



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DAS
CÁPSULAS DO EXTRATO SECO PADRONIZADO E DA AFRORMOSINA,
ISOFLAVONÓIDE, OBTIDOS DE *Amburana cearensis* A C SMITH**

AMANDA DE ARAÚJO LOPES

FORTALEZA

2010

AMANDA DE ARAÚJO LOPES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DAS
CÁPSULAS DO EXTRATO SECO PADRONIZADO E DA AFRORMOSINA,
ISOFLAVONÓIDE, OBTIDOS DE *Amburana cearensis* A C SMITH

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luzia Kalyne Almeida
Moreira Leal

Fortaleza

2010

AMANDA DE ARAÚJO LOPES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DAS
CÁPSULAS DO EXTRATO SECO E DA AFRORMOSINA, ISOFLAVONÓIDE,
OBTIDOS DE *Amburana cearensis* A C SMITH

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Farmacologia.

Aprovada em 29/11/2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal (orientadora)

Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof^ª. Dr^ª. Flávia Almeida Santos

Universidade Federal do Ceará - UFC

Dr. Hemerson Yuri Ferreira Magalhães

Universidade Federal do Ceará - UFC

**Dedico este trabalho àqueles
que depositaram confiança e
esperanças em mim.**

**“Por mais longa que seja a caminhada,
o importante é dar o primeiro passo.”**

Vinícius de Moraes

AGRADECIMENTOS

À DEUS POR TUDO.

À **Família** pelo alicerce contruído e valores ensinados.

Ao **Hálisson**, pelos sete anos de companheirismo não só na vida pessoal, como nos experimentos realizados nos sábados, domingos, carnaval, Natal, ano-novo e outros feriados, além do apoio e presença essencial durante essa caminhada, T.A.

À **Profa. Kalyne Leal**, pelo incentivo, orientação e por acreditar em meu potencial.

À **Dra. Glauce Viana**, pela orientação durante a iniciação científica e início de mestrado, mesmo sem saber quem eu era a princípio.

Aos **amigos**, sejam aqueles feitos durante a graduação e que ainda permanecem (César, Mara, Vanessa, Camila, Helayne, Nayana, Taiana, Noé e Gilberto) além daqueles conquistados durante o mestrado (Patrícia, Valden, Julianny, Rafaelly, André, Lus...) pelos momentos de descontração necessários!

À **Silésia Leal**, pelos ensinamentos dados e conversas reconfortantes.

À **Profa. Yara Lucisano-Valim**, pela acolhida, atenção e por permitir a realização de parte de meus experimentos juntamente com o auxílio de **Ana Elisa Azzolini** (Aninha), **Ana Paula**, **Andréa**, **Taís** e **Luciana Kabeya** (adorei ter conhecido vocês!!!!).

À **Vilani** e **Elaine Pinheiro**, pelo apoio no laboratório.

Ao **Prof. Edilberto Silveira** e ao **Daniel Uchoa**, pelo fornecimento da afromosina, fundamental para a realização do trabalho!

À **Sandra Araruna** pelo fornecimento das cápsulas do cumaru.

Ao **Dr. Hemerson Yuri**, pela grande oportunidade de convivência: você é uma pessoa ímpar!

Aos funcionários do Departamento de Farmácia (Sr. Saldanha, Expedito, Ivomar e Raimundinha) e do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (Áurea, Márcia, Alana, “Chiquinho” e Rose) por sempre me receberem com, pelo menos, um sorriso no rosto todos os dias.

Ao **Prof. Pedro Magalhães**: profissional brilhante, pessoa fascinante!

Ao **AC/DC** por me acompanhar nos momentos de estereotaxia, lavado broncoalveolar, traquéia, peritonite, edema, células!!!

Aos bolsistas (Fábio Pereira, Breno Auad, Jean Guilherme, Juliana Catharina, Camila, Mailson, Victor, Raony e Nathália) pela ajuda quando necessária.

LISTA DE FIGURAS

1.	Etapas do processo de diferenciação e migração leucocitária dos vasos sanguíneos.....	21
2.	Processo de maturação dos neutrófilos e formação dos grânulos.....	25
3.	Modelo de formação de NETs.....	28
4.	Ativação do fagossomo com consequente montagem do complexo NADPH oxidase.....	32
5.	<i>Amburana cearensis</i> A. C. Smith.....	37
6.	Substâncias isoladas da casca do caule de <i>Amburana cearensis</i>	38
7.	Estrutura molecular da afrormosina (AFM).....	40
8.	Cromatograma dos marcadores (A) e do extrato seco de <i>A. cearensis</i> (B).....	47
9.	Fórmula estrutural da cumarina (1) e amburosídeo A (2). Cápsulas do Extrato Seco Padronizado de <i>Amburana cearensis</i> (CESAC) (3).....	47
10.	Avaliação da toxicidade de CESAC em neutrófilos humano mensurada através da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH).....	61
11.	Avaliação da toxicidade de CESAC em neutrófilos humano mensurada através da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH).....	61
12.	Efeito de CESAC sobre a citotoxicidade determinada através do teste de MTT.....	63
13.	Efeito de AFM sobre a citotoxicidade determinada através do teste de MTT	63
14.	Atividade antiedematogênica da CESAC induzido por carragenina em camundongos.....	67
15.	Efeito de CESAC na migração de leucócitos induzida por carragenina na cavidade peritoneal de camundongos.....	68
16.	Efeito de CESAC sobre a peroxidação lipídica, mensurada através dos níveis de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) presentes no exsudato peritoneal de camundongos.....	68
17.	Efeito de CESAC sobre a migração celular no lavado bronco-alveolar de ratos desafiados por ovalbulmina.....	70

18.	Efeito de CESAC sobre os níveis de nitrito/nitrato presentes no lavado broncoalveolar de ratos desafiados por ovalbulmina.....	71
19.	Efeito de CESAC sobre os níveis de glutathiona reduzida presentes no lavado bronco-alveolar de ratos desafiados por ovalbulmina.....	72
20.	Efeito de CESAC sobre a peroxidação lipídica, mensurada através dos níveis de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) presentes no lavado bronco-alveolar de ratos desafiados por ovalbulmina.....	73
21.	Efeito de CESAC sobre a desgranulação neutrofílica induzida por PMA (A) ou fMLP (B) e determinada pela inibição da liberação da mieloperoxidase.....	75
22.	Efeito de AFM sobre a desgranulação neutrofílica induzida por PMA (A) ou fMLP (B) e determinada pela inibição da liberação da mieloperoxidase...	76
23.	Efeito de CESAC sobre a atividade da mieloperoxidase.....	79
24.	Efeito de AFM sobre a atividade da mieloperoxidase.....	80
25.	Efeito de CESAC sobre a atividade da elastase humana.....	82
26.	Efeito de AFM sobre a atividade da elastase humana.....	82
27.	Efeito de CESAC sobre o aumento dos níveis de TNF α induzido por PMA	84
28.	Efeito de AFM sobre o aumento dos níveis de TNF α induzido por PMA.....	84
29.	Perfil de quimioluminescência de CESAC dependente de luminol(QL lum) produzidos por neutrófilos registrada em contagens por minuto (cpm) em função do tempo (20 minutos).....	86
30.	Efeito de CESAC sobre a produção de quimioluminescência dependente de luminol (QL lum) de neutrófilos estimulados com PMA.....	86
31.	Perfil de quimioluminescência de CESAC dependente de lucigenina (QL luc) produzidos por neutrófilos registrada em contagens por minuto (cpm) em função do tempo (20 minutos).....	87
32.	Efeito de CESAC sobre a produção de quimioluminescência dependente de lucigenina (QL luc) de neutrófilos estimulados com PMA.....	87

33.	Perfil de quimioluminescência de AFM dependente de luminol (QL lum) produzidos por neutrófilos registrada em contagens por minuto (cpm) em função do tempo (20 minutos).....	88
34.	Efeito de AFM sobre a produção de quimioluminescência dependente de luminol (QL lum) de neutrófilos estimulados com PMA.....	88
35.	Perfil de quimioluminescência de AFM dependente de lucigenina (QL luc) produzidos por neutrófilos registrada em contagens por minuto (cpm) em função do tempo (20 minutos).....	89
36.	Efeito de AFM sobre a produção de quimioluminescência dependente de lucigenina (QL luc) de neutrófilos estimulados com PMA.....	89
37.	Avaliação da capacidade sequestrante de radicais livres de CESAC (10, 50 e 100 µg/mL) determinada pelo teste de DPPH.....	91
38.	Avaliação da capacidade sequestrante de radicais livres de AFM (10, 50 e 100 µg/mL) determinada pelo teste de DPPH.....	91

LISTA DE TABELAS

1.	Solução salina tamponada com fosfato (PBS).....	44
2.	Solução Salina de Hanks (HBSS).....	45
3.	Solução de Turk.....	45
4.	Avaliação da toxicidade de CESAC em neutrófilos humano através da exclusão ao corante Azul de Tripan.....	60
5.	Avaliação da toxicidade de AFM em neutrófilos humano através da exclusão ao corante Azul de Tripan.....	60
6.	Efeito de CESAC sobre o padrão de morte celular em neutrófilos humano através de marcação por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina.....	64
7.	Efeito de AFM sobre o padrão de morte celular em neutrófilos humano através da marcação por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina.....	65
8.	Concentração de CESAC e AFM capaz de inibir em 50 % a desgranulação de neutrófilo induzida por PMA ou fMLP e determinada pela liberação de MPO.....	77
9.	Concentração de CESAC e AFM capaz de inibir em 50 % a atividade de MPO em neutrófilo induzida por PMA.....	81
10.	Concentração de CESAC e AFM capaz de inibir em 50 % o metabolismo oxidativo (produção de EROs) de neutrófilos estimulados com PMA e mensurado através de quimioluminescência.....	90

LISTA DE ABREVIACOES

AINE	antiinflamatorios não-esteroidais
CI ₅₀	concentração inibitória 50%
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
COX	ciclooxigenase
DAG	diacilglicerol
DMSO	dimetil sulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ERO	espécies reativas de oxigênio
ERN	espécies reativas de nitrogênio
fMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
GM-CSF	fator de crescimento de colônia de granulócitos e monócitos
GSH	glutathiona reduzida
GSSG	glutathiona oxidada
GTP	guanosina trifosfato
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
ICAM	molécula de adesão intercelular
IFN γ	interferon gama
IL	interleucina
IP ₃	insitol-1,4,5-trifosfato
JAM	molécula de adesão juncional
LBA	lavado broncoalveolar
LDH	lactato desidrogenase

LPS	lipopolissacarídeo
LT	leucotrieno
MPO	mieloperoxidase
MTT	brometo 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NET	neutrophil extracellular trap
NF-κB	fator nuclear κB
OVA	ovalbumina
PAF	fator agregante de plaquetas
PECAM-1	molécula de adesão endotélio-plaquetário tipo 1
SAAVNA	N-succinil-Ala-Ala-Val-p-nitroanilida
PG	prostaglandina
PGSL-1	glicoproteína ligante da P-selectina
PKC	proteína quinase C
PLC	fosfolipase C
PLD	fosfolipase D
PMN	polimorfonucleares
PMA	forbol-12-miristato-13-acetato
SOD	superóxido dismutase
TBARS	substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TNFα	fator de necrose tumoral alfa

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DAS CÁPSULAS DO EXTRATO SECO E DA AFRORMOSINA, ISOFLAVONÓIDE, OBTIDOS DE *Amburana cearensis* A C SMITH. Aluna: Amanda de Araújo Lopes. Orientador: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, 2010.

A casca do caule de *Amburana cearensis* A C Smith, conhecida popularmente como cumaru, é utilizada para o tratamento de doenças respiratórias como bronquite e asma. Estudos farmacológicos anteriores mostraram as atividades antiinflamatória, antioxidante e antinociceptiva do extrato e moléculas isoladas do cumaru: incluindo cumarina (CM) e amburosídeo A (AMB). Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi realizar uma avaliação preliminar da citotoxicidade, e investigar o potencial antiinflamatório e antioxidante da cápsula do extrato seco de *A. cearensis* (CESAC) e da Afrormosina (AFM), com determinação do possível mecanismo de ação. Para tanto, as cápsulas foram produzidas a partir do extrato seco (*spray-dryer*) padronizado pelo teor de AMB e CM por CLAE. A citotoxicidade foi investigada em neutrófilo humano ($2,5 \times 10^6$ células/mL) através dos testes de exclusão ao corante azul de tripan, LDH, MTT e avaliação do padrão de morte celular pelo corante laranja de acridina/brometo de etídio. A AFM (10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) não mostrou citotoxicidade, enquanto que a CESAC (10, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) aumentou o número de células em apoptose e necrose. A CESAC (100-400 mg/kg, v.o.) inibiu o edema de pata em camundongos, o acúmulo de células e os níveis de TBARS-MDA no peritônio, induzidos por carragenina. No lavado broncoalveolar de ratos desafiados com ovalbumina, a CESAC reduziu o acúmulo de células, bem como a produção de TBARS-MDA e nitrito/nitrato, além de restabelecer os níveis de GSH. Tanto a CESAC (5, 10, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$), quanto AFM (3; 6; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) reduziram a ativação de neutrófilos humano induzida por fMLP (em até 65 % e 66 %, respectivamente) ou PMA (em até 72 % e 86 %, respectivamente). Além disso, estes inibiram em até 70 % aproximadamente a atividade de mieloperoxidase, porém apenas a CESAC inibiu a atividade da elastase (6-88 % inibição). A adição de CESAC ou AFM à suspensão de neutrófilos reduziu também os níveis de TNF α . O CESAC e a AFM mostraram atividade inibitória do metabolismo oxidativo de neutrófilos mensurado através de ensaios de quimioluminescência dependente de luminol (QL lum) e lucigenina (QL luc).

Palavras-chave: *Amburana cearensis*; afrormosina; atividades antiinflamatória, antioxidante; fitoterápico.

