - Estruturas químicas isoladas de *Amburana cearensis*

1-cumarina, 2- sacarose, 3- afrormosina, 4- ácido vanílico, 5- isocampferídeo, 6- ácido protocatecuico, 7- campferol, 8- β-sitosterol glicosilado, 9- estigmasterol glicosilado, 10- amburosídeo A, 11- amburosídeo B, 12- quercetina, 13- 4'-metoxi-fisetina .

(FONTE: CANUTO E SILVEIRA, 2006).

1.2.2 Toxicologia e farmacologia

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa (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*.

A avaliação toxicológica aguda do extrato hidroalcoólico (EHA) não padronizado 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, apresentando uma DL50 de $1,79 \pm 0,12$ g/Kg. Na avaliação toxicológica de doses repetidas, 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 (LEAL et. al., 2003b).

Estudos (LEAL, 95, 97) realizados com o extrato hidroalcoólico (EHA) não padronizado, a cumarina e uma fração flavonoídica obtidos da casca do caule de *A. cearensis*, 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. O EHA, a cumarina e a fração flavonoídica apresentaram atividade antiedematogênica e reduziram o acúmulo de células inflamatórias no peritônio dos animais.

O EHA e a cumarina também apresentaram efeito relaxante na contração induzida por adrenalina, acetilcolina ou cloreto de bário em ducto deferente de rato. Além disso, o EHA, a cumarina e a fração flavonóide mostraram efeito relaxante muscular em traqueia de cobaia pré-contraída por carbacol, histamina ou KCl (LEAL et al., 2003).

O isocampferídeo e o amburosídeo A, moléculas isoladas de *A. cearensis*, possuem atividade anti-inflamatória determinada pela redução do edema de pata induzido por carragenina, dextrano, prostaglandina E₂, histamina ou serotonina em camundongos. A atividade antiedematogênica se deu pela capacidade dessas moléculas prevenirem o aumento da permeabilidade vascular e o acúmulo de células inflamatórias

nos modelos de edema de pata e peritonite em camundongos (LEAL, 2006a; LEAL *et al.*, 2009).

Parte dos efeitos anti-inflamatórios apresentados pelo isocampferídeo e amburosídeo A está relacionado à habilidade desses compostos em modular mecanismos pró-inflamatórios de neutrófilos, relacionados à ativação destas células e à secreção de mediadores inflamatórios como a enzima mieloperoxidase (MPO) e TNF- α (LEAL *et al.*, 2009).

Além do que foi exposto, o amburosídeo A, também apresentou atividade antioxidante e neuroprotetora em cultura de células mesoencefálicas de ratos, expostas à neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), atividade antiprotozoária, antifúngica, antibacteriana e antimalárica (LEAL *et al.*, 2005; LEAL, 2006a; LEAL *et al.*, 2008; BRAVO *et al.*, 1999). O isocampferídeo também apresentou potencial antineoplásico, devido seus efeitos antiproliferativos contra ovos de ouriço do mar (*Lytechinus variegatus*) e linhagens de células tumorais (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2003).

1.2.3 Aspectos tecnológicos

Nos últimos anos (2008-2013) nosso grupo de pesquisa tem realizado estudos farmacêuticos (ARARUNA, 2008; 2013; LEAL *et al.*, 2011) visando o desenvolvimento de formulações padronizadas que tem como matéria-prima ativa o extrato da casca do caule de *Amburana cearensis*.

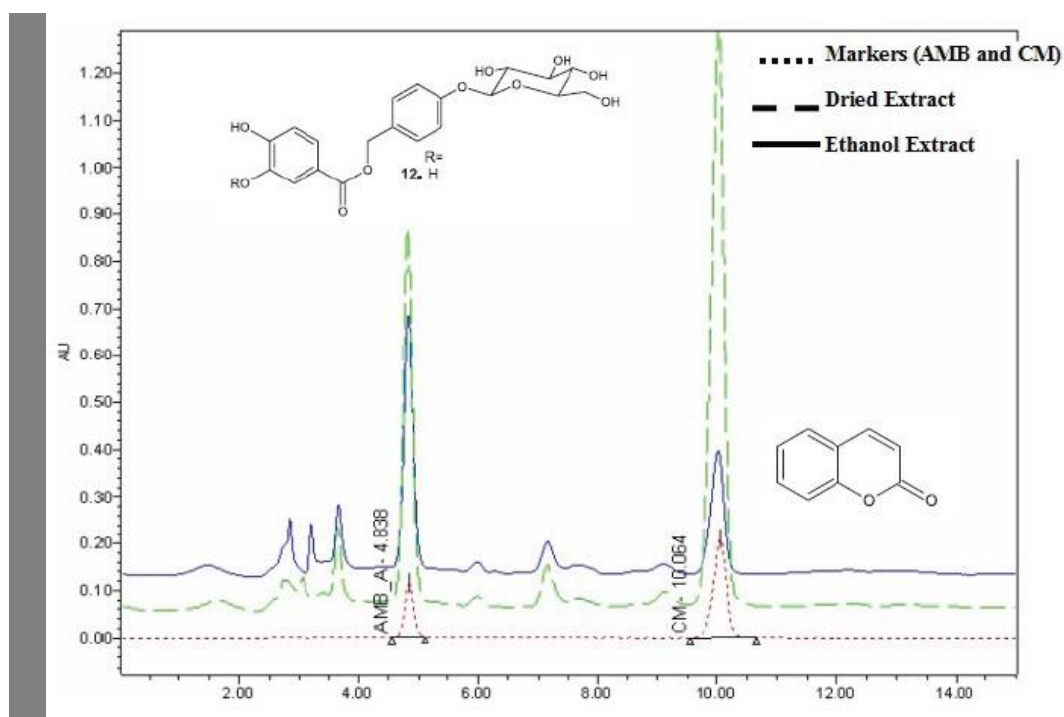
Assim, foi desenvolvido e validado o método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para identificação e determinação do teor dos marcadores químicos (cumarina e amburosídeo A) nas matérias-primas e produto acabado.

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). Prosseguindo os estudos, foram determinadas as condições ideais para a produção da solução extrativa e do extrato seco por “spray-drying”. A análise por CLAE mostrou que o processo de secagem e condições escolhidas não alterou o perfil cromatográfico em relação à solução extrativa (**Figura 3**) (ARARUNA, 2013).

Diante do exposto, os estudos químicos, farmacológicos e farmacêuticos até então desenvolvidos acerca de *A. cearensis*, especialmente por nosso grupo de pesquisa, tornam essa espécie uma matéria-prima ativa em potencial para o desenvolvimento de um medicamento anti-inflamatório.

No presente estudo será investigado o extrato seco padronizado das cascas do caule de *A. cearensis* (ESAC) e uma fração isolada que é composta de um “pool” de fenóis presentes na planta, denominada de fração fenólica (FFAC).

Figura 3 – Perfil cromatográfico do extrato etanólico, do extrato seco por “spray-drying” e dos marcadores químicos amburosídeo A (AMB) e cumarina (CM) de *A. cearensis* por CLAE-DAD



(FONTE: ARARUNA *et al.*, 2013)

1.3 O processo inflamatório e os neutrófilos

O processo inflamatório caracteriza-se como uma resposta de defesa do organismo que ocorre após um dano celular que pode ser causado por microrganismos, agentes físicos, químicos, necrose tecidual ou reações imunológicas. Esse processo é uma ação coordenada pelo tecido afetado e pelo sistema imunológico com a finalidade de remover o estímulo indutor da resposta e reparar o dano (LIMA *et al.*, 2007; SILVA, 2011; COTRAN *et al.*, 2000).

O sistema imunológico é dividido entre inato e adaptativo. A imunidade inata desempenha uma resposta rápida efetuada por células com capacidade de fagocitar e liberar mediadores inflamatórios, como os neutrófilos e macrófagos. Já a resposta adaptativa tem como característica a especificidade da resposta, diversidade de reconhecimento e memória, desempenhados por linfócitos e moléculas solúveis produzidas por eles (CRUVINEL, 2010).

Logo após a lesão tecidual ocorre a liberação de mediadores inflamatórios pelas células residentes do tecido, como as citocinas IL-1 e TNF- α . Nesse momento ocorre vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, que confere vermelhidão

ao tecido, calor a região afetada e edema devido a passagem de proteínas plasmáticas e água para o tecido, esse processo é conhecido como fase vascular da resposta inflamatória (LEES *et al.*, 2004; CRUVINEL, 2010).

Durante a fase vascular o endotélio torna-se ativado e passa a expressar moléculas de adesão, como as selectinas (ICAM-1, VCAM-1) que favorecem a aderência dos leucócitos e sua migração para o tecido, processo denominado de diapedese e que ocorre direcionado pela presença de um gradiente de substâncias quimiotáticas no sítio inflamatório. Ao chegar no local da inflamação, as células tentam fagocitar o patógeno, a fim de reparar o dano. Essa é a fase celular da inflamação e ocorre simultaneamente à fase vascular. Os elementos predominantes nessa fase são da resposta imune inata e as principais células envolvidas são os neutrófilos e macrófagos, quando se trata de um processo inflamatório agudo. Quando ocorre a cronificação do processo inflamatório as principais células envolvidas são monócitos e linfócitos (LEES *et al.*, 2004, CRUVINEL, 2010).

Como foi exposto anteriormente a resposta inflamatória é essencial para a recuperação do tecido, entretanto em algumas doenças essa resposta se torna excessiva e traz prejuízos ao organismo (LIMA *et al.*, 2007; SILVA, 2011; COTRAN *et al.*, 2000). Por exemplo, a asma é definida como uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, cuja gravidade é classificada de acordo com o grau de inflamação encontrado (TODOBOM, 2006). A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) também resulta de danos no pulmão gerados por um conjunto de mecanismos que envolvem o estresse oxidativo e a inflamação (CAVALCANTE, 2009).