ABSTRACT

EVALUATION OF ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CAPSULES OF DRIED EXTRACT AND AFRORMOSIN, ISOFLAVONOID, OBTAINED FROM *Amburana cearensis* AC SMITH. Author: Amanda de Araújo Lopes. Advisor: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal. Master Degree. Program of Post-Graduate in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology. Federal University of Ceará, 2010.

The stem bark of *Amburana cearensis* AC Smith, popularly known as cumaru, is used to treat respiratory diseases like bronchitis and asthma. Previous pharmacological studies showed the anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidant, and / or muscle relaxant activities of the the extract and isolated molecules from cumaru, including coumarin (CM) and amburoside A (AMB). Given the above, the objective of this study was to conduct a preliminary assessment of cytotoxicity, and investigate the anti-inflammatory and antioxidant potential of the capsule of the dried extract from *A. cearensis* (CESAC) and afrormosin (AFM) to determine the possible mechanism of action. For this, the capsules were produced from the dried extract (*spray-dryer*), standardized by the content of CM and AMB by HPLC. Cytotoxicity was investigated in human neutrophil (2.5×10^6 cells / mL) through the tests of the exclusion dye trypan blue, LDH, MTT and evaluation of the pattern of cell death by acridine orange / ethidium bromide. AFM (10, 50 and 100 μg / mL) showed no cytotoxicity, while CESAC (10, 100 and 200 μg / mL) increased the number of apoptotic and necrotic cells. The CESAC (100-400 mg / kg, po) inhibited the paw edema in mice, the accumulation of cells and MDA-TBARS levels in the peritoneum induced by carrageenan. In bronchoalveolar lavage of mice challenged with ovalbumin, the CESAC reduced the accumulation of cells, as well as production of TBARS, MDA and nitrite / nitrate, and restore the levels of GSH. Both CESAC (5, 10, 25, 50, 100 and 200 μg / mL), and AFM (3, 6, 12.5, 25, 50 and 100 μg / mL) reduced the activation of human neutrophils induced by fMLP (up to 65% and 66%, respectively) or PMA (up to 72% and 86%, respectively). Moreover, they inhibited by 70% about the activity of myeloperoxidase, but only CESAC inhibited elastase activity (6-88% inhibition). The addition of AFM or CESAC in suspension of neutrophils also reduced the levels of TNF α . The CESAC and AFM showed the inhibitory activity of neutrophil oxidative metabolism measured by tests of luminol- (CL lum) and lucigenin-dependent (CL luc) chemoluminescence.

Key words: *Amburana cearensis*; afrormosin; anti-inflammatory, antioxidant activities; phytomedicine.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Inflamação	20
1.2. O Neutrófilo e sua importância na inflamação	24
1.2.1. Mieloperoxidase	28
1.2.2. Elastase	29
1.2.3. Explosão Oxidativa	31
1.3. Fármacos Antiinflamatórios	33
1.4. Produtos Naturais de Origem Vegetal com Ação Antiinflamatória	35
1.5. <i>Amburana cearensis</i>	36
1.5.1. Distribuição Geográfica, Descrição Botânica, Etnofarmacologia e Química	36
1.5.2. Toxicologia e Farmacologia	39
1.5.3. Afroformosina: isoflavonóide	39
2. JUSTIFICATIVA	41
3. OBJETIVOS	42
3.1. OBJETIVOS GERAIS	42
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1. Materiais	43
4.1.1. Aspectos Éticos.....	43
4.1.2. Material botânico.....	43
4.1.3. Padronização do Extrato Seco de <i>Amburana cearensis</i>	43
4.1.4. Isolamento da Afroformosina das cascas do caule de <i>A. cearensis</i>	43

4.1.5. Animais.....	43
4.1.6. Sangue Humano.....	44
4.1.7. Drogas.....	44
4.1.8. Composições das soluções.....	44
4.2. Métodos.....	46
4.2.1.Obtenção das Cápsulas do Extrato Seco de <i>Amburana cearensis</i> (CESAC).....	46
• Produção e Padronização do Extrato Seco e Produção das cápsulas.....	46
4.2.2. Isolamento da Aformosina.....	48
4.2.3. Avaliação farmacológica.....	48
• Isolamento de Polimorfonucleados (PMNs).....	48
a. Testes de citotoxicidade.....	49
• Exclusão por Azul de Tripán.....	49
• Atividade da enzima Lactato desidrogenase (LDH).....	49
• Teste do MTT.....	50
• Teste de Laranja de Acridina/Brometo de Etídio.....	51
b. Avaliação da atividade antiinflamatória em modelos experimentais <i>in vivo</i>	52
• Edema de pata induzido por carragenina em camundongos.....	52
• Peritonite induzida por carragenina em camundongos.....	52
c. Avaliação da atividade antiinflamatória em modelo experimental <i>ex vivo</i> : Lavado bronco-alveolar em ratos desafiados com antígeno.....	53
• Metodologia de sensibilização dos animais.....	53
• Metodologia do desafio pelo antígeno.....	53

• Avaliação de CESAC no lavado bronco-alveolar de ratos desafiados com antígeno	53
d. Avaliação da atividade antiinflamatória em modelos experimentais <i>in vitro</i>	54
• Efeito do CESAC e da AFM sobre a desgranulação de neutrófilos ativados por PMA ou fMLP mensurada pela inibição da enzima mieloperoxidase.....	54
Desgranulação de neutrófilos (PMNs).....	54
Determinação da concentração de MPO.....	54
• Efeito do CESAC e da AFM sobre a atividade da enzima mieloperoxidase.....	55
• Efeito do CESAC e da AFM sobre a atividade da enzima elastase.....	55
• Efeito do CESAC e da AFM sobre os níveis de TNF α	56
e. Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	56
• Ensaio de Quimioluminescência.....	56
• Teste de DPPH.....	56
4.3. Análise estatística.....	58
5. RESULTADOS	59
5.1. Avaliação da toxicidade de CESAC e AFM sobre neutrófilos humano.....	59
• Efeito de CESAC e AFM sobre a avaliação de citotoxicidade – ensaio de exclusão ao corante Azul de Tripán.....	59
• Efeito de CESAC e AFM sobre a atividade da enzima Lactato desidrogenase (LDH)	59
• Efeitos de CESAC e AFM sobre a avaliação de citotoxicidade mensurada através do teste de MTT.....	62
• Efeitos de CESAC e AFM sobre o padrão de morte celular: marcação diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina (BE/LA).....	62

5.2. Avaliação da atividade antiinflamatória das Cápsulas do Extrato Seco de <i>A. cearensis</i> (CESAC) em modelos experimentais <i>in vivo</i>	66
• Edema de pata induzido por carragenina.....	66
• Peritonite induzida por carragenina.....	66
5.3. Determinação da atividade antiinflamatória das Cápsulas do Extrato Seco de <i>A. cearensis</i> (CESAC) no lavado bronco-alveolar de ratos desafiados com ovalbulmina.....	69
5.4. Avaliação da atividade antiinflamatória de CESAC e AFM em modelos experimentais <i>in vitro</i>	74
• Efeito de CESAC e AFM na degranulação de neutrófilos humano induzida por PMA ou fMLP: liberação da enzima mieloperoxidase.....	74
• Efeitos da CESAC e AFM sobre a atividade da enzima mieloperoxidase em neutrófilos humano.....	78
• Efeitos da CESAC e AFM sobre a atividade catalítica de elastase	78
• Efeitos de CESAC e AFM sobre os níveis de TNF α	83
5.5. Avaliação da atividade antioxidante da CESAC e AFM <i>in vitro</i>	85
• Ensaio de quimioluminescência.....	85
• Teste do DPPH.....	85
6. DISCUSSÃO	92
7. CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
ANEXOS	135

1. INTRODUÇÃO

1.1. Inflamação

A inflamação pode ser definida como sendo um conjunto complexo de reações que ocorrem no tecido conjuntivo vascularizado, levando ao acúmulo de líquido e células no interstício (PEREIRA & BOGLIOLO, 1998). A inflamação pode ser assim considerada uma reação de defesa local e tem o papel de recrutar, organizar e ativar os vários sistemas no organismo envolvidos na proteção ante um agressor externo (MAJNO & PALADE, 1961).

Na vigência de um processo inflamatório, há mobilização de respostas vasculares, ativação e migração de células inflamatórias para o foco danoso, assim como liberação e produção de diversos mediadores inflamatórios responsáveis, sejam diretamente, pela modulação do processo, seja indiretamente, pela amplificação dos eventos já em atividade (MAJNO & PALADE, 1961).

Apesar de ter funções de defesa e reparo no organismo, a inflamação possui um potencial lesivo que pode ser bastante prejudicial ao paciente. Muitas doenças têm a fisiopatologia fundamentada no processo inflamatório crônico, ora contra seu próprio organismo, ora contra agentes invasores que induzem uma resposta cruzada do organismo e este passa a agir contra si, prejudicando a homeostase (MEDZHITOF, 2008).

Dentre as células envolvidas na inflamação, algumas estão presentes nos tecidos como as células endoteliais vasculares, mastócitos e macrófagos, enquanto plaquetas e leucócitos têm acesso à área de inflamação a partir do sangue. Os leucócitos são células ativamente móveis que podem ser divididas em duas classes: células polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e mononucleares (monócitos e linfócitos) (BEVILACQUA et al., 1994). A sequência de eventos na jornada dos leucócitos do lúmen vascular para o tecido intersticial, chamada de extravasamento, pode ser dividida em três etapas (MULLER, 2002): 1. Marginalização, rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio; 2. Transmigração; 3. Migração nos tecidos intersticiais em direção ao estímulo (**Figura 1**).

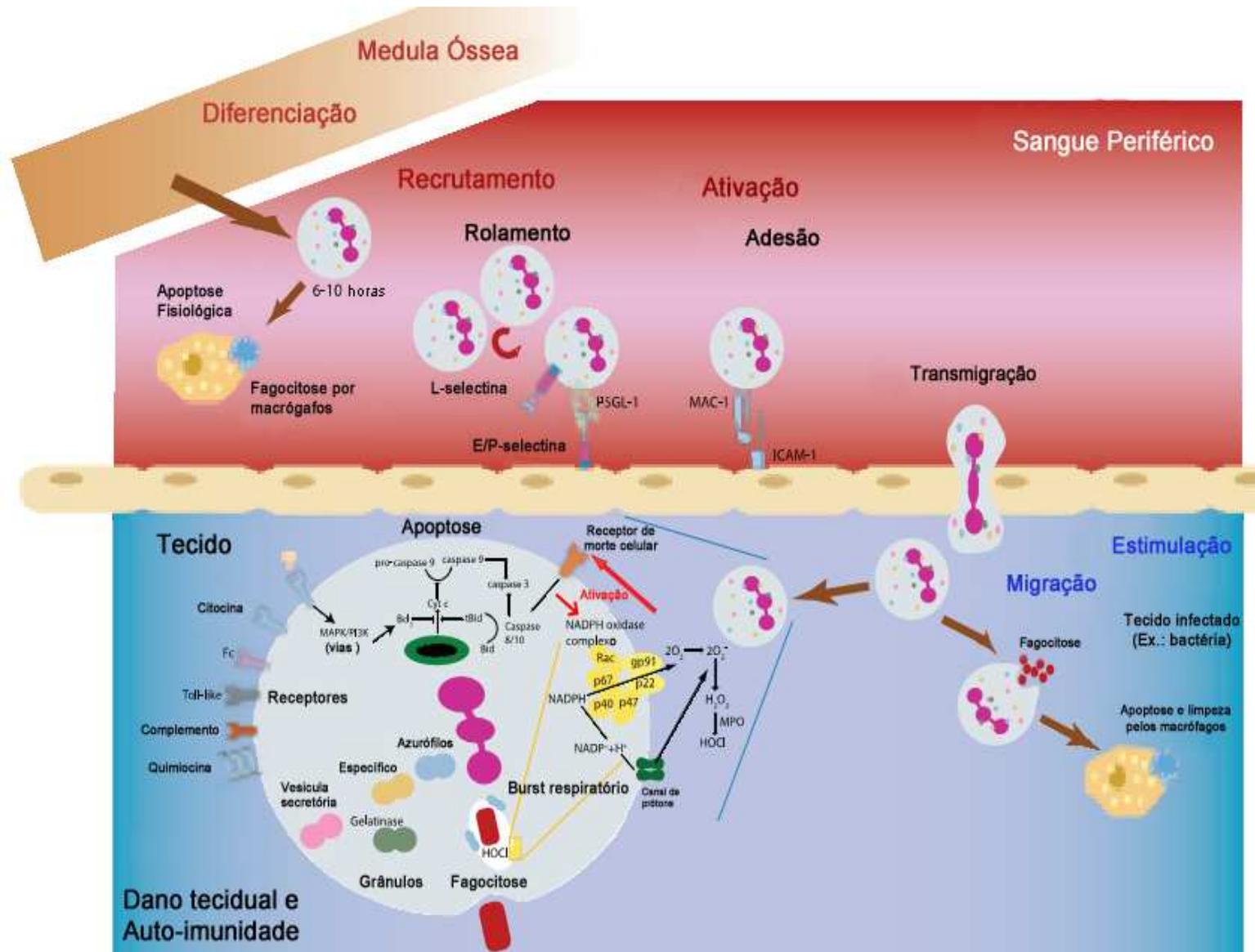


Figura 1. Etapas do processo de diferenciação e migração leucocitária dos vasos sanguíneos (Fonte: CASCÃO et al., 2009).

O primeiro passo do recrutamento dos leucócitos é o rolamento. Este processo leva a interação entre leucócitos e células endoteliais que consequentemente conduz a migração para os tecidos e focos inflamatórios. Os principais participantes neste processo são as selectinas (BURG & PILLINGER, 2001).

As L-selectinas, presentes na superfície dos leucócitos, interagem com as células endoteliais e outros neutrófilos através PSGL-1. As células endoteliais expressam a P-selectina (presente nos grânulos Weibel-Palade) poucos minutos após serem estimuladas (ativadas) pela trombina, histamina ou espécies reativas do oxigênio (EROs), e a E-selectina

uma ou duas horas após a estimulação por substâncias como TNF α , IL-1 ou LPS, que causa aumento da transcrição genética (MOORE et al., 1995). Ao contrário da P- e E-selectinas, a L-selectina é constitutivamente expressa na superfície dos leucócitos, entretanto, ela se encontra em um estado de baixa afinidade. Somente quando ocorre a ativação, esta selectina é transformada de um estado de baixa para um de alta afinidade.

Após o rolamento no endotélio ativado nas áreas de inflamação, a resposta dos leucócitos ao gradiente quimioatraente é a adesão. O processo de adesão tanto nas células endoteliais quanto na matriz extracelular é feita principalmente pela família das β_2 -integrinas. Estes receptores, pertencentes aos leucócitos, são compostos por várias subunidades α (CD11a, CD11b, CD11c) e uma única subunidade β (CD18), cujo domínio localiza-se a nível citosólico e interage com o citoesqueleto, permitindo a estabilização da adesão celular e a interação com proteínas de sinalização. As integrinas mais importantes são LFA-1 (CD11a/CD18), cuja interação com o endotélio é através de ligação com a molécula de adesão intercelular (ICAM)-1 e ICAM-2, e a MAC-1 (CD11b/CD18), que se liga a ICAM-1 e 2, fibrinogênio, fragmento do sistema do complemento C3b, heparina e outros. A ativação de MAC-1 pode ser induzida por quimioatratentes como IL-8, fator agregante de plaquetas (PAF) e complemento C5a, citocinas, fatores de crescimento como GM-CSF e substâncias derivadas de microorganismos como formilpeptídeos e LPS (WITKO-SARSAT et al., 2000; BURG & PILLINGER, 2001). Os participantes do processo de adesão constituem alvos de vários agentes antiinflamatórios, como corticoesteróides, que diminuem a expressão de moléculas de adesão no endotélio e na superfície do neutrófilo, ou salicilatos, que bloqueiam a ativação de MAC-1 levando a inibição da adesão neutrofílica (FILEP et al., 1997; PILLINGER et al., 1998).

A transmigração dos leucócitos ocorre através das junções intercelulares. Este processo envolve duas moléculas de adesão pertencentes à superfamília das imunoglobulinas: a moléculas de adesão endotelial de plaquetas (PECAM-1 ou CD31) e a molécula de adesão juncional (JAM), presente nas junções interendoteliais. A PECAM-1 forma interações homofílicas (PECAM-1/PECAM-1), sendo expressa nos leucócitos e nas junções intercelulares endoteliais (WITKO-SARSAT et al., 2000; MARTIN-PADURA et al., 1998; MUELLER et al., 1993). Além disso, esta molécula também atua na transdução de sinais intracelulares e sua dimerização aumenta a afinidade de ligação de MAC-1 (BERMAN & MUELLER, 1995).

A migração de leucócitos através do endotélio é dirigida principalmente por uma grande família de citocinas quimiotáticas, as quimiocinas. Além destas, outras moléculas estão envolvidas no recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório e incluem peptídeos bacterianos (por exemplo, fMLP), mediadores lipídicos ou componentes do sistema do complemento (por exemplo, C5a) (VAN BUUL & HORDIJK, 2004).

Uma função crítica da inflamação é a ativação dos leucócitos para que desempenhem suas funções normais de defesa do hospedeiro.

Os leucócitos polimorfonucleares, principalmente neutrófilos são um dos componentes chave na resposta inflamatória, sendo atualmente as células inflamatórias mais estudadas. Como são os principais dos fagócitos circulantes, estas células são os leucócitos que primeiro e mais abundante chegam ao foco de infecção (DI STASI & LEY, 2009).

Ao encontrar o patógeno, o neutrófilo o engloba em um fagossoma, através do processo de fagocitose. Em seguida, ocorre a fusão do fagossoma com grânulos citoplasmáticos, seguida pela desgranulação, formando o fagolisossoma. Dentro deste, o agente agressor é degradado por peptídeos e EROs que compõem o arsenal de defesa da célula independente e dependente de oxigênio, respectivamente (MAYER-SCHOLL et al., 2004).

Os neutrófilos são ideais para a eliminação de organismos patogênicos, bactérias, por exemplo, devido à grande quantidade de enzimas proteolíticas e rápida produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio responsáveis pela destruição do organismo invasor (ALVES-FILHO et al., 2005; 2006; 2008).

Com estudos mais atuais da função do neutrófilo na resposta inflamatória, sabe-se que hoje ele possui um enorme potencial de induzir dano tecidual por secreção de proteases e metabólitos tóxicos do oxigênio, assim como direcionar a inflamação através da apresentação de antígenos, secreção de citocinas, prostaglandinas e leucotrienos (WRIGHT et al., 2010). Todas estas características são observadas em diferentes tipos de doenças, tais como: artrite reumatóide, doenças do sistema cardiovascular (arteriosclerose, isquemia miocárdia, lesão por reperfusão), neurodegenerativas (esclerose múltipla, Doença de Parkinson, Alzheimer), além de câncer, lesões hepáticas e doenças respiratórias como asma e Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (AMES et al., 1993; WITZUM, 1994; ROY & KULKARNI, 1996; STAHL & SIES, 1997; ATOUI et al., 2005; FITCH et al., 2006).

1.2. O Neutrófilo e sua importância na inflamação

Os neutrófilos são células essenciais na imunidade inata que determina a resistência do hospedeiro contra infecções por bactérias e fungos (KUMAR e SHARMA, 2010) e seu recrutamento e ativação também surgem como marcadores da inflamação vascular (LAU et al., 2005). Os neutrófilos, que constituem de 50 a 70% dos leucócitos circulantes no indivíduo adulto, são muito mais numerosos quando relacionados aos eosinófilos (de 1 a 3%) ou basófilos (menos de 1%) (GOLDSBY, et al., 2000).

A maioria das funções dos neutrófilos como adesão e fagocitose requerem a mobilização dos grânulos citoplasmáticos e vesículas secretórias, que contêm proteínas antimicrobianas, enzimas, produtos do “burst” oxidativo e diversos receptores de ligação das membranas (FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003).

Os grânulos neutrofilicos são formados durante a granulopoiese que segue uma sequência de diferenciação se iniciando no estágio de promielócito (Hartmann et al., 1995) (**Figura 2**). Especificamente os neutrófilos possuem quatro tipos de grânulos: os azurofílicos, os específicos, os gelatinase e as vesículas secretórias (FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003).

Os grânulos azurofílicos são repletos de hidrolases ácidas e proteínas antimicrobianas e por muitos anos foram consideradas como lisossomos primários. Como os lisossomos, os grânulos azurofílicos contêm granulofisina (CD63) em suas membranas. Entretanto, em contraste com as organelas referidas, eles não expressam as proteínas de membrana associadas ao lisossomo (LAMP-1 e LAMP-2). Portanto, grânulos azurofílicos são provavelmente melhor classificados como grânulos de secreção regulados e não como lisossomos especializados (FAURSCHOU et al., 2002; FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003).

Como componentes dos grânulos azurofílicos, temos três serprocidinas (serino-proteases com atividade microbica) estruturalmente relacionadas: proteinase-3, catepsina-G e elastase. As serprocidinas são polipeptídeos catiônicos que exibem atividade proteolítica contra uma variedade de componentes do tecido conjuntivo, como elastina, fibronectina, laminina e colágeno (HASTY et al., 1990). A azurocidina também é uma serino-protease antimicrobiana, possuindo atividade quimiotática para monócitos, fibroblastos e células T, e aumenta a permeabilidade vascular durante o extravasamento de neutrófilos (GAUTAM,

2001). Esses grânulos também contêm a mieloperoxidase, uma heme proteína microbicida que é liberada dentro do fagossomo ou para o espaço extracelular sob ativação do neutrófilo, catalisando reações com H_2O_2 , formado pelo sistema NADPH oxidase, produzindo um potente oxidante: o ácido hipocloroso (HOCl) (JOINER et al., 1989; FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003).

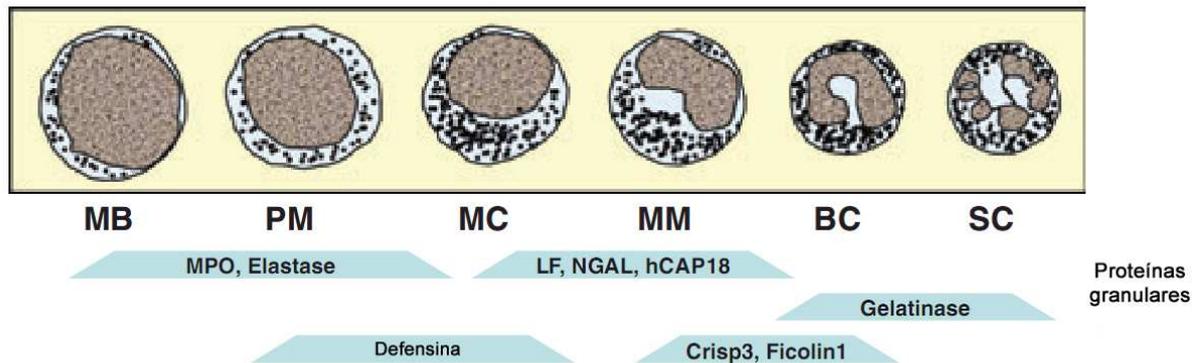


Figura 2. Processo de maturação dos neutrófilos e formação dos grânulos. O controle da expressão de proteínas dos grânulos é mediado pela combinação de fatores de transcrição presentes em diferentes estágios do desenvolvimento mielóide da célula. MB: mieloblasto; PM: promielócito; MC: mielócito; MM: metamielócito; BC: bastonetes; PMN: neutrófilo polimorfonuclear. Proteínas dos grânulos: MPO: mieloperoxidase; LF: lactoferrina; NGAL: lipocalina associada à gelatinase. (Fonte: HÄGER et al., 2010).

Os grânulos específicos participam principalmente das atividades antimicrobianas do neutrófilo pela mobilização de seus arsenais de substâncias antimicrobianas tanto no fagossomo quanto no exterior das células (BORREGAARD et al., 1983; JOINER et al., 1989; JESAITIS et al., 1990). As proteínas destes grânulos encerram diversos e potentes peptídeos antimicrobianos, incluindo lactoferrina, collagenase (metaloproteinase de matriz – 8) e hCAP-18, que induz quimiotaxia em neutrófilos, células T e monócitos (CHAPPLE et al., 1998; FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003).

Os grânulos gelatinase são primariamente importantes como reservatórios de enzimas de degradação de componentes do tecido conjuntivo e de receptores de membrana, necessários durante extravasamento e diapedese do neutrófilo. Nestes grânulos destaca-se a metaloproteinase (MMP)-9 que juntamente com outras MMPs possuem importância central para a degradação de membranas basais vasculares e estruturas intersticiais durante o extravasamento e migração de neutrófilos (KANG et al., 2001).

As vesículas secretórias constituem um reservatório de receptores associados à membrana necessários nas fases iniciais da resposta inflamatória mediada por neutrófilos. Suas membranas são ricas em β_2 – integrinas (MAC-1), receptor de complemento (CR1), receptores para peptídeos bacterianos, como fMLP e LPS, e leucolisina. Todas estas substâncias são incorporadas na membrana plasmática após exocitose das células, permitindo ao neutrófilo estabelecer um contato firme com o endotélio vascular ativado (FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003).

A mobilização dos grânulos pode ser reproduzida *in vitro* pelo aumento gradual dos níveis de Ca^{2+} intracelular (SENGELØV et al., 1993). Vários estímulos têm mostrado induzir aumentos na concentração do Ca^{2+} citosólico, por exemplo, o *N*-formil-metionil-lucil-fenialanina (fMLP), além de ligantes de L-selectina e MAC-1 (SENGELØV et al., 1993; LAUDANNA et al., 1994; NG-SIKORSKI et al., 1991).

A ligação de β_2 -integrinas induz a ativação de tirosina-quinases citoplasmáticas, que fosforilam e ativam uma gama de outras proteínas, incluindo fosfolipase $\text{C}\gamma_2$ e fosfolipase D (FALLMAN et al., 1992; HELLBERG et al., 1996).

A ativação da $\text{PLC}\gamma_2$ leva à formação de inositol (1,4,5)P3 (IP3), diacilglicerol (DAG) e ácido fosfatídico (PA), que ativam a proteína quinase C (PKC) e desencadeiam a liberação de Ca^{2+} das reservas intracelulares (LAUDANNA et al., 1994; FUORTES et al., 1993; AGWU et al., 1989; SUCHARD et al., 1994; BERTON & LOWELL, 1999; FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003), não requerendo influxo extracelular de Ca^{2+} através da membrana (SPISANI et al., 2005). O aumento celular de Ca^{2+} promove a desgranulação neutrofílica através da regulação de proteínas de fusão dos grânulos (v-SNARE) e do fagossoma (t-SNARE) (ROTHMAN, 1996).

Recentemente, uma nova estratégia microbicida dos neutrófilos foi descoberta: a formação de “armadilhas” extracelulares (Neutrophil Extracellular Traps – NETs). As NETs surgem da liberação de conteúdos nucleares de neutrófilos no espaço extracelular. Elas são compostas de cromatina descondensada e proteínas granulares e citoplasmáticas. A formação de “armadilhas” extracelulares também foi observada em outros tipos de granulócitos (mastócitos e eosinófilos) (BRINKMANN et al., 2004).

As NETs são capazes de ligar-se a bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos e parasitas e destruí-las extracelularmente devido aos seus altos conteúdos de serino-

proteases. No entanto, o mecanismo molecular envolvido na ligação de NETs aos microorganismos ainda não foi totalmente elucidado, mas evidências indicam que existem interações eletrostáticas entre componentes catiônicos de NETs e a superfície aniônica dos microorganismos (PALIC et al.; WARTHA et al., 2007; CHUAMMITRI et al., 2009; KÖCKRITZ-BLICKWEDE & NIZET, 2008) (**Figura 3**).