Existem estudos que investigam o envolvimento do processo inflamatório e do estresse oxidativo em doenças neurodegenerativas, como Doença de Parkinson e Alzheimer, e que mostram o envolvimento de elevados níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) e da circulação de neutrófilos como possíveis mecanismos para essas doenças (VITTE, 2004).

Até mesmo as doenças denominadas autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico (LES), artrite reumatoide e esclerose sistêmica também são enfermidades inflamatórias crônicas e existem evidências que demonstram que distúrbios na imunidade inata podem ser fundamentais na fisiopatologia desse tipo de doença. Por exemplo, tem-se evidenciado que as células mononucleares do sangue periférico de

pacientes com LES apresentam aumento na expressão de genes relacionados ao interferon tipo I, mediadores típicos da imunidade inata (CRUVINEL, 2010).

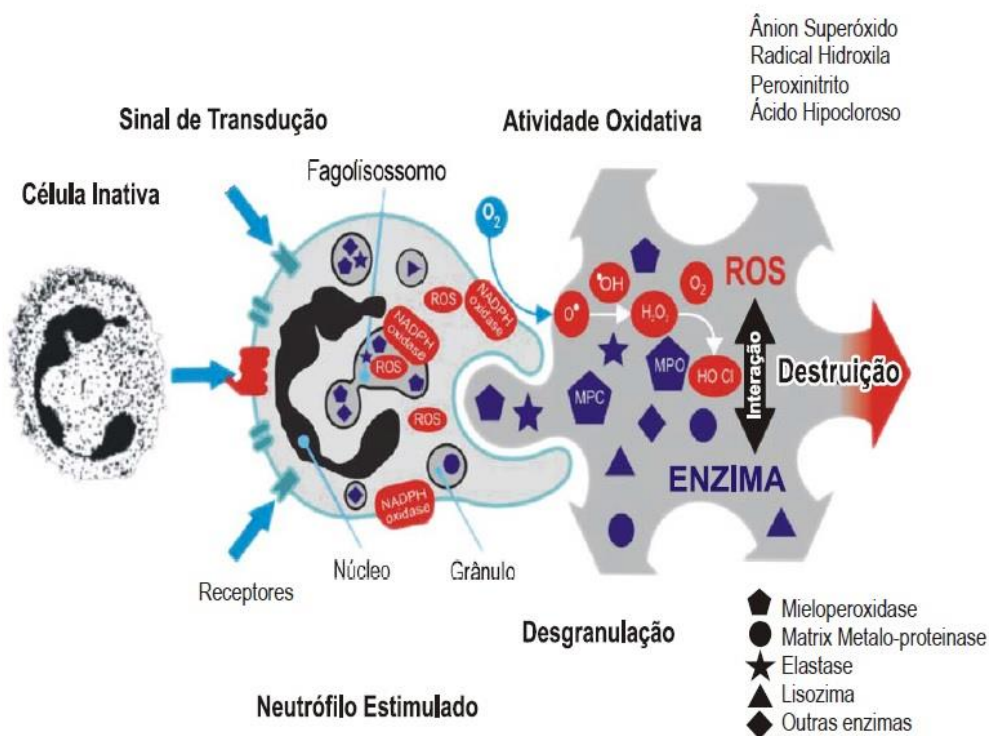
Diante disso, é sugestivo que os elementos da imunidade inata podem ser alvos para terapia de doenças inflamatórias crônicas e pesquisas tem sido direcionadas para o desenvolvimento de substâncias que possam interagir com esses elementos e assim modular respostas inflamatórias indesejadas (CRUVINEL, 2010).

Os neutrófilos são considerados as principais células da imunidade inata. São a primeira linha de defesa do organismo contra agentes infecciosos, principalmente por serem os leucócitos mais abundantes no sangue, por serem as primeiras células a migrarem para o sítio inflamatório atraídos por quimioquinas e por fagocitarem e eliminarem os invasores que tentam instalar uma infecção no organismo (NATHAN, 2006).

Essas células são ativadas por diversos estímulos e conseguem reconhecer e fagocitar partículas estranhas, que são expostas à enzimas presentes nos grânulos das células, além de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), que são formadas durante a ativação de neutrófilos. As partículas fagocitadas são englobadas em vacúolos citoplasmáticos, chamados fagossomos. Aos fagossomos fundem-se grânulos, presentes no citoplasma das células, formando os fagolisossomos (MACHADO, 1997) **(Figura 4)**.

Os grânulos presentes nos neutrófilos podem ser de quatro tipos: os primários (azurófilos), os secundários (específicos), os terciários (ricos em gelatinase) e as vesículas secretórias. Neles possuem enzimas capazes de degradar diversas substâncias biológicas e o processo de liberação de grânulos é conhecido por desgranulação (MACHADO, 1997; FAURSCHOU, 2003).

Figura 4 - Ativação de neutrófilos



(FONTE: LEAL, 2006)

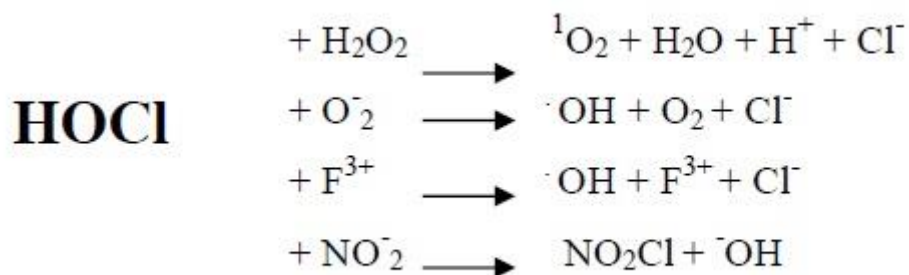
A ativação do processo de fagocitose nos neutrófilos estimula uma explosão respiratória, o “burst” oxidativo, que se trata do aumento do consumo de oxigênio, aumento da glicólise anaeróbica e geração de radicais livres derivados de oxigênio e nitrogênio. Esse processo resulta na produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e derivados que levam à destruição das partículas fagocitadas e o desenvolvimento da resposta inflamatória (MACHADO, 1997).

O “burst” oxidativo é o evento central da fagocitose e é mediado por complexos enzimáticos presentes nos grânulos dos neutrófilos. Dentre as várias proteínas presentes, duas de grande importância são as enzimas NADPH oxidase e a mieloperoxidase (MPO), pois ambas estão envolvidas no processo oxidativo celular, responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs). Entretanto, as EROs podem ser geradas por mecanismos dependentes ou independentes da MPO (ARNHOLD, 1999; MACHADO, 1997).

No mecanismo dependente de MPO o complexo NADPH oxidase catalisa a redução do oxigênio molecular (O_2), formando o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que contém um elétron desemparelhado. Esse superóxido gerado é reduzido no fagossomo à

peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por dismutação espontânea e a MPO catalisa a reação do peróxido de hidrogênio na presença de íons haletos, para formar ácido hipocloroso (HOCl), um forte agente oxidante e bactericida. O ácido hipocloroso também pode reagir e formar cloreto (Cl^-) e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio com alto poder de lesão tecidual, como o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) formado da reação do ácido hipocloroso e o ânion superóxido ou Fe^{2+} . (CANDEIAS et al., 1993; ROMAN 2007) **(Figura 5)**.

Figura 5 - Formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio a partir de reações com HOCl , produto da enzima mieloperoxidase



(FONTE: ARNHOLD, 2004)

Os mecanismos independentes de MPO envolvem o superóxido que escapa do fagossomo que é reduzido a peróxido de hidrogênio pela superóxido desmutase (SOD) no citosol e o “burst” oxidativo gera outras espécies de oxigênio, como o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e o oxigênio “singlet” (${}^1\text{O}_2$) (MACHADO, 1997).

Os radicais de oxigênio gerados tem ação oxidante sobre diversas estruturas e compostos celulares e são capazes de oxidar membranas, inativar enzimas, gerar compostos tóxicos, entre outros. Assim a geração excessiva de agentes oxidantes está também ligada ao dano tecidual em muitas doenças inflamatórias agudas e crônicas. (MACHADO, 1997).

Para evitar o efeito deletério dos agentes oxidantes o organismo possui substâncias antioxidantes naturais utilizadas para a neutralização agentes, entretanto o desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes resulta numa condição chamada de estresse oxidativo (BIANCHI, 1999).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória e antioxidante do extrato seco padronizado e fração fenólica de *Amburana cearensis* visando seu potencial no tratamento de doenças inflamatórias.

2.2 Objetivos Específicos

- a. Avaliar os efeitos do ESAC e FFAC sobre a desgranulação dos neutrófilos ativados por PMA, através da mensuração da enzima mieloperoxidase (MPO);
- b. Avaliar os efeitos do ESAC e FFAC sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos empregando a técnica de quimioluminescência;
- c. Avaliar a citotoxicidade do ESAC e FFAC em neutrófilos humano mensurados pela atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH);
- d. Avaliar a citotoxicidade do ESAC e FFAC em neutrófilos humano através da sua atividade metabólica pelo teste do MTT.

3 MATERIAIS E METÓDOS

3.1 Materiais

3.1.1 Aspectos éticos

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana (COMPEPE) da Universidade Federal do Ceará sob o número CAAE 45668515.4.0000.5054.

3.1.2 Material botânico

As cascas do caule de *Amburana cearensis* foram coletadas na fazenda São Vicente, na cidade de Quixeramobim - Ceará. Exsiccatas (no 837 e 847) da espécie estão registradas no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, UFC.

3.1.3 Substâncias químicas

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), Triton X-100, 3,3',3,5' - tetrametilbenzidina (TMB), gelatina (Difco).

3.1.4 Local de execução

Todos os experimentos foram realizados no Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos – CEFAC da Universidade Federal do Ceará.

O projeto recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq) com o número do processo 484201/2012-3, Chamada Pública MCT/CNPq - N ° 14/2012 – Universal/Universal 14/2012.