Atualmente, dois modelos de formação de NETs tem sido descritos: o primeiro envolvendo a liberação de NETs por neutrófilos em processo de morte celular (NETose), e o segundo, através da extrusão da cromatina junto com serino-proteases de células intactas. O primeiro mecanismo ocorre de 2 a 3 horas após a exposição das células a estímulos como: PMA, *Staphylococcus aureus* ou *Candida albicans*. O segundo processo envolve o reconhecimento de LPS ou bactérias patogênicas por plaquetas, via receptor toll-like, que se ligam aos neutrófilos, ocorrendo a formação de NET em minutos. Este processo está ligado principalmente à sepse (CLARK et al., 2007).

A base molecular da formação de NET ainda permanece pouco elucidada. No entanto, acredita-se que as espécies reativas do oxigênio (EROs) exercem um importante papel na sua formação. Foi demonstrado que neutrófilos de pacientes com Doença Granulomatosa Crônica (DGC) possuem defeito na formação das NETs. Esse defeito é causado por mutações em genes que codificam o complexo NADPH-oxidase e interrompe a habilidade do complexo em gerar EROs (HEYWORTH et al., 2003).

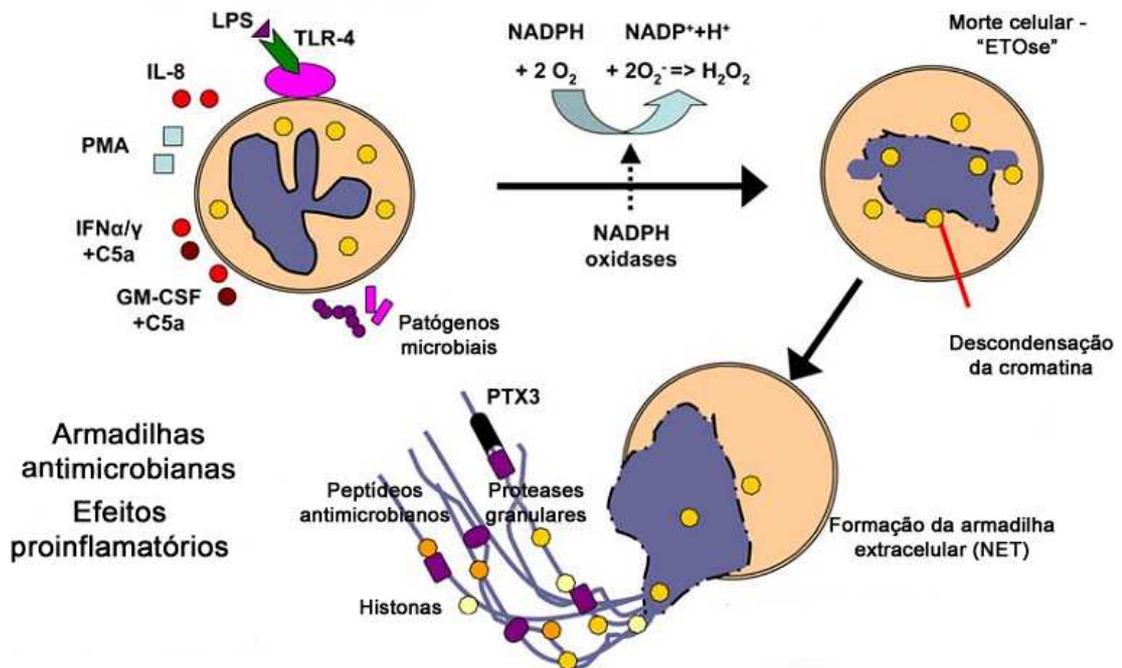


Figura 3. Modelo de formação de NETs. Os neutrófilos são ativados pelo contato com diferentes estímulos patogênicos microbianos como LPS, PMA e IL-8, resultando na ativação da NADPH-oxidase e formação de EROs (KÖCKRITZ-BLICKWEDE & NIZET, 2008).

Estudos recentes mostraram que existe uma relação intrínseca entre a formação de NETs e mieloperoxidase (MPO). Metzler e colaboradores (2010) demonstraram que neutrófilos deficientes de MPO não foram capazes de formar NETs, indicando o requerimento de MPO para sua formação. Além disso, também demonstraram que os produtos extracelulares de MPO (HOCl) não são capazes de resgatar a formação de NETs, sugerindo uma atuação autônoma de MPO sobre a célula.

1.2.1. Mieloperoxidase

A MPO é uma heme proteína encontrada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos. Monócitos também contêm grânulos MPO-positivos, embora sejam menos numerosos quando comparados aos neutrófilos e vão perdendo seus grânulos conforme se diferenciam em macrófagos (KLEBANOFF, 2005). A MPO também tem sido isolada das células Kupffer no fígado (BROWN, 1995), bem como em células microgliais e neurônios piramidais do hipocampo (NAGRA et al., 1997; GREEN et al., 2004).

Estudos sugerem um importante papel da MPO na destruição bacteriana, visto que está entre as principais enzimas liberadas dos grânulos citoplasmáticos dentro dos vacúolos

fagocíticos (fagolisossoma), representando o principal componente da capacidade microbicida dos neutrófilos (KLEBANOFF, 2005). Dentre os sistemas antimicrobianos presentes no fagossoma, a principal proporção consiste de MPO, peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , formado durante o “burst” oxidativo) e de um haleto, particularmente o cloreto (Cl^-). A produção inicial do sistema MPO- H_2O_2 - Cl^- é o ácido hipocloroso, um potente oxidante com atividade antimicrobiana (HAMPTON et al., 1998).

No entanto, 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. Por exemplo, estudos *in vitro* mostraram que HOCl pode ativar o fator nuclear- κB (NF- κB) e fosforilar resíduos de tirosinas nas células B e T, levando a um aumento na produção de TNF α (SCHIEVEN et al., 2002; SCHOONBROODT et al., 1997), bem como modificar lipoproteínas, exercendo um grande número de efeitos fisiopatológicos nos fagócitos e nas células vasculares, contribuindo para a iniciação e manutenção dos processos inflamatórios durante o desenvolvimento da lesão arterosclerótica (DAUGHERTY et al., 1994; MALLE et al., 2007).

Estudos recentes demonstraram que a MPO ao ligar-se as $\beta 2$ integrinas (CD11b/CD 18) nos neutrófilos, induzem a uma cascata de reações intracelulares, levando a um aumento na desgranulação de neutrófilos, na expressão de $\beta 2$ integrinas e na atividade de NADPH oxidase, estimulando as vias de ativação destas células através de um mecanismo independente da atividade catalítica da MPO (LAU et al., 2005). Estas propriedades de MPO a caracterizam, além de sua atividade bactericida e enzimática, como um mediador pró-inflamatório.

1.2.2. Elastase

A elastase neutrofílica é uma serino-protease, expressa por monócitos e mastócitos, mas principalmente por neutrófilos, onde é armazenada nos grânulos azurofílicos. A enzima ativa é deslocada nos grânulos até ser excitada dentro do fagolisossomo ou extracelularmente, por secreção regulada em resposta a vários estímulos (GARWICZ et al., 2005; PHAM, 2006). Fisiologicamente, a elastase está envolvida na degradação de materiais estranhos, ingeridos durante a fagocitose e é considerada uma molécula efetora chave no sistema imune inato, com potente atividade contra bactérias (BELAAOUAJ et al., 1998) e fungos (TKALCEVIC et al., 2000). A elastase secretada pode também degradar proteínas da

matriz extracelular local, remodelar o tecido danificado, além de facilitar a migração do neutrófilo através do tecido, durante a diapedese, em direção aos sítios de inflamação (DALLEGRI & OTTONELLO, 1997).

Os neutrófilos podem ser estimulados a liberar elastase após a exposição a várias citocinas e quimioatraentes, incluindo $\text{TNF}\alpha$, IL-8, C5a, LPS e fMLP, um peptídeo derivado da parede bacteriana (LEE & DOWNEY, 2001).

Entretanto, sob intensa ativação celular, ocorre a liberação de quantidades excessivas desta enzima, resultando na degradação de elastina, colágeno, lamininas e outros componentes da matriz extracelular, bem como de componentes do endotélio, promovendo dano celular, contribuindo para o desenvolvimento de doenças respiratórias crônicas como bronquite (LAI et al., 2004), Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) (ROGHANIAN & SALLENAVE, 2008) e fibrose cística (McGARVEY et al., 2002), e artrite reumatóide (WRIGHT et al., 2010).

Devido aos efeitos deletérios da elastase neutrofílica, há um forte interesse no desenvolvimento de inibidores sintéticos e potentes, seletivos para esta enzima (REID & SALLENAVE, 2001; TREMBLAY et al., 2003). Pesquisas com plantas pertencentes à família Leguminosae têm resultado na descoberta de inibidores de proteases, como por exemplo o *Tamarindus indica*, que das sementes foi isolado um inibidor da elastase (FOOK et al., 2005).

Estudos têm demonstrado que existe uma relação entre o acúmulo de radicais livres, especificamente as espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERN) e a evolução da inflamação (SALVEMINI et al., 2003). Mediadores inflamatórios como citocinas (TNF) e fatores de crescimento podem estimular a produção endógena, por exemplo, de H_2O_2 , um oxidante capaz de atuar como segundo mensageiro estimulando a cascata de proteínas quinases ligadas à expressão de genes inflamatórios (PKC) ou ao controle do ciclo celular (NF- κ B) (KERR et al. 1992; SUNDARESAN et al., 1995; PARINANDI et al., 1999; SIMON et al., 1998; DROGE, 2002; CAI, 2005).

1.2.3. Explosão Oxidativa

Após sofrerem estímulos ambientais ou durante o processo de fagocitose, os neutrófilos realizam a produção de EROs, que são moléculas altamente reativas por possuírem um par de elétrons não pareado na última camada, pelo complexo NADPH-oxidase em um processo chamado de explosão oxidativa (ZYCHILINSKY et al., 2003).

A NADPH-oxidase é um complexo enzimático formado por componentes citosólicos (p67phox, p47phox e p40phox) e de membrana (gp91phox e p22phox) que coexistem em um heterodímero denominado flavocitocromo b558. Após a ativação neutrofílica, os componentes citosólicos presentes em um complexo heterotrimérico P47phox-P67phox-P40phox são fosforilados por quinases, como p38-MAPK e PI3K (YAMAMORI et al. 2000), e são translocados para a membrana plasmática seguido pela sua interação com outras proteínas oxidase. Paralelamente, grânulos azurofílicos e vesículas secretórias se fundem com a membrana plasmática para formar o fagossoma, dessa forma seguido pela interação de gp91phox e p22phox com a membrana (NAUSEEF, 1999) (**Figura 4**).

O papel do complexo NADPH-oxidase é transportar elétrons do NADPH no sítio citoplasmático para o oxigênio no fluido extracelular ou no espaço intrafagossômico, para formar o radical ânion superóxido (O_2^-). Posteriormente, o radical O_2^- sofre uma reação de dismutação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), na presença de cobre e zinco, que leva à produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A formação de peróxido de hidrogênio a partir do radical ânion superóxido ocorre espontaneamente, isto é, na ausência da enzima SOD, quando O_2^- está presente em altas concentrações (BABIOR, 2000). O peróxido de hidrogênio formado pode ser convertido em água e oxigênio pela ação da enzima catalase presente no citoplasma. O H_2O_2 pode também oxidar a glutatona (GSH), formando água pela ação da enzima glutatona oxidase. A forma reduzida da glutatona (GSH) é regenerada de sua forma oxidada (GSSG) pela ação da enzima glutatona redutase.

Entretanto, na presença de moléculas específicas, o peróxido de hidrogênio pode dar origem a outras moléculas altamente reativas, como por exemplo, sua interação com um halogênio oxidado, formando o oxigênio singlet (1O_2) (KANOFISKY et al., 1984).

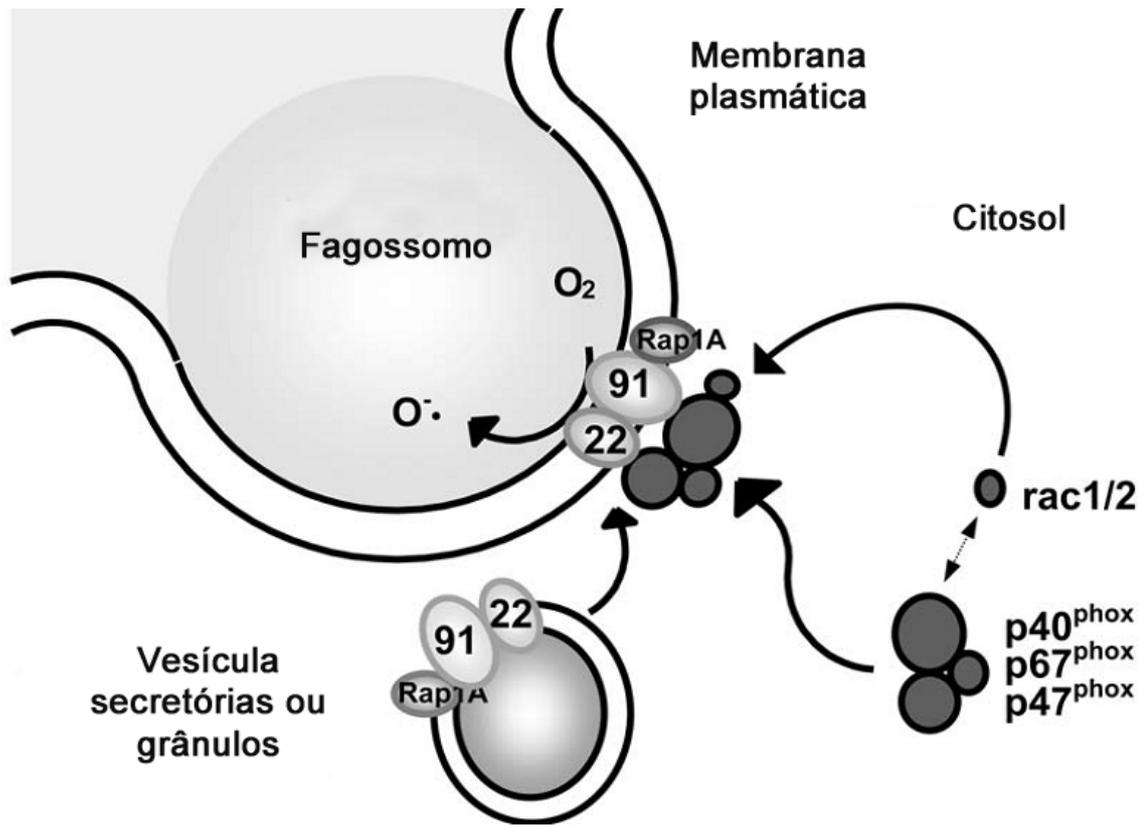


Figura 4. Ativação do fagossomo com conseqüente montagem do complexo NADPH oxidase. A montagem da enzima e a formação do fagossomo são processos concomitantes. A translocação dos componentes citosólicos é iniciado pela fosforilação de p47^{phox} e controlada por Rho GTPases (Rac 1, Rac e Rap 1^a). Esta translocação leva a uma mudança conformacional em gp91^{phox} que permite a ligação de NADPH, dessa forma ativando a enzima NADPH oxidase (MEISCHL & ROOS, 1998).

A produção de oxidantes é parte do metabolismo normal de vários tipos celulares e possui um papel importante para manter a homeostase celular. Os tecidos são constantemente submetidos à presença de EROs, tais como O₂⁻, H₂O₂ e outros gerados durante numerosas reações metabólicas (CASTILLO et al., 1992; CABRE et al., 2002).

No entanto, a produção excessiva de EROs pode oxidar proteínas (LIANG & PETTY, 1992), regular as vias de sinalização em níveis diferentes, incluindo funções dos receptores, atividade enzimática, fatores de transcrição e de expressão. As EROs também podem participar de reações que desencadeiam a produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, ativando a transcrição de NF-κB (FIALKOW et al., 2006).

A presença de EROs no espaço extracelular é controlada por moléculas antioxidantes naturais como forma de impedir que estes compostos reativos causem danos ao tecido hospedeiro. Essas moléculas previnem a formação ou 32erbenácea os radicais livres,

interrompendo a cadeia de reações de propagação. Dentre os antioxidantes endógenos estão a GSH, NADPH, coenzima Q (ubiquinona) e certas enzimas como SOD, catalase e glutathione peroxidase. Entre os antioxidantes exógenos estão o tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), carotenóides e compostos fenólicos, dentre eles os flavonóides (HALLIWELL et al., 1992; FRANCK et al., 2008).

1.3. Fármacos Antiinflamatórios

Desde a antiguidade o homem procura encontrar meios para aliviar a dor, a febre entre outros distúrbios similares relacionados à inflamação. Os relatos datam a partir do ano de 30 a. C., onde Celsus, que descreveu os 4 sinais clássicos da inflamação (dor, rubor, calor e tumor), utilizava extrato de *Salix alba* (Salgueiro) para aliviar esses sintomas. Séculos mais tarde, Leroux (1829) purificou uma substância chamada de salicina que foi identificada como sendo o princípio ativo responsável pelos efeitos do salgueiro.

Com o passar do tempo várias substâncias foram sendo descobertas e empregadas nos tratamentos dos sintomas causados pelo processo inflamatório, resultando no desenvolvimento dos fármacos antiinflamatórios. Esta classe de medicamentos é representada pelos antiinflamatórios não-esteroidais e glicocorticóides (esteroidais).

Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) constituem a classe de fármacos mais prescritos e utilizados no mundo, sendo o tratamento de primeira escolha em inúmeras patologias como artrite reumatóide, osteoartrite e outras doenças inflamatórias. Esses fármacos apresentam também atividade analgésica e antipirética em sua grande maioria. Sua atividade antiinflamatória ocorre, principalmente devido ao bloqueio da ciclooxigenase (COX), promovendo a inibição da síntese de prostaglandinas (MARNETT & KALGUTKAR, 1998; SALTER et al., 2001; BIAVA et al., 2007; HARRAK et al., 2007; BORNE et al., 2008).

Entre as classes de AINEs alguns são inibidores preferenciais da ciclooxigenase – 2 (COX-2) como o celocoxibe, o meloxicam e a nimesulida. Outra classe de drogas foi desenvolvida baseada nas pesquisas das diferenças entre COX-1 e COX-2, que são os inibidores específicos para esta enzima como o rofecoxibe e o valdecoxibe (DAVIES & JAMALI, 2004; LEES et al., 2004).

Os efeitos colaterais relacionados à toxicidade gastrointestinal são a queixa mais comum de pacientes que utilizam AINEs convencionais, como ácido acetilsalicílico, e

representam a segunda maior causa de risco de vida para pacientes que fazem uso crônico desses medicamentos (STEINFELD & BJØRKE, 2002). As queixas variam muito em severidade, e incluem náuseas, dispepsia e ulceração. Esses efeitos parecem estar relacionados ao papel de cada cicloxigenase. 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 (WARNER & MITCHEL, 2003).

O reconhecimento do papel protetor da COX-1 indicava a possibilidade de uma melhor atuação das drogas COX-2 seletivas e, realmente, os AINEs COX-2 seletivos apresentaram menores efeitos colaterais relacionados a complicações gastrointestinais. No entanto, atualmente se verifica uma ação indesejável dos AINEs COX-2 seletivos relacionada ao aumento dos níveis séricos de tromboxano A₂ e ao risco aumentado do desenvolvimento de trombose e de infarto do miocárdio (HAWKEY, 1999; SCHIEFFER & DREXLER, 2003; WALTER et al., 2004).

Outro recurso terapêutico é a utilização de glicocorticóides. São considerados potentes drogas antiinflamatórias e imunossupressoras, agindo em quase todos os tipos celulares, formando interações complexas com a expressão e a função de variados mediadores. Diferentemente dos AINEs, os glicocorticóides não inibem diretamente nenhuma enzima que sintetiza prostaglandinas, sua ação depende da interferência com a biossíntese de proteínas (GOPPELT-STRUEBE, 1997).

Os glicocorticóides estão entre as drogas mais efetivas no tratamento de processos inflamatórios. Esses fármacos são conhecidos por produzirem diversos efeitos biológicos por alterarem a expressão gênica. Como 1% do total dos genes pode ser alterado por glicocorticóides em seu alvo celular, conseqüentemente ocorreram alterações na expressão de um grande número de enzimas e outras proteínas. Diversos estudos indicam que parte de seus efeitos antiinflamatórios são mediados pela indução de proteínas reguladoras como a lipocortina (MORENO, 1997).

A enorme utilidade clínica dos glicocorticóides colocou essas substâncias entre os agentes mais frequentemente prescritos. Além de sua atividade antiinflamatória, eles também demonstram importante papel no tratamento de doenças auto-imunes (WILKENS & DE RIJK, 1998).

Existem várias complicações associadas à terapia prolongada com glicocorticóides, Entre elas podemos observar: alterações no equilíbrio hidroeletrólítico, no metabolismo de carboidratos, suscetibilidade aumentada a infecção, alterações oculares, osteoporose, dentre outras (PRADO et al., 2001).

Mais recentemente, as terapias biológicas têm sido utilizadas como recursos, trazendo novas oportunidades no tratamento de doenças inflamatórias crônicas como a artrite reumatóide. Esses agentes têm como alvo a inibição de componentes chave no desenvolvimento do processo inflamatório, por exemplo, linfócitos T e B e citocinas, principalmente TNF α (infliximab) e IL-1 β (Amgen).

Embora sejam bastante específicos, a utilização desses inibidores ilustra a dificuldade de prever reações adversas nos pacientes. Por exemplo, a utilização de inibidores de TNF α promove o aumento da incidência de tuberculose e outras infecções intracelulares (KEANE et al., 2001; GARDAM et al., 2003; WOLFE et al, 2004), além do desenvolvimento de esclerose múltipla (MOHAN et al.; ROBINSON et al, 2001).

Diante do exposto, certamente é necessário se investir no desenvolvimento de antiinflamatórios que possuam vantagens em relação aos prescritos na farmacoterapia atual da inflamação que tem um papel importante na fisiopatologia de inúmeras doenças. Nesse contexto, surgem os produtos de origem vegetal como uma fonte em potencial de novos antiinflamatórios.

1.4. Produtos Naturais de Origem Vegetal com Ação Antiinflamatória

O estudo sobre a atividade antiinflamatória de plantas brasileiras é antigo, entretanto os trabalhos citados na literatura datam a partir da década de 90, como *Pterodon pubescens* (SABINO et al., 1999), que possui propriedades contra artrite, *Casearia sylvestris* (BORGES et al., 2000), com propriedades antiúlcera, *Tabebuia avellanadae* (MIRANDA et al., 2001), que possui atividade antinociceptiva, e as espécies *Lychnophora*, como a *L. granmongolense*, a *L. salicifolia* e a *L. ericoides*, que devido aos seus flavonóides, apresenta atividade antioxidante (KANASHIRO et al., 2004).

O estudo com o extrato de *Cordia 35erbenácea*, mais conhecida como erva-baleeira mostrou atividades antiinflamatórias principalmente através de compostos fenólicos isolados da planta. Por exemplo, a artemetina, um flavonóide, caracteriza-se por sua atividade anti-dematogênica (SERTIÉ et al., 1990). Estudos mais aprofundados com a planta levaram

ao desenvolvimento do Acheflan, fitoterápico, tendo como princípio ativo responsável por suas propriedades terapêuticas o alfa-humuleno.

No Ceará pesquisadores têm se dedicado ao estudo multidisciplinar da flora medicinal do Nordeste. Desse esforço já foram gerados inúmeros projetos (ex.: Projeto Farmácias Vivas), solicitações de patentes e trabalhos publicados. Nesse processo algumas espécies vegetais foram ou continuam sendo objetos de estudo, tais como *Myracrodruon urundeuva*, *Justicia pectoralis* e *Anacardium occidentale*.

1.5. *Amburana cearensis*

1.5.1. Distribuição Geográfica, Descrição Botânica, Etnofarmacologia e Química

Amburana cearensis A C Smith é uma árvore própria da caatinga nordestina, também referida como cumaru, amburana, amburana-de-cheiro, cerejeira e cumaru-de-cheiro. Trata-se de uma árvore com até 20 metros de altura, de tronco revestido por uma casca espessa (ritidoma esfoliativo) que desprende em finas lâminas delgadas deixando grandes manchas vermelho-pardas de mistura com outras esverdeadas (**Figura 5**).

Folhas compostas pinadas, de folíolos elípticos, orbiculares até oblongo ou oval, de 2-3 centímetros de comprimento. Flores pequenas, brancacentas e muito aromáticas, dispostas em panículas terminais. Frutos do tipo vagem tardiamente deiscente, contendo uma única semente achatada e provida de uma asa membranácea. Todas as partes da planta têm cheiro forte e agradável, atribuída pela presença de cumarina (1,2-benzopirona). Ocorre desde o Nordeste até São Paulo, nas áreas mais áridas. Na região amazônica, principalmente no Acre e Rondônia ocorre outra espécie afim desta planta – *Amburana acreana* (Ducke) A C Smith com as mesmas propriedades, mas de porte muito maior, contudo considerada por alguns autores como a mesma espécie (LORENZI & MATOS, 2008).



Figura 5. *Amburana cearensis* A. C. Smith. (Fotos: SILVEIRA; LORENZI & MATOS, 2008).

As cascas e sementes são utilizadas com frequência em no tratamento de afecções respiratórias como bronquite, asma, gripes e resfriados na forma de chá fervido (decocto) ou "lambedôs" (bebida açucarada caseira), ou de banho com o cozimento das cascas (decocto) para tratar dores reumáticas (MATOS, 2000).

Industrialmente, a forma farmacêutica disponível é o xarope de Cumaru, produzido pelo Programa Farmácias Vivas, Farmácia-Escola/UFC e por algumas empresas privadas.

O estudo fitoquímico das sementes mostrou que elas fornecem cerca de 23 % de um óleo fixo constituído principalmente do glicerídeo dos ácidos: palmítico (18,6 %), linoléico (7,1 %), oléico (53,1 %), esteárico (8,0 %) e 4 % de uma mistura de cumarina com 6-hidroxicumarina (MATOS; MORS et al., 2000).

O estudo fitoquímico (CANUTO & SILVEIRA, 2006) das cascas do caule resultou no isolamento de 13 constituintes químicos: cumarina, dois ácidos fenólicos [ácido vanílico e ácido protocatecuico], um heterosídeo fenólico (amburosídeo A), a mistura de β -sitosterol e estigmasterol glicosilados e cinco flavonóides [afromosina, isocampferídio,

campferol, quercetina, 4'-metoxi-fisetina], dos quais quatro são flavonóis, sendo o isocampferídio um derivado do campferol metilado na posição 3, isômero da 4'-metoxi-fisetina, além de sacarose (**Figura 6**).