3.1.5 Produção e padronização (CLAE-DAD) do Extrato seco de *Amburana cearensis* (ESAC) por “spray drying”

O extrato de *A. cearensis* foi preparado por maceração das cascas do caule em etanol na proporção de droga:solvente de 1:1. A solução extrativa obtida foi empregada no preparo do ESAC de acordo com o método descrito por Araruna (2008). Foi adicionado à solução extrativa dióxido de silício coloidal na concentração de 30% e a suspensão obtida foi seca por “spray drying”.

A padronização do extrato seco foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), utilizando como marcadores o amburosídeo A (AMB) e a cumarina (CM), que apresentaram teores de $74,54 \pm 1,45$ mg/g e $26,23 \pm 1,20$ mg/g de extrato, respectivamente (ARARUNA, 2013)(**Figura 3**).

3.1.6 Obtenção e caracterização por ressonância magnética nuclear (RMN) da Fração fenólica de *Amburana cearensis* (FFAC)

Foi preparado um extrato das cascas do caule de *A. cearensis* por extração exaustiva em sistema Soxlet com 1 L de etanol. As soluções metanólicas obtidas foram filtradas, reunidas e rotaevaporadas sob pressão reduzida, rendendo o extrato denominado ACCCE.

Uma alíquota do extrato ACCE foi submetido a uma partição sólido-líquido com água destilada e o líquido sobrenadante foi filtrado em funil com algodão e transferido para outro frasco e o material insolúvel em água foi novamente extraído com água destilada. Desse processo foram obtidas uma fração solúvel em água e a fração residual, seca em banho-maria e, posteriormente, em dessecador, denominada ACCCE/RES.

A ACCCE/RES foi submetida inicialmente à extração em sistema Soxhlet com hexano, em seguida com diclorometano, e, posteriormente, com acetato de etila. Finalmente, o resíduo presente no cartucho foi extraído exaustivamente em metanol. As soluções foram secas em rotaevaporador e renderam as frações ACCCE/RES-H (2,76 g), ACCCE/RES-D (5,84 g), ACCCE/RES-Ac (1,01 g) e ACCCE/RES-M (21,43 g), respectivamente.

O espectro de RMN ^1H da fração ACCCE/RES-M mostrou além de sinais de hidrogênio típicos de gordura, sinais característicos de cumarina e, por isso, a fração foi novamente submetida à extração exaustiva com diclorometano em sistema Soxhlet, obtendo-se, após secagem, a fração diclorometano, ACCCE/RES-M-D (3,88 g), e a fração residual, ACCCE/RES-M-R (15,43 g). Esta última apresentou, majoritariamente, em seu espectro de RMN ^1H (**Figura 6**) sinais característicos do amburosídeo A (**Figura 7 e 8**), sendo então denominada por FFAC e utilizada para testes farmacológicos no presente estudo.

A FFAC foi produzida e cedida pelo Laboratório de Fitoquímica de Plantas Medicinais (LAFIPLAM) da Universidade Federal do Ceará sob a coordenação do Professor Edilberto Rocha Silveira.

Figura 6 - Espectro de RMN 1H (500 MHz, CD₃OD) da fração ACCCE/RES-M-R (FFAC)

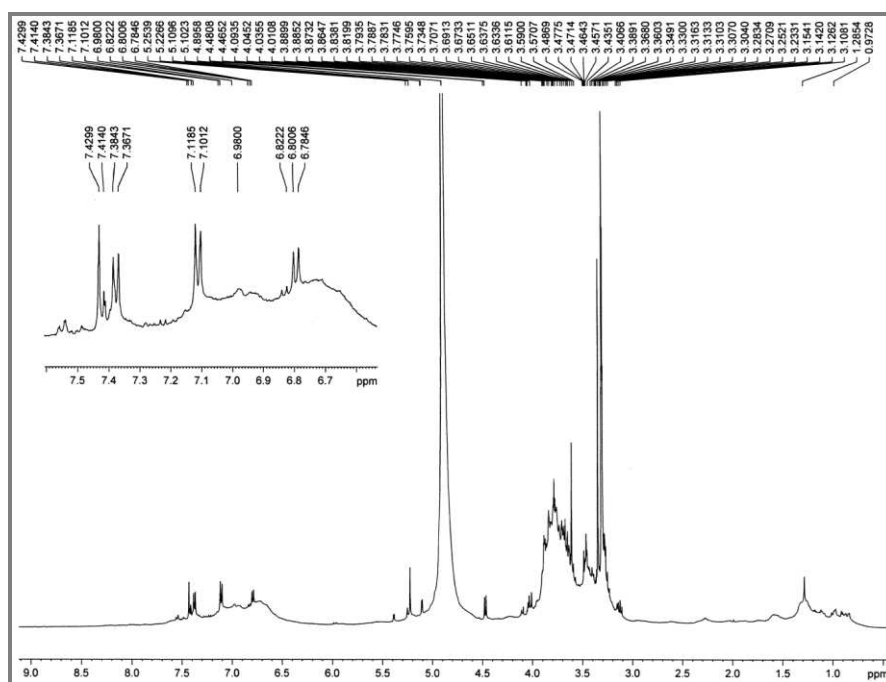


Figura 7 - Espectro de RMN 1H do amburosídeo A (CD3OD, 500 MHz)

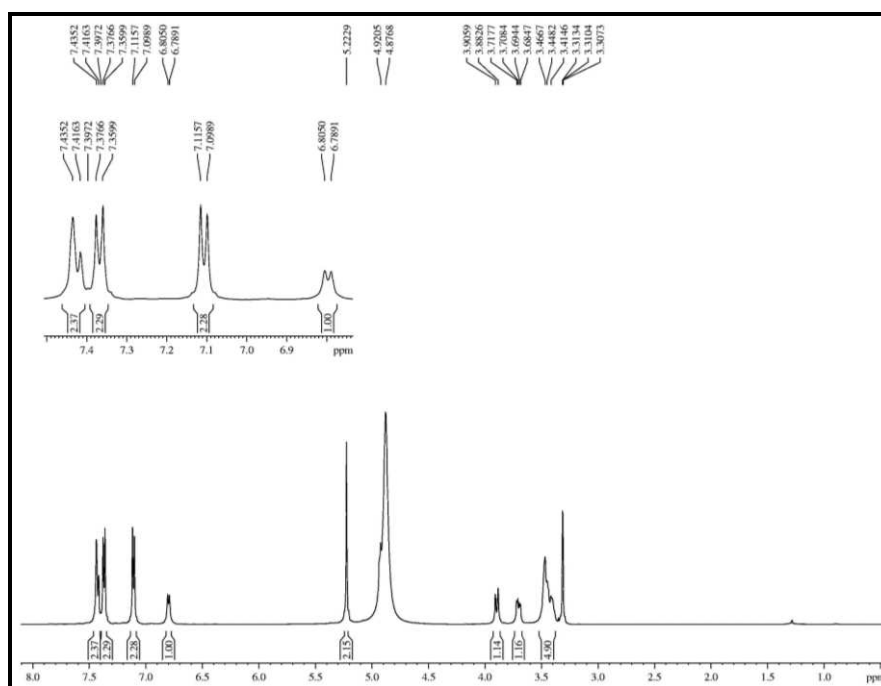
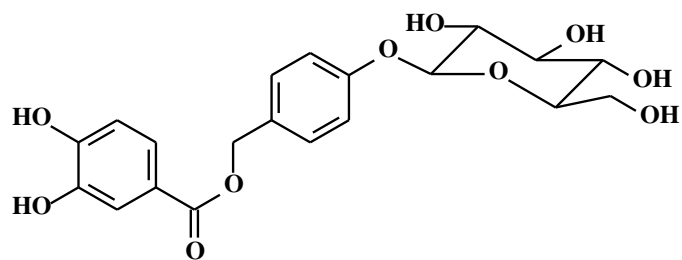


Figura 8 - Estrutura química do Amburosídeo A



3.2 Métodos

3.2.1 Isolamento de polimorfonucleados (PMN)

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”).

O sangue foi centrifugado, o plasma desprezado e a parte celular passou por sucessivas lavagens com solução salina, utilizando solução de gelatina 2,5 % (p/v) para formar um gradiente de separação entre os componentes sanguíneos (LUCISANO E MANTOVANI, 1984).

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de exclusão ao corante Azul de Tripán, a partir da contagem de 100 células.

3.2.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória

- **Determinação da concentração de mieloperoxidase (MPO)**

A MPO é uma hemoproteína encontrada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos (KLEBANOFF, 2005; GREEN et al., 2004). Essa hemoproteína possui um importante papel no processo inflamatório pois participa da destruição bacteriana e em situações de intensa ativação celular gera excessivamente agente oxidantes (SCHIEVEN et al., 2002).

A finalidade do teste é de determinar se o ESAC e a FFAC possuem atividade anti-inflamatória, inibindo a liberação de mieloperoxidase pelos neutrófilos após estimulação do processo inflamatório pelo PMA.

A suspensão de neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foi incubada por 30 minutos a 37°C com ESAC (12,5, 25 e 50 µg/mL), FFAC (6, 12,5, 25 e 100 µg/mL), DMSO (controle), Hanks (células não tratadas) ou indometacina (100 µg/mL – droga padrão). 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 acetato de sódio (1,5 M; pH 3,0). A leitura foi realizada a absorvância de 620 nm.

A construção de uma curva padrão pela adição de quantidades crescentes de MPO (0,125 – 3 U/mL) permitiu relacionar a absorvância com as unidades enzimáticas/mL. Os resultados serão expressos como percentual de inibição da liberação de mieloperoxidase (DE YOUNG et al., 1989).