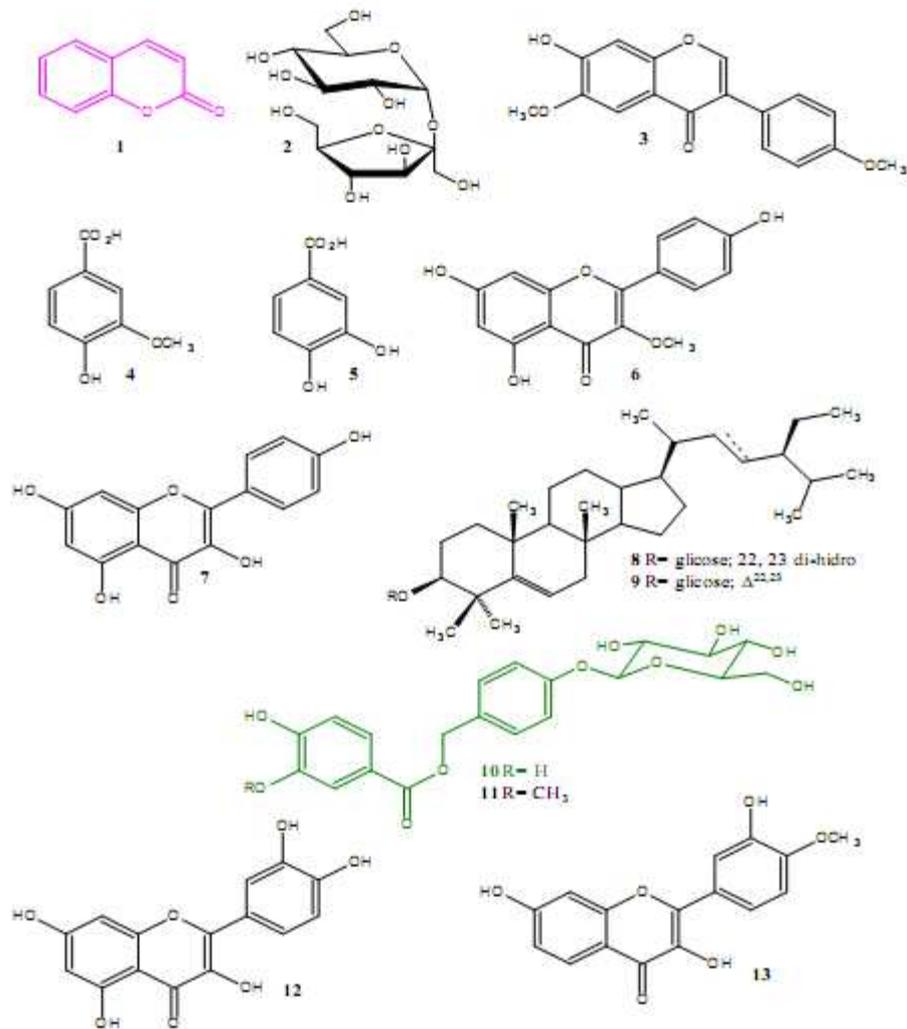


Figura 6. Substâncias isoladas da casca do caule de *Amburana cearensis*. **1.** 1,2-benzopirona (cumarina); **2.** sacarose; **3.** aflurosina; **4.** ácido vanílico; **5.** isocampferídio; **6.** ácido protocatecúico; **7.** campferol; **8.** β sitosterol; **9.** estigmasterol; **10.** amburosídeo A; **11.** amburosídeo B; **12.** quercetina; **13.** 4'-metoxi-fisetina.

1.5.2. Toxicologia e Farmacologia

Através de ensaios pré-clínicos, foram comprovadas as atividades broncodilatadora, analgésica e antiinflamatória do extrato hidroalcoólico (EHA) das cascas do caule de *A. cearensis*, o qual demonstrou ser isento de toxicidade em doses terapêuticas, garantindo eficácia e segurança no tratamento de asma, bronquite, gripes e resfriados (LEAL et al., 1997 e 2003).

Estudos clínicos realizados com o xarope de Cumarú revelaram que a sua administração mostrou-se segura, não causando efeitos tóxicos em voluntários saudáveis (SOARES, 2007). Além disso, um estudo clínico randomizado, mostrou que a administração do xarope de Cumarú como terapia complementar proporcionou melhora significativa dos sintomas da asma, sem causar toxicidade sistêmica (CARVALHO, 2009).

Estudos anteriores (LEAL et al., 1995; 1997) demonstraram que o EHA, a cumarina e uma fração flavonoídica, majoritariamente constituída por isocampferídio, obtidos das cascas do caule de *A. cearensis*, bloquearam a migração de leucócitos, possivelmente pela inibição de substâncias quimiotáticas como LTB₄ e IL-8 (LEAL et al., 2003). Posteriormente, descobriu-se (LEAL et al., 2006) que o isocampferídio e o amburosídio A, isolados de *A. cearensis*, também contribuem para as atividades farmacológicas da planta. Ambas as substâncias possuem atividade antiinflamatória que parece estar relacionada ao bloqueio da síntese e/ou liberação de mediadores como prostaglandinas (PGE₂), histamina e bradicinina. Nesse mesmo estudo foi demonstrado que o isocampferídio possui atividade músculo-relaxante evidenciada pela sua ação na abertura de canais de K⁺ em traquéia de cobaias. O amburosídio A exibe atividade hepatoprotetora (LEAL, 2006b) e neuroprotetora (LEAL et al., 2006), em razão de sua ação antioxidante.

Além do isocampferídeo, outros derivados flavônicos estão presentes na casca do caule de *A. cearensis* como a afrormosina.

1.5.3. Afrormosina: isoflavonóide

A afrormosina (**Figura 7**) é um isoflavonóide que foi descrito pela primeira vez por McMurray (1960) quando então realizou seu isolamento e caracterização química a partir da *Afromosia elata*, daí a origem do termo.

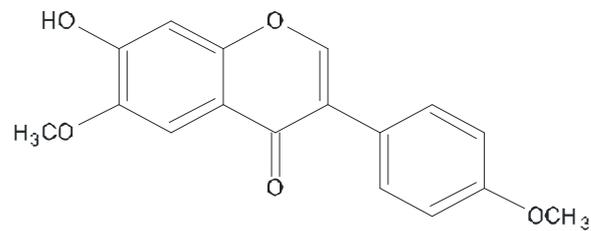


Figura 7. Estrutura molecular da afrormosina (AFM).

Estudos químicos com outras espécies vegetais, incluindo *Mendicago sativa* (KESSMANN et al., 1990), *Wistaria brachybotris* (KONOSHIMA et al., 1992), *Tephrosia calophylla* (REDDY et al., 2009), *Gliricidis serprum* (HERATH et al., 1998) e *Butea monosperma* (CHOKCHAISIRI et al., 2009), mostraram também a presença de afrormosina em diferentes órgãos vegetais, como raiz, folhas e flores.

Este isoflavonóide forma, juntamente com o isocampferídeo, campferol, quercetina e 4'-metoxi-fisetina, o grupo de derivados flavônicos presentes em *A. cearensis* (CANUTO & SILVEIRA, 2006).

Existem na literatura poucos estudos farmacológicos acerca da afrormosina, entre eles estão as atividade antiproliferativa em células carcinogênicas pulmonares de rato (KONOSHIMA et al., 1992), indutora da expressão gênica em células de carcinoma mamário e endometrial humano (HALABALAKI et al., 2006), atividade contra o bloqueio neuromuscular do veneno de *Bothrops jararacussu* (PUEBLA et al., 2010) e antioxidante através da prevenção da peroxidação lipídica determinada pelo método de oxidação do ácido linoléico (TODA e SHIRATAKI, 1999).

2. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a inflamação apresenta papel importante na fisiopatologia de algumas doenças, estando associada a muitas condições crônicas, como câncer, doença cardiovascular, artrite reumatóide e asma. O desenvolvimento dessas patologias possui um significativo impacto social devido às suas elevadas morbimortalidades (VINOLA et al., 2003; VILLACORTA et al., 2007; MOTA et al., 2010). Apesar da existência de inúmeros fármacos antiinflamatórios, estes apresentam desvantagens terapêuticas que justificam a pesquisa de novos medicamentos. Nesse contexto, as plantas medicinais surgem como uma fonte em potencial.

A identificação de compostos bioativos de plantas oferece uma grande esperança para o desenvolvimento de novas ferramentas farmacológicas. Por exemplo, pesquisas com isoflavonóides, um subgrupo dos flavonóides, têm mostrado que essas substâncias possuem várias atividades biológicas tais como antioxidante, antiproliferativa e antiinflamatória (ARORA et al., 1998; HOLLMAN & KATAN, 1999; COS et al.; WANG et al., 2001; DIJSSELBLOEM et al., 2004).

Atualmente Programas Governamentais de Fitoterapia no Estado e Indústrias Farmacêuticas (regional e nacional) têm produzido o Xarope de Cumaru, contudo esse fitoterápico não tem sido submetido a um controle de qualidade adequado. Nos últimos anos estudos interdisciplinares (farmácia, química e farmacologia) têm sido realizados com a casca do caule de *A. cearensis* (antiinflamatório, antiedematogênico e músculo-relaxante). Além disso, métodos analíticos têm sido realizados para o controle de qualidade de produtos derivados da planta, além da avaliação farmacológica de produtos derivados e moléculas isoladas de *A. cearensis* (ARARUNA, 2008; LEAL et al., 2009; 2008; 2006; 2003).

Diante do exposto, o presente estudo visa investigar a atividade antiinflamatória e antioxidante das cápsulas do extrato seco padronizado e da afrormosina, isoflavonóide, obtidos de *Amburana cearensis* (cumaru, Fabaceae).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Avaliar a atividade antiinflamatória e antioxidante das Cápsulas do Extrato Seco (CESAC) e da Afroformosina (AFM), isoflavonóide, obtidos de *Amburana cearensis*, com determinação do possível mecanismo de ação.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade da CESAC e da AFM sobre neutrófilos humano;
- Avaliar a atividade antiinflamatória da CESAC em modelos de inflamação aguda, no edema de pata e peritonite, induzidos por carragenina em camundongos;
- Investigar a atividade antiinflamatória da CESAC no modelo de bronco provocação antigênica em ratos;
- Determinar os efeitos da CESAC e da AFM sobre a desgranulação dos neutrófilos ativados por fMLP ou PMA, através da mensuração da enzima mieloperoxidase;
- Determinar os efeitos da CESAC e da AFM sobre a atividade catalítica das enzimas mieloperoxidase e elastase em neutrófilos humano ativados;
- Avaliar o efeito da CESAC e da AFM sobre a produção de TNF α em neutrófilos humano ativados;
- Analisar os efeitos da CESAC e da AFM sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos, empregando a técnica de quimioluminescência;
- Avaliar a atividade antioxidante da CESAC e da AFM no ensaio de DPPH;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Aspectos éticos

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal – CEPA da Universidade Federal do Ceará, protocolo N° 49/09, segundo os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana (COMEPE) da Universidade Federal do Ceará, sob o protocolo de N° 218/10 (Anexo I e II).

4.1.2. Material botânico

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

4.1.3. Padronização do Extrato Seco de *Amburana Cearensis*

O Extrato Seco de *Amburana cearensis*, foi obtido a partir das cascas do caule da planta, e produzido pela técnica de *Spray dryer* e padronizado nos seguintes marcadores: amburosídio A (345 mg/g de extrato) e cumarina (185 mg/g de extrato). A técnica de padronização empregada foi CLAE-DAD. Essa metodologia foi realizada no laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais – Setor de Farmacognosia da UFC, sob orientação da Profa. Dra. Kalyne Leal.

4.1.4. Isolamento da Afrormosina das cascas do caule de *A. cearensis*

A Afrormosina foi isolada do extrato etanólico das cascas do caule de *Amburana cearensis* e gentilmente cedida pelo grupo de pesquisa em Química Orgânica, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC, coordenado pelo Prof. Dr. Edilberto Silveira.

4.1.5. Animais

Os experimentos foram realizados utilizando ratos albinos (*Rattus norvegicus*) variedade Wistar (120 a 180g) do sexo masculino ou camundongos albinos (*Mus musculus*) variedade Swiss-Webster (25 a 30g) do sexo masculino, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram divididos em grupos e mantidos

aproximadamente durante uma semana no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia em períodos de claro/escuro de 12 horas para ambientação e aclimação. Aos animais foram fornecidas água e ração *ad libitum*.

4.1.6. Sangue humano

Neste estudo, como fonte de obtenção de leucócitos polimorfonucleares, foi utilizado sangue humano de doadores saudáveis cedido pelo Centro de Hemoterapia e Hematologia do Ceará – HEMOCE.

4.1.7. Drogas

Cumarina (1,2-benzopirona), carragenina, forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), citocalasina B, mieloperoxidase, indometacina, dexametasona, ovalbulmina, dimetilsulfóxido (DMSO), brometo 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), Lucigenina (10,10' –dinitrato de dimetil-bis-acrinidina), Luminol (5-amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinodiona), Triton X-100, 3,3',3,5' –tetrametilbenzidina (TMB), N-succinil-Ala-Ala-Val-p-nitroanilida (SAAVNA) e Tween 80 foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Gelatina foi adquirida de Difco, Becton, Dickinson and company sparks, France. Ácido tricloroacético, ácido tiobarbitúrico foram adquiridos da Merck.

4.1.8. Composição das Soluções

Tabela 1 – Solução salina tamponada com fosfato (PBS)

Composição	Quantidade
NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	0,2 g
NaH ₂ PO ₄	1,15 g
Água destilada q.s.p.	1,0 L

pH=7,4

Tabela 2 – Solução Salina de Hanks (HBSS)

Composição	Quantidade (mM)
CaCl ₂	1,2
MgSO ₄	0,4
Na ₂ HPO ₄	0,42
KCl	5,4
Glicose	5,5
NaCl	136
Água destilada q.s.p.	1,0 L

pH= 7,4

Tabela 3 – Solução de Turk

Composição	Quantidade
Ácido acético glacial	20,0 mL
Violeta genciana	2,0 mL
Água destilada	1,0 L

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Obtenção das cápsulas do Extrato Seco de *Amburana cearensis* (CESAC)

- **Produção e Padronização do Extrato Seco e Produção das cápsulas**

Cascas do caule de *A. cearensis* foram secadas e estabilizadas em estufa com circulação de ar e trituradas em um moinho de facas. A droga vegetal foi previamente macerada com etanol puro durante 24h e, então, percolada com etanol utilizando a proporção droga:solvente 1:1. A solução extrativa foi concentrada em 50 % do volume inicial em estufa com circulação de ar (35°C/4h), sendo incorporado, em seguida, dióxido de silício coloidal na concentração de 30 %. A suspensão obtida foi mantida sob agitação constante e secada por *spray drying* (ARARUNA, 2008).

A padronização do extrato seco foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Alliance-Waters, EUA) acoplada a um detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), utilizando como marcadores o amburosídeo A (AMB) e a cumarina (CM). As condições cromatográficas foram: coluna C18 (250 x 4,6mm, 5 μ m), fase móvel (A: AcN/MeOH/THF; B: tampão H₂PO₄/triethylamina), pH 3, eluição gradiente, fluxo 1,0 mL/min e $\lambda = 261$ e 277 nm (AMB e CM, respectivamente). A quantificação dos marcadores foi realizada através de curvas de calibração, obtidas por injeção de padrão externo, e resultou em 345 e 185 mg/g de extrato de AMB e CM, respectivamente (**Figura 8**).

As cápsulas (cápsulas duras) foram produzidas pela unidade de Tecnologia de Produtos Naturais do Laboratório de Farmacognosia/Depto. de Farmácia (**Figura 9**).

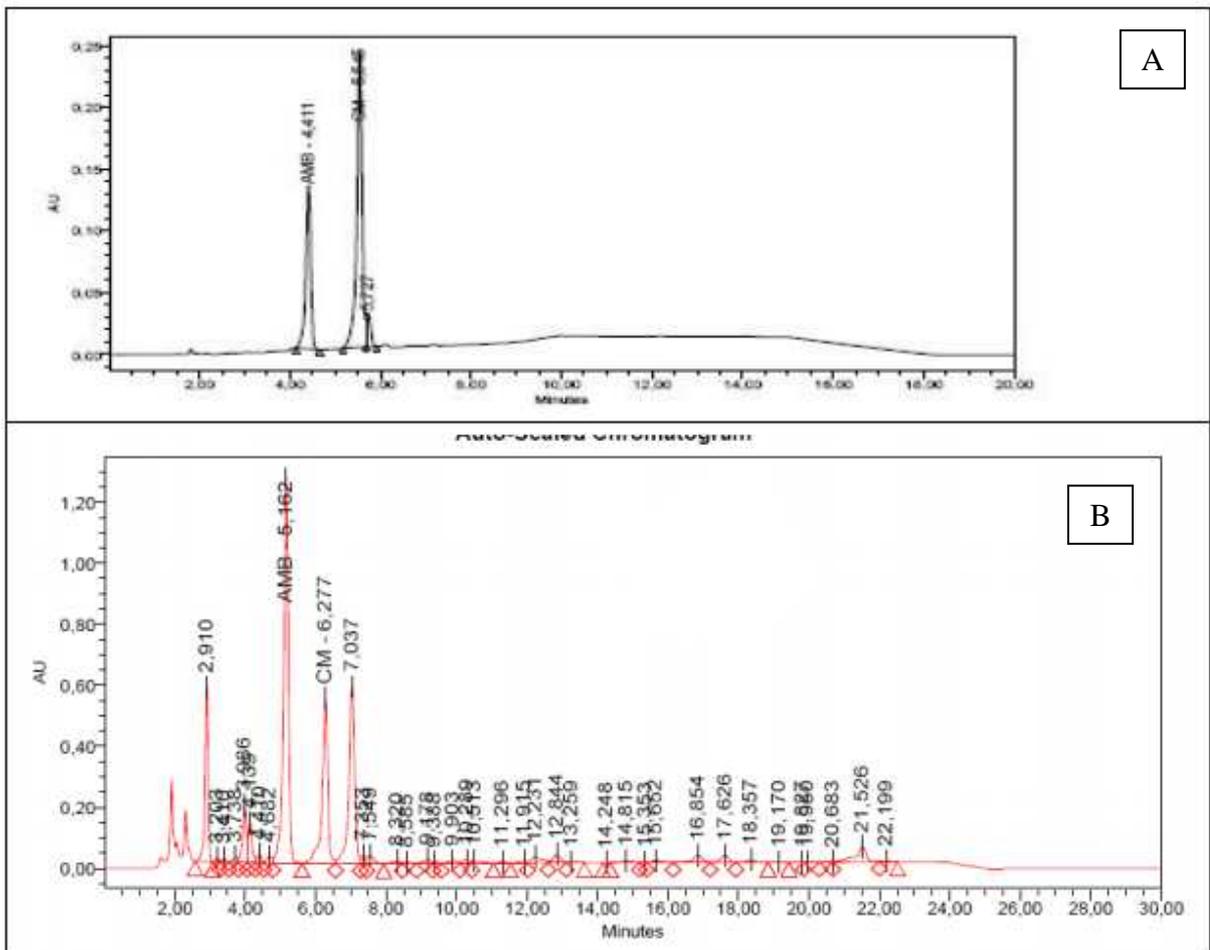


Figura 8. Cromatograma dos marcadores (A) e do extrato seco de *A. cearensis* (B).

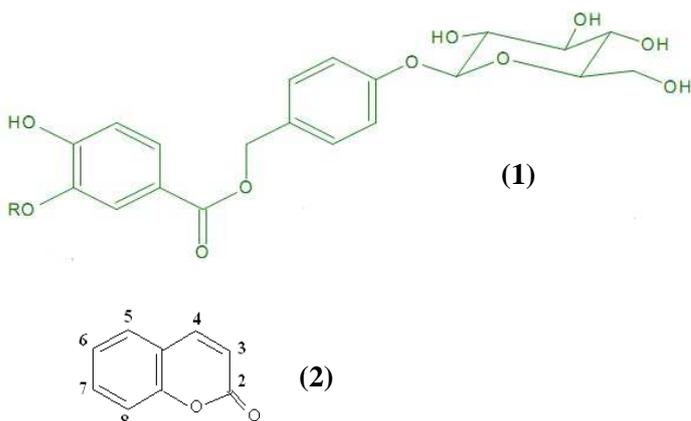


Figura 9. Fórmula estrutural da cumarina (1) e amburoside A (2). Cápsulas do Extrato Seco Padronizado de *Amburana cearensis* (CESAC) (3).

4.2.2. Isolamento da Afrormosina

As cascas do caule de *Amburana cearensis* (3,3 Kg) foram trituradas mecanicamente e extraídas exaustivamente com etanol em aparelho de Soxhlet, em porções de aproximadamente 200 g. O extrato etanólico foi concentrado por destilação do solvente sob pressão reduzida, fornecendo 250 g de um sólido escuro denominado de ACCE. Durante a concentração do extrato, cristais marrons foram formados e separados por filtração à vácuo, e após análise espectroscópica identificados como sacarose (ACCE-1, 535,6 mg). ACCE foi dissolvido em água (300 mL) e particionado com quinze porções sucessivas de 150 mL de acetato de etila, fornecendo uma fração orgânica denominada ACCEA (74,00 g). A fração ACCEA foi tratada com sulfato de sódio, filtrada e seca, para então ser dissolvida com metanol (200 mL) e submetida à partição com nove porções sucessivas de 100 mL de hexano. À fração metanólica resultante adicionou-se água (100 mL) e acetato de etila (100 mL), e após agitação separou-se as fases, fornecendo uma fração acetato denominada ACCEAMA (47,26 g). ACCEAMA (47,26 g) foi adsorvida em 72,5 g de gel de sílica e eluída sob uma camada de gel de sílica (42,75 g) em uma coluna cromatográfica de 1000 mL, utilizando-se hexano/clorofórmio (1:1), clorofórmio, clorofórmio/acetato de etila (1:1), acetato de etila e metanol, como eluentes, em volumes de 100 mL. A fração clorofórmio/acetato (1:1), denominada ACCEAMA/HC (4,21 g) forneceu um sólido amarelo-escuro. Sucessivas lavagens com hexano/clorofórmio 50% forneceu cristais brancos denominados como ACCE-2 (38,0 mg), que após análise por métodos espectroscópicos foi identificados como o flavonóide afrormosina.

4.2.3. Avaliação farmacológica

- **Isolamento de polimorfonucleados (PMNs)**

Polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos (80-90 %) foram obtidos de sangue humano cedido pelo Centro de Hemoterapia e Hematologia do Ceará – HEMOCE (*buffy coat*) e isolados de acordo com o método descrito por Henson (1971) e modificado por Lucisano & Mantovani (1984). O sangue foi centrifugado, o plasma desprezado e o soro lavado diversas vezes com soluções salina, utilizando solução de gelatina 2,5% (p/v) para formar um gradiente de separação dos componentes sanguíneos.

a. Testes de citotoxicidade

Os ensaios *in vitro* podem ser empregados na avaliação da segurança de várias substâncias químicas e, para realizá-los, necessita-se apenas de uma pequena quantidade de substância. Existem vários parâmetros para a avaliação de citotoxicidade que avaliam desde a medida da integridade da membrana celular (ex.: lactato desidrogenase) até a atividade metabólica da célula (teste do MTT). A avaliação da toxicidade do extrato seco de *A. cearensis* e da afrormosina foi realizada com o intuito de avaliar a segurança da CESAC e da AFM.

- **Exclusão por Azul de Tripán**

A viabilidade celular foi determinada através do ensaio de exclusão por Azul de Tripán (Renzi et al., 1993), onde neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados por 15 minutos a 37°C na presença de CESAC (5, 10, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$), AFM (5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), DMSO (controle – CESAC: 0,4; AFM: 1%), Hanks (células não tratadas) ou Triton X-100 (controle positivo – 0,2%).

A seguir, os tubos de reação foram centrifugados a $755 \times g$, por 10 minutos a 4°C . Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos de células foram suspensos em 200 μL de solução de Hanks contendo 0,1% de gelatina. Uma alíquota dessa suspensão foi misturada com igual volume de Azul de Tripán, preparado a 0,1% em NaCl 0,15M e transferida para a câmara de Neubauer. Este corante é incorporado apenas por células não viáveis, devido a lesões na membrana plasmática. A proporção de células viáveis foi estimada pela contagem de 200 células em microscópio óptico.

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

Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados por 15 minutos a 37°C na presença de CESAC (5, 10, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$), AFM (5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), DMSO (controle – CESAC: 0,4; AFM: 1%), Hanks (células não tratadas) ou Triton X-100 (0,2% - controle positivo).

A seguir, os tubos de reação foram centrifugados a $755 \times g$, por 10 minutos a 4°C . Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos e mantidos em banho de gelo para a determinação da atividade da enzima LDH, cuja localização está no citoplasma da célula e é liberada quando estas são lesadas ou necrosadas. Esta enzima é responsável pela conversão de

piruvato a lactato na presença de NADH. O ensaio é realizado utilizando o Kit LDH (Liquiform) e baseia-se na medida do decréscimo da absorvância em 340nm devido à oxidação do NADH, a qual é proporcional à atividade da LDH na amostra. Alíquotas de 250 µL de substrato foram pré-incubados por 3 minutos a 37°C. Adicionou-se 25 µL da amostra de sobrenadante, homogeneizou-se a mistura e realizou-se a leitura da absorvância em 340 nm nos tempos 1 e 3 minutos a 37°C em espectrofotômetro. A atividade da enzima LDH foi calculada seguindo-se as especificações do fabricante da seguinte maneira:

$$A = [(A_1 - A_2) / 2] \times 1746,03$$

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.

A toxicidade de CESAC e de AFM foi avaliada em três experimentos independentes, com medidas em triplicata.

- **Teste do MTT**

É um método colorimétrico para determinar a viabilidade celular e se baseia no fato do MTT, sal de coloração amarela, ser reduzido pelo sistema enzimático succinato-tetrazol redutase que forma parte da cadeia respiratória da mitocôndria, a um sal, Formazan, que possui cor púrpura. Assim a ausência da redução do MTT indica uma diminuição da atividade metabólica celular, ou seja, na viabilidade celular (Mosmann, 1983).

Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados por 30 minutos a 37°C na presença de CESAC (5, 10, 50, 100 e 200 µg/mL), AFM (5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL), DMSO (controle – CESAC: 0,4; AFM: 1%), Hanks (células não tratadas) ou Triton X-100 (0,2% - controle positivo) em placa de 96 poços e atmosfera de CO₂. Decorrido esse período, a placa foi centrifugada a 2000rpm por 15 minutos a 25°C e o sobrenadante descartado e incubada uma nova solução (200 µL) contendo 10% de MTT, na concentração de 10 mg/mL, e estas células foram incubadas novamente por mais 3 horas. Por fim, a placa foi centrifugada

novamente nas mesmas condições acima, o sobrenadante foi descartado e adicionado então 150 µL de DMSO puro para a lise das células e solubilização do formazan. Neste instante, as placas foram agitadas durante 15 minutos com o auxílio de um agitador de placas. A absorvância foi medida em leitor de microplacas a 540 nm. Os experimentos foram realizados em quintuplicata e repetidos em três dias diferentes.

- **Teste de Laranja de acridina/Brometo de Etídio**

O Teste de Laranja de acridina/Brometo de etídio é utilizado para avaliação da viabilidade celular através da mensuração do índice de apoptose celular. Esta técnica descrita por McGahon et al. (1995) emprega, em uma dada população celular, uma coloração diferencial com laranja de acridina e brometo de etídio para a identificação de quatro categorias celulares determinadas em função de sua morfologia e coloração: células viáveis, apoptóticas iniciais, apoptóticas finais e necróticas.