3.2.3 Avaliação da atividade antioxidante

• Ensaio de Quimioluminescência

O ensaio de quimioluminescência foi utilizado para a quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROS) produzidas pelos neutrófilos ativados. A técnica consiste na emissão de fótons quando uma molécula ou um átomo passa do seu estado excitado para seu estado basal, onde a energia empregada para se obter o estado excitado é proporcionada por uma reação química (KUDOH *et al.*, 1999; LEITE, 2004). Marcadores luminescentes (sondas) são utilizados para aumentar a quantidade de luz emitida durante a produção de EROS e para que estes possam ser diferenciados. A sonda utilizada no teste foi o luminol (QL lum) que detecta a luminescência produzida por vários metabólitos intracelulares produzidos pela ação da MPO (LOPES, 2010).

Neutrófilos humano (5×10^6 células/mL) foram incubados a 37°C por 20 minutos com ESAC (12,5, 25 e 50 µg/mL) ou FFAC (12,5, 25 e 50 µg/mL) e da sonda quimioluminescente luminol (280 µM). Em seguida, os tubos foram transportados para o luminômetro e a eles foi adicionado o estímulo (PMA 10^{-7} M) e, imediatamente, acompanhou-se a produção de QL, em cpm (contagem de fótons por minuto), durante 20 minutos a 37°C. Em todos os ensaios realizados foi mensurada a produção espontânea de QL lum das células na ausência de estímulo. A quercetina (50µg/mL) foi utilizada como droga padrão. Os resultados são expressos em percentual de inibição da emissão de quimioluminescência.

3.2.4 Avaliação da citotoxicidade

- **Atividade da enzima Lactato desidrogenase (LDH)**

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima presente no citoplasma das células cuja detecção no fluido extracelular é indicativa de morte ou perda da integridade da membrana celular. Esta enzima é responsável pela conversão de piruvato à lactato na presença de NADH. O ensaio é realizado utilizando o Kit LDH (Liquiform) e baseia-se na medida do decréscimo da absorvância em 340 nm devido à oxidação do NADH, a qual é proporcional à atividade da LDH na amostra (BERGMEYER E BERNT, 1963).

Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados por 15 minutos a 37°C com ESAC (50, 100 e 200 µg/mL), FFAC (50, 100 e 200 µg/mL), DMSO (veículo da droga), Hanks (células não-tratadas) ou Triton x-100 (0,2% - padrão citotóxico) em tubos de ensaio. Os tubos foram centrifugados a 755 x g, por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos e mantidos em banho de gelo enquanto realizou-se a leitura. Para a determinação da LDH retirou-se alíquotas de 250 µL de substrato e adicionou-se 25 µL da amostra de sobrenadante. A leitura foi realizada a 340nm nos tempos de 1 e 3 minutos em espectrofotômetro. A atividade da enzima foi calculada de acordo com as especificações do fabricante da seguinte maneira:

$$A = [(A1 - A2)/2] \times 1746,03$$

Onde:

A = atividade da enzima LDH na amostra em U/L;

A1 = absorvância inicial (1 minuto) em 340 nm;

A2 = absorvância final (3 minutos) em 340 nm;

1746,03 = fator de cálculo estipulado pelo fabricante para volume de amostra de 25 µL.

- **Teste do MTT**

O ensaio do MTT é um método colorimétrico baseado na reação de redução do sal brometo de 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), de coloração amarela, à sal chamado de Formazan, de coloração roxa. A reação de redução é

catalisada pelo sistema enzimático succinato-tetrazol redutase, que faz parte da cadeia respiratória mitocondrial. 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 formazam é quantificado espectrofotometricamente (MOSMANN, 1983).

Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados por 30 minutos a 37°C com ESAC (50, 100 e 200 µg/mL), FFAC (50, 100 e 200 µg/mL), DMSO (veículo da droga), Hanks (células não-tratadas) ou Triton x-100 (0,2% - 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 200µL da solução de MTT 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 150µL 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.

3.2.5 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0 (USA). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e a comparação entre as médias foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

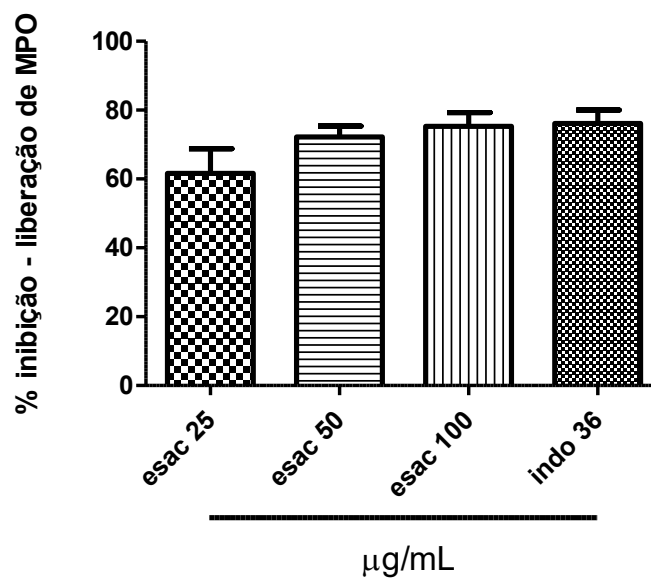
4.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória do ESAC e da FFAC em neutrófilos humano: desgranulação induzida por PMA mensurada pela enzima mieloperoxidase (MPO)

Os efeitos do ESAC e da FFAC sobre a desgranulação dos neutrófilos estão representados nas **Figuras 9 e 10**, respectivamente. O ESAC (25, 50 e 100 µg/mL) inibiu a liberação de MPO induzida por PMA em até 75.26% enquanto que a indometacina (36 µg/mL), droga padrão, inibiu em 76.12%. A FFAC (12.5, 25, 50 e 100 µg/mL) reduziu a liberação de MPO induzida pela desgranulação dos neutrófilos em até 89.88%, enquanto que o a droga padrão inibiu em 70.45%.

4.2. Efeito do ESAC e da FFAC sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos mensurado por quimioluminescência

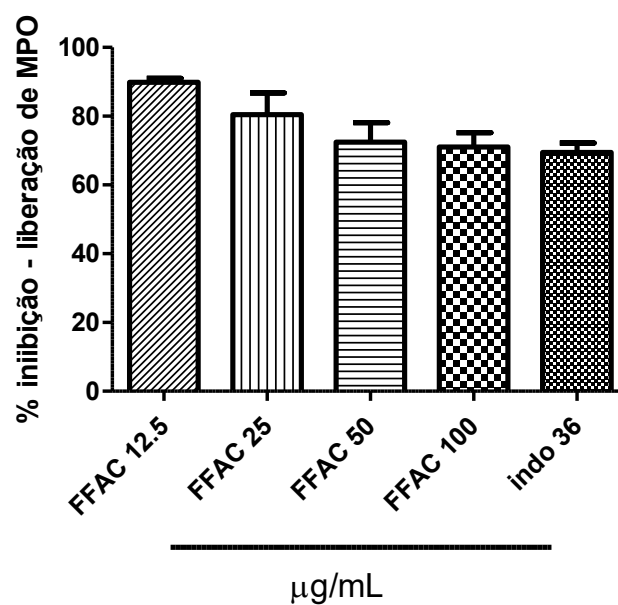
Para avaliar a atividade antioxidante do ESAC e FFAC foram realizados ensaios de quimioluminescência. Os neutrófilos foram ativados por PMA e foi utilizado como sonda o luminol (QL lum). Pode-se observar que a adição de ESAC em concentrações crescentes à suspensão de células reduziu a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) de forma dependente da concentração em até 54.81%, enquanto que o padrão antioxidante utilizado reduziu a produção de EROS em 75.29% (**Figura 11 e 12**). A FFAC também apresentou redução na produção de EROS de forma dependente da concentração e induziu uma redução de até 63.17%, podendo ser comparado com a quercetina que obteve uma inibição de 68.39% (**Figura 13 e 14**).

Figura 9 - Efeito do ESAC sobre a desgranulação de neutrófilos induzidos por PMA determinado pela inibição da liberação de MPO



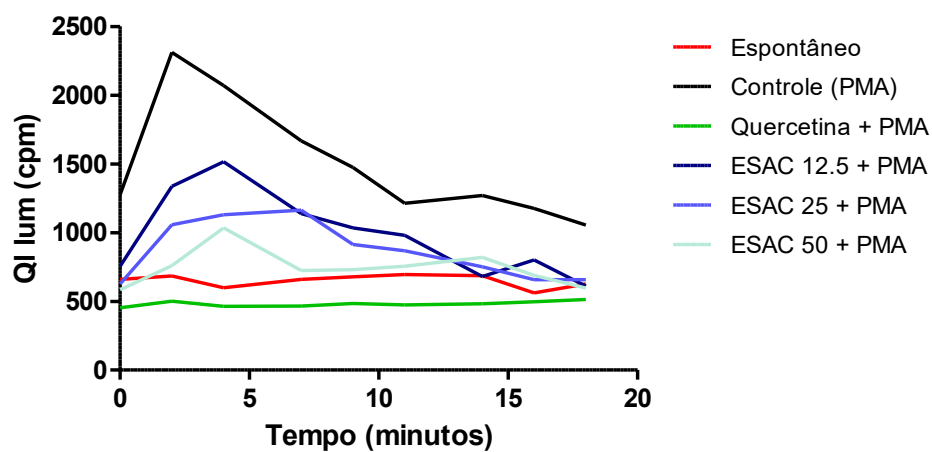
Neutrófilos foram incubados com ESAC (25, 50 e 100 µg/mL) e posteriormente incubados com PMA (0,1µm/mL). INDO: Indometacina, droga padrão. No cálculo do percentual de inibição da liberação de MPO foi considerado o grupo controle 100% de liberação de MPO. Os resultados estão sendo expressos como média ± E.P.M.

Figura 10 - Efeito da FFAC sobre a desgranulação de neutrófilos induzidos por PMA determinado pela inibição da liberação de MPO



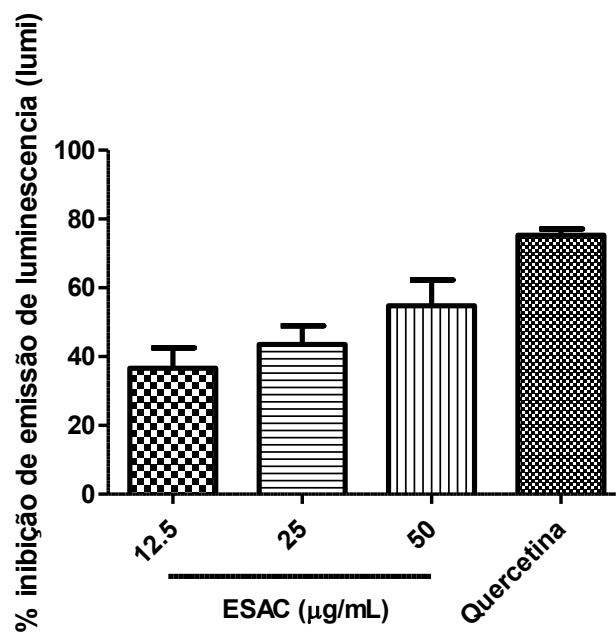
Neutrófilos foram incubados com FFRC (12.5, 25, 50 e 100 µg/mL) e posteriormente incubados com PMA (0,1µm/mL). INDO: Indometacina, droga padrão. No cálculo do percentual de inibição da liberação de MPO foi considerado o grupo controle 100% de liberação de MPO. Os resultados estão sendo expressos como média ± E.P.M.

Figura 11 - Perfil de quimioluminescência induzida por PMA em neutrófilos na ausência e na presença de ESAC



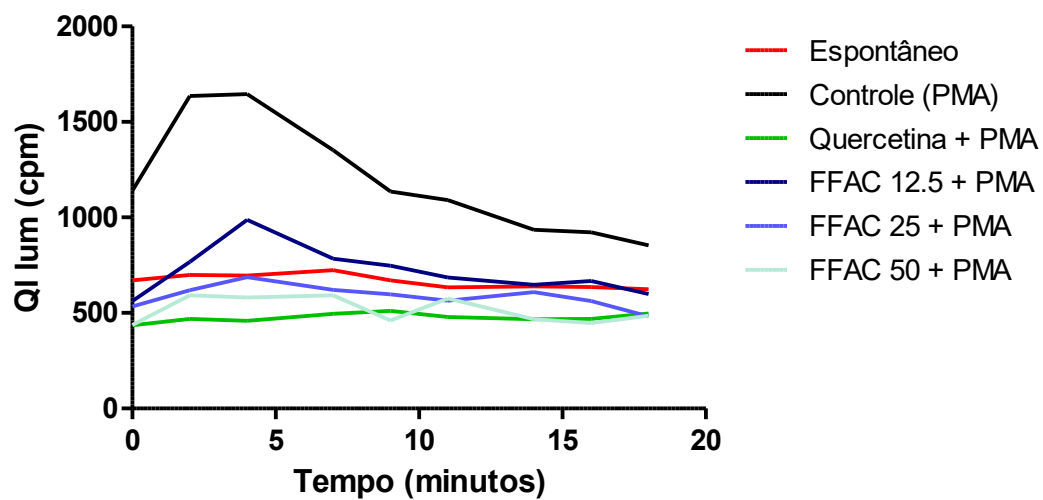
A QI está expressa em contagem de fótons por minuto (cpm). Neutrófilos foram incubados com ESAC (12.5, 25 e 50 µg/mL) e posteriormente incubados com PMA (0,1µm/mL). Espontâneo: células não estimuladas. Controle: DMSO – veículo.

Figura 12 - Efeito do ESAC sobre a produção de quimioluminescência dependente de luminol (QL lum) em neutrófilos ativados com PMA



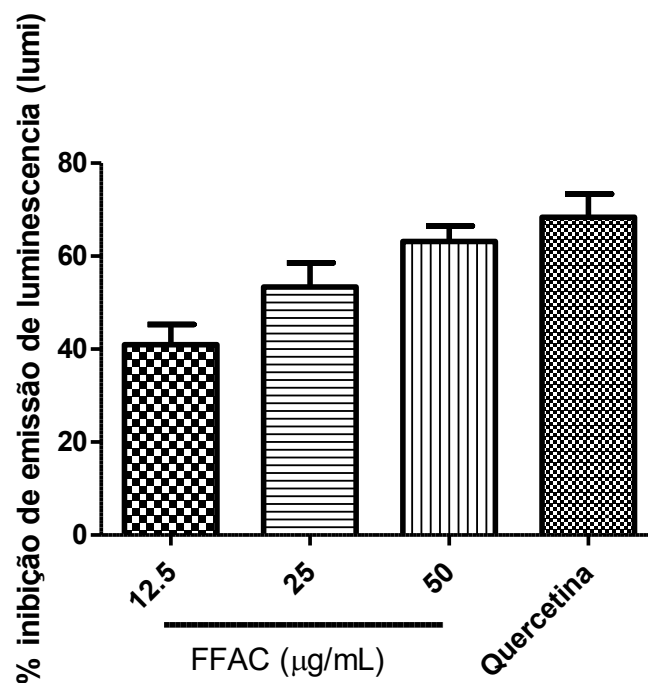
Neutrófilos foram incubados com ESAC (12.5, 25 e 50 µg/mL) e posteriormente incubados com PMA (0,1µm/mL). Espontâneo: células não estimuladas. Controle: DMSO – veículo. Os resultados estão sendo expressos como média ± E.P.M. (p < 0,05 – ANOVA e Teste de Tukey).

Figura 13 - Perfil de quimioluminescência induzida por PMA em neutrófilos na ausência e na presença de FFAC



A QI está expressa em contagem de fótons por minuto (cpm). Neutrófilos foram incubados com FFAC (12.5, 25 e 50 µg/mL) e posteriormente incubados com PMA (0,1µm/mL). Espontâneo: células não estimuladas. Controle: DMSO – veículo.

Figura 14 - Efeito do ESAC sobre a produção de quimioluminescência dependente de luminol (QL lum) de neutrófilos ativados com PMA



Neutrófilos foram incubados com FFAC (12.5, 25 e 50 µg/mL) e posteriormente incubados com PMA (0,1µm/mL). Espontâneo: células não estimuladas. Controle: DMSO – veículo. Os resultados estão sendo expressos como média ± E.P.M. ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

4.3. Avaliação da citotoxicidade do ESAC e da FFAC em neutrófilos humano

- **Efeito do ESAC e FFAC sobre a mensuração da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH)**

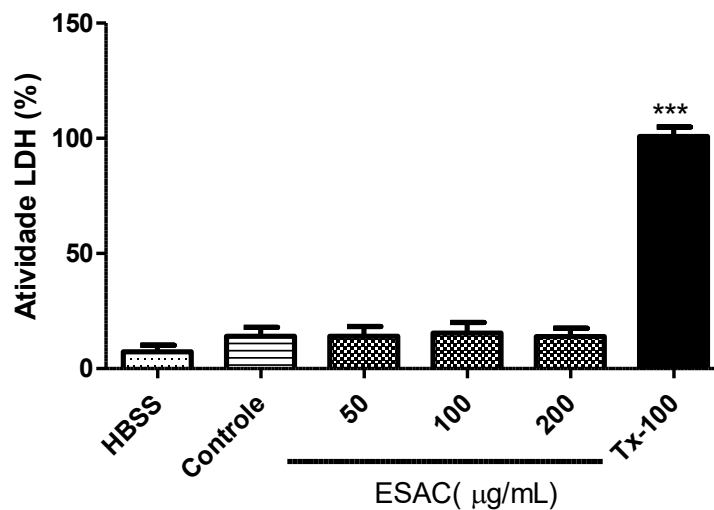
A toxicidade do ESAC e da FFAC sobre neutrófilos humanos foi mensurada pela determinação da atividade da enzima LDH e está apresentada nas **Figuras 15 e 16**, respectivamente. Observou-se que o veículo (DMSO) não apresentou alterações na viabilidade dos neutrófilos em relação ao grupo não tratado (hanks) e a adição de ESAC às células não causou aumento significativo da atividade de LDH em nenhuma das concentrações utilizadas, nem mesmo nas mais elevadas – 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ (15.43 ± 4.59 e $13.89 \pm 3.68\%$, respectivamente) quando comparada ao controle ($14.09 \pm 3.83\%$). No entanto, o Triton X-100, padrão citotóxico, aumentou em $100.8 \pm 4.14\%$ a atividade de LDH em relação ao grupo controle.

Da mesma forma, a adição de FFAC também não causou aumento significativo à atividade de LDH em nenhuma concentração (50 $\mu\text{g/mL}$: 5.57 ± 1.41 ; 100 $\mu\text{g/mL}$: 6.94 ± 1.77 ; 200 $\mu\text{g/mL}$: $13,35 \pm 3.76\%$) quando comparada ao controle ($6.06 \pm 1.05\%$). Contudo, o Triton X-100, padrão citotóxico, aumentou a atividade enzimática em $100 \pm 2.24\%$.

- **Efeito do ESAC e da FFAC sobre a avaliação da citotoxicidade mensurada através do teste do MTT**

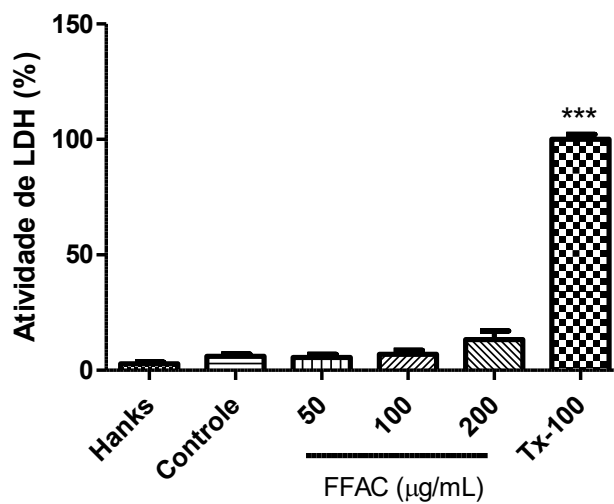
A toxicidade do ESAC e da FFAC sobre o metabolismo celular de neutrófilos humanos está representada nas **figuras 17 e 18**. Neutrófilos incubados com ESAC (50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) não apresentaram nenhuma alteração da viabilidade celular (50 $\mu\text{g/mL}$: 104 ± 3.6 ; 100 $\mu\text{g/mL}$: 93.04 ± 5.24 ; 200 $\mu\text{g/mL}$: 104.8 ± 9.9) quando comparados ao controle (111.9 ± 2.4). Entretanto o Triton X-100 (padrão citotóxico) apresentou uma redução da viabilidade celular de 16.81 ± 1.01 . A FFAC também não causou redução significativa da viabilidade celular em nenhuma das concentrações avaliadas (50 $\mu\text{g/mL}$: 114.5 ± 3.9 ; 100 $\mu\text{g/mL}$: 120.0 ± 4.2 ; 200 $\mu\text{g/mL}$: 123.5 ± 2.7), quando comparada ao controle (111.9 ± 2.4).

Figura 15 - Avaliação da toxicidade do ESAC em neutrófilos humanos através da mensuração da atividade de lactato desidrogenase (LDH)



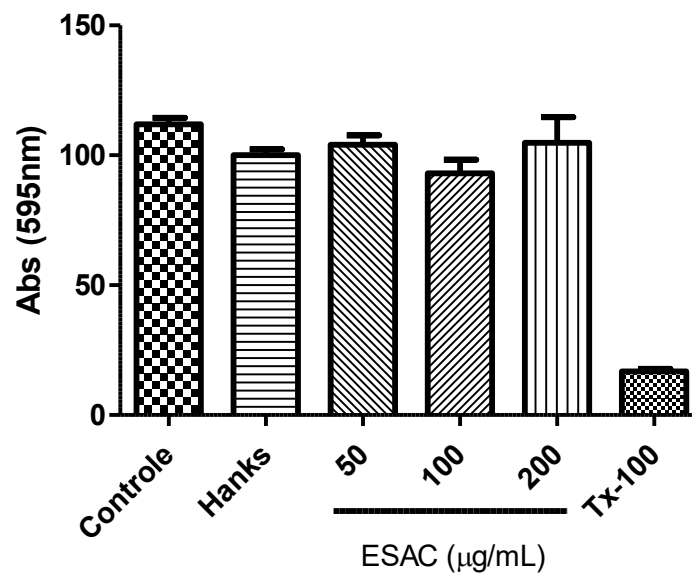
Neutrófilos foram incubadas com ESAC (50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) e após 15 minutos foi determinada a atividade da enzima LDH. Grupo não tratado: Hanks; Controle: DMSO - veículo; Padrão citotóxico: Triton X-100. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. * vs Controle ($p < 0.05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

Figura 16 - Avaliação da toxicidade da FFAC em neutrófilos humanos através da mensuração da atividade de lactato desidrogenase (LDH)



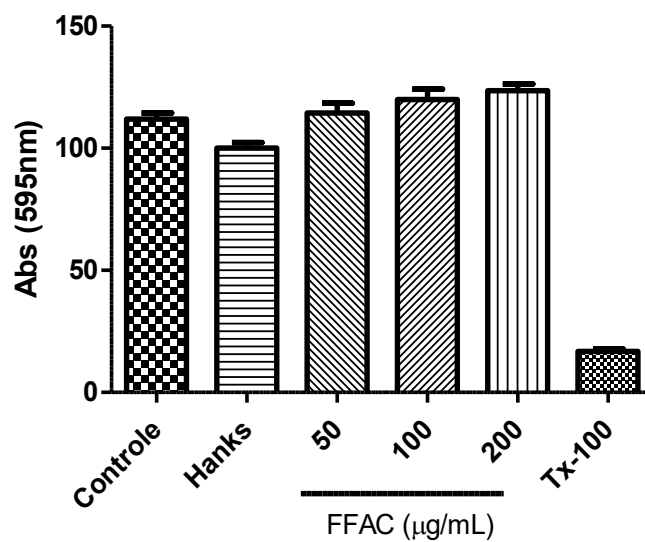
Neutrófilos foram incubadas com FFAC (50, 100 e 200 µg/mL) e após 15 minutos foi determinada a atividade da enzima LDH. Grupo não tratado: Hanks; Controle: DMSO - veículo; Padrão citotóxico: Triton X-100. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. * vs Controle ($p < 0.05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

Figura 17 – Avaliação da citotoxicidade do ESAC em neutrófilos humano determinado através do teste do MTT



Neutrófilos foram incubados com a ESAC (50, 100 e 200 µg/mL) e 3 horas depois foi avaliada a viabilidade celular através do teste do MTT. Grupo não tratado: Hanks; Controle: DMSO – veículo; Padrão citotóxico: Triton X-100. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. * vs Controle ($p < 0.05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

Figura 18 - Avaliação da citotoxicidade da FFAC em neutrófilos humano determinado através do teste do MTT



Neutrófilos foram incubados com a FFAC (50, 100 e 200 µg/mL) e 3 horas depois foi avaliada a viabilidade celular através do teste do MTT. Grupo não tratado: Hanks; Controle: DMSO – veículo; Padrão citotóxico: Triton X-100. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. * vs Controle ($p < 0.05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o potencial anti-inflamatório e antioxidante do extrato seco padronizado e da fração fenólica de *Amburana cearensis* em neutrófilos humano, avaliando os possíveis efeitos desses produtos derivados sobre os mecanismos pro-inflamatórios dos neutrófilos.

A resposta inflamatória é um mecanismo de defesa do organismo, contudo quando deflagrada de maneira inapropriada compõem a fisiopatologia de inúmeras doenças, incluindo diabetes, artrite reumatoide, doenças neurodegenerativas e asma (LIMA *et al.*, 2007; SILVA, 2011; NATHAN, 2002). Na, inflamação, a migração e ativação de leucócitos, particularmente neutrófilos, são consideradas um dos principais mecanismos da inflamação aguda, que pode tornar-se crônica (NATHAN, 2006).

O mecanismo de inflamação aguda envolve primariamente, dentre outros aspectos, a lesão de células endoteliais induzida por mediadores incluindo oxidantes, como o ânion superóxido e mieloperoxidase liberados por neutrófilos, que culminam com a secreção de mais mediadores, além de várias citocinas (LEES *et al.*, 2004; CRUVINEL, 2010). Dessa forma, a modulação da liberação do conteúdo celular de neutrófilos, é estratégico para o controle/tratamento da inflamação aguda.

No presente estudo o ESAC e a FFAC inibiram a secreção de mieloperoxidase induzida por PMA em neutrófilos humano. O PMA (forbol-miristato-acetato), 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 desgranulação dos neutrófilos (FAURSCHOU, 2003). Assim, tanto o ESAC quanto a FRAC parecem modular uma ou mais etapas relacionadas a ativação dos neutrófilos por PMA. Esse resultado foi corroborado por estudo anterior (LOPES, 2010) do nosso laboratório, que também mostrou a habilidade do extrato seco de *A. cearensis* de inibir mesmo em menor extensão a liberação de MPO por neutrófilos; muito embora esse extrato (ARARUNA *et al.*, 2008) possua um teor de CM (12.4 ± 0.29 mg/g) e AMB (48.2 ± 0.8 mg/g) inferior em relação ao extrato otimizado empregado no presente estudo (CM: 26.2 ± 0.31 mg/g; AMB 74.5 ± 1.08 mg/g). Esses dados corroboram a hipótese de que não apenas a CM e

AMB são responsáveis pelo efeito anti-inflamatório do cumaru, e que outros constituintes químicos da planta contribuem com esse efeito.

Inúmeros estudos têm mostrado o potencial anti-inflamatório e antioxidante de compostos fenólicos, incluindo flavonoides e taninos. Assim, o efeito anti-inflamatório da fração fenólica de *A. cearensis* era esperada pois esta possui como composto majoritário o amburosídeo A, que possui determinado seu potencial anti-inflamatório *in vivo* e *in vitro*.

Estudo anterior (LEAL *et al.*, 2008) realizado pelo nosso laboratório demonstrou a atividade anti-inflamatória do amburosídeo A e do isocampferídeo (flavonol) no modelo de edema de pata induzido por carragenina, prostaglandina E₂, histamina ou serotonina em ratos. Foi observado que parte desse efeito parece estar relacionado a inibição da migração de neutrófilos para o foco inflamatório, além de inibição da ativação dessas células por PMA ou fMLP, observada pela redução na liberação de MPO e TNF- α .

Considerando o protocolo experimental empregado no presente estudo, o efeito inibitório do ESAC e da FFAC sobre a desgranulação de neutrófilos mensurada pela liberação de MPO, pode estar relacionado a uma ação sobre uma ou mais vias de sinalização celular (ex.: PKC e nível de Ca²⁺) e/ou uma ação direta sobre a enzima mieloperoxidase (MPO). Para avaliar, essas hipóteses estudos adicionais seriam necessários, mensurando por exemplo, a concentração de cálcio intracelular e a ação direta sobre a enzima MPO.

MPO é uma protease secretada pelos leucócitos durante o processo inflamatório. É uma hemoproteína contituente dos grânulos azurófilos dos neutrófilos e está geralmente associada com morte bacteriana, desempenhando um papel central na inflamação ao reagir com H₂O₂, formando ácido hipocloroso (HOCl), um forte agente microbicida, além de radicais livres e substâncias oxidantes, que podem provocar lesões oxidativas nos tecidos (ROMAN *et al.* 2007).

Durante a fagocitose, os neutrófilos ativados geram grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) desencadeado principalmente pela ativação do sistema NADPH oxidase, processo conhecido por “burst” oxidativo, ou explosão oxidativa (KITAGAWA, 2003). Esse processo gera diversas espécies reativas de oxigênio por mecanismo dependentes ou independentes de MPO e esses radicais gerados possuem ação oxidante sobre diversas estruturas e compostos celulares do

hospedeiro (MACHADO, 1997; ROMAN 2007). Em situações normais o organismo possui mecanismos para neutralizar esses oxidantes, evitando assim que estas possam causar agressões aos tecidos. Porém em condições de excesso de agentes oxidantes ou deficiência do sistema protetor, há um desequilíbrio desse mecanismo, caracterizando o estresse oxidativo (FERREIRA, 1997).

A produção de oxidantes por neutrófilos pode ser experimentalmente induzida por diversos estímulos, como o PMA – agente indutor de tumores, fMLP – peptídeo quimiotático e ácido araquidônico (MARASCO *et al.*, 1984; THELEN *et al.*, 1993). Desde a descoberta que durante processo de fagocitose os neutrófilos emitem luz, a técnica de quimioluminescência tem sido amplamente empregada para medir a produção de oxidantes. Porém, para isso é necessário o emprego de sondas quimioluminescentes, as quais são oxidadas pelos oxidantes amplificando assim a quantidade de luz detectável. Dentre as sondas empregadas, está o luminol. Durante a QL dependente de luminol é mensurada a produção de todos os radicais intra e extracelulares com sensibilidade variada, em particular àqueles do sistema MPO (KOPPRASCH *et al.*, 2003; DAHLGREN & STENDAHL, 1983; ANIANSSON *et al.*, 1984; O'DOWD *et al.*, 2004).

No presente estudo tanto o ESAC quanto a FFAC foram capazes de reduzir em até 54.81 e 63.17 %, respectivamente, a produção de oxidantes mensurada por QL Lum. Esse resultado ratifica o efeito desses produtos derivados sobre a desgranulação de neutrófilos, estando assim pelo menos parte desse efeito relacionado a uma redução na produção de oxidantes com a participação da mieloperoxidase.

Possivelmente o efeito antioxidante do ESAC e FFAC está relacionado não só a presença de cumarina e amburosídio A na planta, afinal estudos anteriores mostraram o potencial antioxidante de outros fenóis presentes na planta, como a isoflavona afromosina, o flavonol isocampferídio e biflavonóides, que à semelhança do ESAC e da FFAC também inibiram a desgranulação e/ou o burst respiratório de neutrófilos induzidos por fMLP e/ou PMA (LOPES, 2010; LEAL, 2006). Corroborando o potencial antioxidante dos compostos fenólicos, Figueiredo (2010) demonstrou o potencial modulador do extrato de *Bachhharis dracunculifolia*, rico em fenóis, sobre o aumento do metabolismo oxidativo de neutrófilos humano induzido por zimosan. Paracatu (2012) também demonstrou o efeito modulador do ácido ceféico, um

importante composto fenólico, e de seus derivados sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos ativados por *Helicobacter pylori* ou zymozan.

A modulação dos mecanismos pró-inflamatórios dos neutrófilos humano por ESAC e FFAC, como a desgranulação e o “burst” respiratório especialmente via sistema MPO, 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.

Prosseguindo os estudos, foi investigado se parte do efeito do ESAC e da FFAC sobre os neutrófilos humano, não estaria relacionada a um possível ação citotóxica, ao invés de anti-inflamatória. Para tanto, foram investigados os efeitos destes produtos sobre a viabilidade celular através do teste do MTT e da medida da atividade da lactato desidrogenase.

Em geral os testes *in vitro* não são capazes de satisfazer completamente todos os requisitos para comprovar a ação tóxica de um novo fármaco, afinal estes ensaios não consideram os efeitos integrados que ocorrem no organismo como um todo, bem como o efeito da biotransformação de compostos (SLABBERT e VENDER, 1999). Por outro lado, é importante ressaltar que o uso de sistemas *in vitro* permite uma maior eficácia no controle das condições do ensaio, diminui a variabilidade entre as experiências, produz menor quantidade de resíduos tóxicos e geralmente proporciona a obtenção mais rápida de resultados, além de contribuir para a elucidação do mecanismo de ação (BAKSI e FRAZIER, 1990).

A enzima LDH é um tetrâmero de quatro subunidades com quatro locais de ligação independentes (GUPTA; GOAD; KADEL, 1991). A mesma é citosólica e por isso seus níveis no soro são normalmente baixos. No entanto, quando ocorrem lesões nos tecidos, pode ocorrer um aumento desta enzima no meio extracelular (KABEYA, 2002; PEAKALL, 1992). No que diz respeito ao ensaio da LDH, este é capaz de verificar se o extrato ou a molécula é capaz de alterar a permeabilidade da membrana celular. Quanto ao ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio) idealizado por Mosman (1983), este avalia o possível efeito de um novo fármaco sobre o metabolismo celular, particularmente relacionado à atividade das desidrogenases mitocondriais. Em células viáveis, o sal de tetrazólio de cor amarela é reduzido principalmente por enzimas mitocondriais - a um sal de formazan, de cor roxa,

sendo portanto a intensidade desta cor proporcional a atividade metabólica da célula (VERMA *et al.*, 2010). Esse método tem sido amplamente utilizado na avaliação da citotoxicidade, sejam em células de mamíferos ou de protozoários, como promastigotas e amastigotas do gênero *Leishmania* (SERENO & LEMESRE, 1997).

No presente estudo a adição de ESAC ou FFAC à suspensão de neutrófilos humano não aumentou significativamente o nível de atividade da LDH no meio, assim como não reduziu a viabilidade das células determinadas através do teste do MTT. Esse resultado foi interessante, considerando que o ESAC avaliado no presente estudo possui um maior teor de cumarina e de amburosídio em relação ao extrato anterior (ARARUNA, 2008). Portanto, a otimização do extrato atual, agregou vantagens tecnológicas ao produto, mantendo o mesmo grau de segurança em relação ao extrato anterior (LOPES, 2010) para os modelos experimentais de citotoxicidade investigados – atividade LDH e teste MTT. Esse resultado superou as expectativas, afinal estudo realizado por LOPEZ-GONZALEZ *et al.* (2004) mostrou o efeito antiproliferativo da cumarina (marcador ativo do ESAC) em linhagem de células tumorais (NSCLC), por indução da apoptose não associada com a fragmentação do DNA. Contudo, estudos adicionais relacionados a avaliação da toxicidade de ESAC envolvendo outros mecanismos, estão previstos.

A ausência de citotoxicidade da fração fenólica de *A. cearensis* foi corroborada por estudos anteriores que mostraram a ausência de citotoxicidade de alguns fenóis presentes na planta como o amburosídio A (glucosídeo fenólico) e a afrormosina (isoflavona). Por outro lado, um outro composto fenólico do cumaru, o isocampferídio (flavonol) na concentração de 100 µg/mL, reduziu significativamente a viabilidade de hepatócitos de ratos determinada através do teste do MTT (LEAL, 2006), e mostrou ação antiproliferativa em algumas linhagens de células tumorais (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2003; BANSKOTA *et al.*, 2000). Assim, a ausência de citotoxicidade da FFAC é possivelmente um resultado de uma ação sinérgica dos compostos fenólicos presentes, que impediram a expressão de citotoxicidade de outro(s).

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo com o ESAC (extrato seco de *Amburana cearensis* - cumaru) e a FFAC (fração fenólica de *A. cearensis*) obtidos da casca do caule de *Amburana cearensis*, nos permitiram as seguintes conclusões podemos:

- O ESAC e a FFAC mostraram atividade anti-inflamatória por modularem um dos mecanismos pró-inflamatório de neutrófilos humano, em particular a desgranulação induzida por PMA, mensurada pela atividade da mieloperoxidase;
- O ESAC e a FFAC mostraram efeito antioxidante ao inibirem a produção de oxidantes, em especial àqueles produzidos pelo sistema mieloperoxidase;
- O ESAC e a FFAC não interferem na viabilidade de neutrófilos humano, não afetando possivelmente a membrana plasmática e o metabolismo celular;

A comprovação do potencial anti-inflamatório e antioxidante do ESAC padronizado (marcadores: cumarina e amburosídeo A), com ausência de citotoxicidade, é relevante considerando agregação destas propriedades às vantagens tecnológicas desse novo extrato, a ser empregado na formulação de um fitoterápico útil no tratamento de doenças inflamatórias, como a asma. Além disso, a determinação das atividades anti-inflamatória e antioxidante da FFAC, abre possibilidade do emprego desse novo insumo farmacêutico ativo, afinal a FFAC mostrou um efeito anti-inflamatório comparável à indometacina (anti-inflamatório não esteroide). Além disso, os resultados obtidos ratificam a importância de se incluir no controle de qualidade de produtos derivados do cumaru, também a determinação do teor de fenóis totais, além da cumarina e do amburosídeo.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, R.C.; LOOSE, L.D. Phagocytosis activation of a luminol-dependent chemoluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 69, p. 245-252, 1976.
- ANIANSOON, H. *et al.* Comparison between luminol- and lucigenin-dependent chemoluminescence of polymorphonuclear leukocytes. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 92, . 357-961, 1984.
- ARARUNA, S.M. **Desenvolvimento e padronização (HPLC-DAD) do extrato seco por spray dryer de *Amburana cearensis* A. C. Smith (cumaru)**. 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.
- ARNHOLD, J. Free radicals-friends or foes. Properties, functions and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 69, p. 4-9, 2004.
- ARNHOLD, J; BENARDS, S; KILIAN, U; REICHI, S; SCHILLER, J; ARNOLD, K. Modulation of luminol chemiluminescence of fMet-Leu-Phe stimulated neutrophils by affecting dephosphorylation and the metabolism of phosphatidic acid. **Luminescence, Chichester**, v. 14, p. 129 -137, 1999.
- BANSKOTA, A. H; TEZUKA, T; ADYANA, I. K; MIDORIKAWA, K; ATSUSHIGE, K; MESSAGE, D; HUERTAS, A. G. A; KADOTA, S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 239-246.
- 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.
- BASKI, S.M., FRAZIER, J.M. Isolated fish hepatocytes – model systems for toxicology research. **Aquat Toxicol**, v. 16, p. 229-256, 1990.
- BRAVO, B.; SAUVAIN, M. Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 71-74, 1999.

BROWN, G.E.; STEWART, M.Q.; LIU, H.; HA, V.I.; YAFFLE, M.B. A novel assay system implicates PtdIns (3,4) P (2), PtdIns (3) P, and PKC delta in intracellular production of reactive oxygen species by the NADPH oxidase. **Mol Cell**, v. 11, p. 35-47, 2003.

CALIXTO, J. B. *et al.* Biological activity of plant extracts: novem analgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**, v. 2, p. 261 – 279, 2001.

CANDEIAS, L.P., PATEL, K.B., STRATFORD, M.R.L., WARDMAN, P. Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species superoxide anion and hypochlorous acid. **FEBS Letters**, v. 333, p. 151-153, 1993.

CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R. Chemical constituents of trunk bark of *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Química Nova**, v. 29, p. 1-3. 2006.

CANUTO, K.M. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste: Herisantiatiubae (K. Schumann) Briz e Amburana cearensis (fr. Allem.) A. C. Sm.** 123 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Federal do Ceará, 2002.

CANUTO, K.M. *et al.* **Uso de plantas jovens de Amburana cearensis A. C. Smith: alternative para a preservação e exploração econômica da espécie.** Petrolina – PE: Embrapa Semi-árido, 2008. Documentos online.

CANUTO, K.M.; LEAL, L.K.A.M.; VIANA, G.S.B.; BEZERRA, A.M.E.; SILVEIRA, E. R. Aspectos químicos do estudo interdisciplinar (química, agronomia e farmacologia) de *A. cearensis*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 18, 2004, Manaus, AM, **Anais**...Manaus, AM, 2004.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p.314-319, 2008.

CAVALCANTE, A.G.M., BRUIN, P.F.C. O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas. **J. Bras. Pneumol.** v. 35, p. 1227-1237, 2009.

COSTA-LOTUFO, L.V.; JIMENEZ, P.C.; WILKE, D.V. et al., Antiproliferative effects of several compounds isolated from *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Z Naturforsch C**, v. 58, p. 675-80, 2003.

COTRAN, R. S, KUMAR, V., COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000.

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.

DENIS, J.N., *et al.* A highly eficiente, practical approach to natural taxol. **Journal of The American Chemical Society**, v. 110, p. 919-917, 1988.

FAURSCHOU, M; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infections**, v. 05, p. 1317 – 27, 2003.

FIGUEIREDO, A.S.G. **Efeito da sazonalidade no perfil químico e na atividade antioxidante de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) ne ação modulatória desta planta sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos.** 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

FILHO, V.C.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p 99 – 105, 1998.

FORZZA, R.C. *et al.*, New Brazilian floristic list highlights conservation challenges. **Bioscience**, v. 62, p. 39 – 45, 2012.

FRANCISCHETTI, I.; MORENO, J.B; SCHOLZ, M.; YOSHIDA, W.B. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperusão. **Revista brasileira cirurgia cardiovascular**, v. 25, p. 575 – 584, 2010.

GUYTON, K.Z.; LIU, Y.; GOROSPE, M.; XU, Q.; HOLBROOK, N.J. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. **J Biol Chem**, v. 271, p. 4138-42, 1996.

HEINECK, J.W. *et al.* Cholesterol chlorohydrins synthesis by the myeloperoxidase-hydrogen peroxidase-chloride system: potential markers for lipoproteins oxidatively damage by phagocytes. **Biochemistry**, v. 33, p. 10127-36, 1994.

KITAGAWA, R.R.; RADDI, M.S.G.; KHALIL, N.M.; VILEGAS, W.; FONSECA, L.M. Effects of the isocoumarin paepalantine on the luminol and lucigenin amplified chemoluminescence of rat neutrophils. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p. 905-908, 2003.

KLEBANOFF, S. J.; Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, p. 598-625, 2005.

KOPPRASCH, S; PIETZCH, J.; GRAESSLER, J. Validation of different chemiluminescent substrates for detecting extracellular generation of reactive species by phagocytes and endothelial cells. **Luminescence**, v. 18, p. 268-73, 2003.

KUDOH, S; KATSUHIKO, S; YAMADA, M; LUI, Q; NAKAJI, S; SUGAWARA, K. Contribution of nitric oxide synthase to human neutrophil chemoluminescence. **Luminescence**, v.14, p. 335-39, 1999.

LEAL, L. K . A. M; NOBRE-JÚNIOR, H. V.; CUNHA, G. M. A; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; OLIVEIRA, R. A.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; VIANA, G. S. B.; Amburoside A, a glucoside from *Amburana cearensis* protects mesencephalic cells

against 6-hydroxidopamine-induced neurotoxicity. **Neuroscience Letters**, v. 388, p. 86–90, 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. 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. 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. 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. Toxicological study of the hydroalcoholic extract from *Amburana cearensis* in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, p. 308-314, 2003b.

LEES, P., LANDONI, M.F., GIRAUDEL, J., TOUTAIN, P.L. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. **J Vet Pharmacol Therap**, v.27, p.479-490, 2004.

LEITINGER, N.; TYNER, T.R.; OSLUND, L.; RIZZA, C.; SUBBANAGONDER, G.; LEE, H. Structurally similar oxidized phospholipids differentially regulate endothelial binding of monocytes and neutrophils. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, p. 12010-15, 1999.

LETO, T.L.; MORAND, S; HURT, D.; UEYAMA, T. Targeting and regulation of reactive oxygen species generation by Nox family NADPH oxidases. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, p. 2607-619, 2009.

LIMA, R.R.; COSTA, A.M.R.; DE SOUZA, R.D.; LEAL, W.G. Inflamação em doenças neurodegenerativas. **Revista Paraense de Medicina**, v. 21, p. 29 – 34, Belém, 2007.

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.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: instituto Plantarum, 2008.

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

MACHADO, C.M.M; VALIM, Y.L. Clearance de imunocomplexos: papel do complemento e dos polimorfonucleares neutrófilos. **Medicina**, v. 30, p. 234 – 242, Ribeirão Preto, 1997.

MARASCO, W.A. et al., Purification and isolation of formylmethionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 5430-439, 1984.

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais - guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2000.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A. **Medical plants of Brazil**. Alagonac, Michigan: Reference publications, 2000.

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.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v.420, p.846-852, 2002.

NATHAN C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 173–82. 2006.

O'DOWD, Y. *et al.* Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils. **Biochem Pharmacol**, v. 68, p. 2003-08, 2004.

OLIVEIRA, K.B.; OLIVEIRA, B.H. Obtenção de substâncias bioativas através da biotransformação de produtos naturais. **Revista eletrônica de Farmácia**. v. IX. P. 89-99, 2012. Disponível em:
<http://h200137217135.ufg.br/index.php/REF/article/viewFile/17777/10636>

PARACATU, L.C. **Ácido caféico e seus ésteres: inibição do “burst” oxidativo de neutrófilos e efeito anti-*Helicobacter pylori***. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia). Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

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: 05 jun. 2015.

RAHMAN, I.; MACNEE, W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. **Eur Respir J**, v. 16, p. 534-54, 2000.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603 -13, 2001.

ROMAN, R.M.; WENDLAND, A. E.; POLANCZYK, C. A. Mieloperoxidase e doença arterial coronariana: da pesquisa à prática clínica. **Arq. Bras. Cardiol**, v. 91, n 1, p. 12-19, 2007.

SCHIEVENL, 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.

SELVATICI, R.; FALZARANO, S.; MOLLICA, A.; SPISANI, S. Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. **European Journal of Pharmacology**, v. 534, p. 01-11, 2006.

SERGEANT, S.; McPHAIL, L.C. Opsonized zymosan stimulates the redistribution of protein kinase C isoforms in human neutrophils. **J Immunol**, v. 159, p. 2877-85, 1995.

SILVA, F.O.C; MACEDO, D.V. Exercício físico, processo inflamatório e adaptação: uma visão geral. **Rev Bras Cineantropon Desempenho Humano**, v. 13, p. 320 – 328, 2011.

SLABBERT, J.L., VENTER, E.A. Biological assays for aquatic toxicity testing. **Water Science and Technology**, v. 39, p. 367-373, 1999.

SOUSA, M.P., MATOS, M.E.O., MATOS, F.J.A. **Constituintes químicos de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza, CE: Impr. Universitária/UFC, 1991.

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

TUDO-BOM, A., PINTO, A.M. Fisiopatologia da asma grave. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 29, p.113-116, 2006.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M .L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto Contexto Enfermagem**, 2006.

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

VAN DYKE, K.; CASTRANOVA, V. Cellular chemiluminescence. **Boca Raton**, v1, p. 162-192. 1987.

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.

WEISS, S.J.; PEPPIN, G.; ORTIZ, X.; RAGSDALE, C.; TEST, S.T. Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils. **Science**, v. 227, p. 7449, 1985.

YEH, M.; LEITINGER, N.; DE, M.R.; ONAI, N.; MATSUSHIMA, K.; VORA, D. K. Increase transcription of IL-8 in endothelial is differentially regulated by TNF-alpha and oxidized phospholipids. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, p. 1585-1591, 2001.

ZUANAZZI, J.A.S; MAYORGA, P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. **Química Nova**, v. 33, p. 1421 – 1428, 2010.