O laranja de acridina e o brometo de etídio poder ser utilizados na identificação das células em apoptose, tanto no estágio inicial quanto no estágio tardio. O laranja de acridina se intercala no DNA, proporcionando uma coloração verde. Este corante também se liga ao RNA, mas como não se intercala, o RNA é corado em vermelho-alaranjado. Assim, uma célula viável apresenta um núcleo esverdeado e um citoplasma vermelho. O brometo de etídio penetra somente em células mortas. Este corante também se intercala no DNA, conferindo uma aparência laranja ao núcleo, mas se liga fracamente ao RNA, o qual pode aparecer ligeiramente vermelho. Assim, células vivas com membrana intacta têm uma coloração verde uniforme em seu núcleo. Células em apoptose inicial com membrana intacta, mas com fragmentação de DNA, possuem uma coloração verde em seu núcleo e citoplasma, sendo visível uma marginação de seu conteúdo celular. Células em apoptose final apresentam áreas coradas em laranja tanto no citoplasma como nos locais onde a cromatina está condensada no núcleo, o que as distinguem de células necróticas, que têm uma coloração alaranjada uniforme no núcleo.

As lâminas foram preparadas utilizando-se 25 µL de suspensão de neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL), pré-incubadas a 37°C por 15 minutos com CESAC (10, 100 e 200 µg/mL), AFM (10, 50 e 100 µg/mL), DMSO (controle – CESAC: 0,4; AFM: 1%), Hanks (células não tratadas) e Triton X-100 (controle positivo – 0,2%), e 1µL de corante (100 µg/mL de laranja de acridina e 100 µg/mL de brometo de etídio) em uma lâmina limpa e seca coberta com

lamínula. Foram analisadas 200 células por repetição com microscópio Nikon em objetiva de 60X com filtros para fluorescência (515 – 560 nm).

Para a quantificação percentual de cada evento celular (viáveis, necróticas e apoptóticas), foram contadas 300 células de cada amostra.

b. Avaliação da atividade antiinflamatória em modelos experimentais *in vivo*

• Edema de pata induzido por carragenina em camundongos

Descrito por Winter et al. (1962) o edema inflamatório induzido pela injeção de subcutânea de carragenina na pata é resultante da ação seqüenciada e integrada de vários mediadores inflamatórios que causam aumento agudo e progressivo do volume da pata. Assim, esse modelo tem sido considerado útil para avaliação da atividade antiinflamatória de novos compostos.

Camundongos Swiss, machos (25 a 30g) divididos em grupos de 6 animais foram tratados com CESAC (100, 200 e 400 mg/Kg, v.o.), indometacina (5 mg/Kg, i.p.) Tween 80 (controle - 0,4% em água destilada, v.o.) 60 minutos antes da injeção intraplantar de 100 µL da solução de carragenina a 1% na pata traseira, direita do animal. O volume da pata foi medido antes (tempo zero) e 1, 2,3 e 4 horas após a injeção de carragenina, através de pletismômetro (Ugo Basile, Itália). O volume de edema foi determinado em µL pela diferença entre o volume da pata nos referidos intervalos de tempo e o volume antes da injeção de carragenina.

• Peritonite induzida por carragenina em camundongos

O ensaio foi desenvolvido segundo protocolo experimental proposto por Ferrándiz & Alcaraz (1991). Grupos de 8 animais foram tratados com CESAC (100, 200 e 400 mg/Kg, v.o.), dexametasona (5 mg/Kg, v.o.) ou Tween 80 (controle - 0,4% em água destilada, v.o.). Decorridos 60 minutos, os animais receberam uma injeção de carragenina (10 mL/Kg, i.p.). A seguir os animais foram devolvidos às caixas e deixados com livre acesso à ração e água durante 5 horas. O exsudato peritoneal foi coletado com uma pipeta Pasteur plástica através de laparoscopia abdominal. Para coleta todos os animais receberam uma injeção de PBS (Tampão Fosfato de Sódio) heparinizado (5 UI/mL). Uma amostra do lavado peritoneal foi

diluída 1: 20 em líquido de Turk para contagem de leucócitos totais. Os resultados foram expressos em número de células/mL.

Também foram analisados no exsudato peritoneal os seguintes parâmetros antioxidantes: os níveis de glutathiona reduzida (GSH) (ELLMAN, 1959), os níveis de nitrito/nitrato (CHEN et al., 2000) e dosagens de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (HUONG et al., 1998).

c. Avaliação antiinflamatória em modelo experimental *ex vivo*: Lavado bronco-alveolar em ratos desafiados com antígeno.

• Metodologia de sensibilização dos animais

A sensibilização ao antígeno (ovalbulmina) foi realizada ativamente através da administração, por via intraperitoneal, de solução contendo 1µg/mL de ovalbulmina (OVA) e 1mg/mL de Al (OH)₃, em solução salina (NaCl 0,9%) sendo injetados 0,66 mL por animal. Este procedimento ocorreu no “dia zero”, e a partir de 13 a 14 dias após esse procedimento, este grupo de animais foi definido como sensibilizados.

• Metodologia do desafio antigênico

São considerados animais desafiados os ratos previamente sensibilizados que foram submetidos ao desafio antigênico por inalação. O desafio ocorreu 1 hora após o primeiro tratamento com CESAC (100, 200 e 400 mg/Kg, v.o.), DEXA (5 mg/kg) ou Tween 80 (controle - 0,4% em água destilada, v.o.). Para tanto, os animais foram colocados em uma caixa acrílica medindo 20 x 30 x 21 cm, que continha dois orifícios para a circulação de ar, onde em um dos quais era acoplado um nebulizador ultrassônico e expostos a nebulização com OVA durante 30 minutos, o qual estava dividido em duas sessões sequenciais de 15 minutos, onde na primeira sessão foi utilizada OVA na concentração de 1mg/mL e na segunda, OVA na concentração de 5 mg/mL. As alterações respiratórias observadas nos animais foram o desconforto respiratório caracterizado por “sibilos” e aumento do ritmo respiratório. Após esse procedimento, os animais foram definidos como desafiados.

• Efeito de CESAC no lavado bronco-alveolar de ratos desafiados com antígeno

Para avaliação do efeito de CESAC no conteúdo do lavado bronco-alveolar de ratos, os animais foram divididos nos seguintes grupos: aqueles considerados “normais”, ou

seja, não receberam nenhum tratamento sensibilizante e aqueles sensibilizados e desafiados que foram tratados com CESAC (100, 200 e 400 mg/Kg, v.o.), DEXA (5 mg/kg) ou Tween 80 (controle - 0,4% em água destilada, v.o.). Os animais foram inicialmente anestesiados com hidrato de cloral a 40% (1 mL/Kg) em altas doses. Após exposição cirúrgica e canulação da traquéia, os animais foram exsanguinados pela artéria carótida e os pulmões foram preenchidos com 5 mL de solução salina a 37°C, injetada na cânula traqueal por meio de uma seringa de 20 mL, de acordo com Hutson (1989). A seringa foi mantida conectada à cânula traqueal por três minutos e, então, o fluido injetado foi lentamente recuperado. Este procedimento foi repetido duas vezes. Os fluidos recuperados foram misturados e acondicionados em tubos de ensaio e divididos em duas partes: uma amostra do lavado peritoneal foi diluída 1: 20 em líquido de Turk para contagem de leucócitos totais. Os resultados foram expressos em número de células/mL. A outra parte foi utilizada para determinação dos seguintes parâmetros antioxidantes: os níveis de glutathiona reduzida (GSH), os níveis de nitrito e dosagens de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).

d. Efeito do CESAC e da AFM sobre a desgranulação de neutrófilos ativados por fMLP ou PMA mensurada pela inibição da enzima mieloperoxidase

Desgranulação dos neutrófilos. A suspensão de neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foi pré-incubada com CESAC (5, 10, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$), AFM (0,1; 3; 6; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), indometacina (100 μM), DMSO (controle – CESAC: 0,4; AFM: 1%) ou solução de Hanks (células não tratadas). A seguir foi adicionado citocalasina B (10 μM) e fMLP (100 nM), por 10 minutos a 37°C ou PMA (0,1 μM) por 15 minutos a 37°C. Decorridos esse tempo, o material foi centrifugado durante 10 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido, rico em enzimas liberadas pela desgranulação leucocitária, foi utilizado nos ensaios enzimáticos realizados segundo metodologia descrita por Úbeda e colaboradores (2002).

Determinação da concentração de MPO. Aos 50 μL do sobrenadante foi adicionado PBS (100 μL), tampão fosfato (50 μL) e H_2O_2 (0,012%). Após 5 minutos a 37°C foi acrescido 20 μL de 3,3',3,5'-tetrametilbenzidina (TMB 1,5 mM) e a reação foi interrompida pela adição de 30 μL de acetato de sódio (1,5 M; pH 3,0). A absorbância foi determinada em 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 foram expressos como percentual de inibição da desgranulação neutrofílica (De Young et al., 1989).

- **Efeito do CESAC e da AFM sobre a atividade da enzima mieloperoxidase**

No intuito de avaliar o efeito de CESAC ou AFM sobre a atividade da enzima mieloperoxidase, o método descrito acima foi utilizado, mas desta vez, neutrófilos humanos foram primeiramente estimulados com PMA (0,1 μ M) e então alíquotas do sobrenadante foram incubadas com CESAC (5, 10, 25, 50, 100 e 200 μ g/mL) ou AFM (3; 6; 12,5; 25; 50 e 100 μ g/mL) por 15 minutos, seguido da determinação da atividade de MPO como descrito acima (Andrews & Krinsky, 1981).

- **Efeito do CESAC e da AFM sobre a atividade da enzima elastase**

Na tentativa de esclarecer o mecanismo de ação de CESAC e AFM, foi avaliado o efeitos de ambos sobre a atividade catalítica da enzima elastase, utilizando a técnica descrita por Johansson et al. (2002) e modificada por Kanashiro et al. (2007). Para o isolamento da enzima elastase, em um tubo, incubaram-se 4,5 mL de neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) com 250 μ L de citocalasina B (1 μ M) a 37°C por 10 minutos. Em seguida, a desgranulação foi ativada pela adição de 250 μ L de fMLP (1 μ M). Simultaneamente, fez-se o tubo controle negativo (branco), contendo apenas neutrófilos e solução de Hanks. Após a incubação por 30 minutos a 37°C, os tubos de reação foram centrifugados a 755 x g por 10 minutos. O sedimento, contendo células, foi desprezado e o sobrenadante, rico em elastase, foi utilizado no ensaio para determinar a atividade desta enzima.

Em microplaca, 200 μ L de sobrenadante foram colocados na presença de CESAC (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 μ g/mL), AFM (5, 10, 25, 50 e 100 μ g/mL), DMSO (controle – CESAC: 0,4; AFM: 1%) ou Hanks (células não tratadas). Como controle negativo utilizou-se o sobrenadante dos neutrófilos não estimulados. Finalmente o substrato SAAVNA (1mM) foi adicionado e, imediatamente, realizada a leitura da absorvância (tempo zero) em leitor de microplacas, em comprimento de onda de 405 nm. A placa foi mantida a 37°C por 20 minutos e, em seguida, realizada outra a 405 nm para quantificar a produção de p-nitroanilina durante este período. Os valores de absorvância obtidos nos ensaios foram tratados da seguinte forma:

$$\Delta \text{ Abs} = \text{ Abs}_{(20)} - \text{ Abs}_{(0)}$$

Onde:

$\Delta \text{ Abs}$ – variação na absorvância durante 20 minutos;

Abs₍₂₀₎ – absorvância em 405 nm no tempo 20;

Abs₍₀₎ – absorvância em 405 nm no tempo 0 (esta leitura é feita imediatamente após a adição do substrato).

Os valores de Δ Abs obtidos nos poços-teste de cada experimento foram comparados com os valores de DMSO para verificar se CESAC ou AFM possuem atividade modulatória sobre a atividade da enzima elastase.

- **Efeito de CESAC e AFM sobre os níveis de TNF α**

A suspensão de neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ céls/ml) foi pré-incubada durante 15 min a 37°C com CESAC (5, 10, 50, 100 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou AFM (5,10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), DMSO (controle – CESAC: 0,4; AFM: 1%) ou solução de Hanks (células não tratadas). Alíquotas da suspensão (500 μL) foram incubadas em banho-maria (37°C) durante 15 minutos na presença de PMA (0,1 μM). Decorridos esse tempo, o material foi centrifugado durante 10 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido, rico em enzimas liberadas pela desgranulação leucocitária, foi utilizado no ensaio para determinação dos níveis de TNF α . O teor de TNF- α liberado foi determinado pela técnica de ELISA, de acordo com as orientações descritas pelo fabricante (Bioscience, USA).

- e. **Avaliação do Efeito Antioxidante *in vitro***

- **Ensaio de Quimioluminescência**

A quimioluminescência (QL) é amplamente utilizada como um método para quantificar a capacidade dos neutrófilos de produzir EROs (Kudoh et al., 1999). Com o auxílio de marcadores luminescentes (sondas) é possível quantificá-las e diferenciá-las. As sondas são utilizadas para aumentar a quantidade de luz emitida durante a produção de EROs. Estas sondas são substâncias orgânicas que servem de substrato para reações redox, que geram intermediários eletronicamente excitados que, retornando a um estágio basal emitem fótons, os quais podem ser quantificados como quimioluminescência. As sondas utilizadas foram: a lucigenina (QLluc), que detecta principalmente o radical ânion superóxido (O_2^-), liberado no meio extracelular, e o luminol (QLlum) que detecta a somatória de diversos metabólitos intracelulares produzidos pela ação da MPO.

Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram pré-incubados em banho-maria a 37°C por 2 minutos na presença de ESPC ou AFM em diferentes concentrações e das sondas quimioluminescentes luminol ($280 \mu\text{M}$) ou lucigenina ($150 \mu\text{M}$). Em seguida, os tubos foram transportados para o luminômetro e a eles adicionados 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 . Como controle do solvente utilizou-se DMSO nas concentrações finais de 0,4% ou 1%. Em todos os ensaios realizados mediu-se a produção espontânea de QLum e QLuc dos neutrófilos na ausência de estímulo. Os resultados foram expressos através da inibição da produção de quimioluminescência.

- **Teste do DPPH**

O radical DPPH (1,1-difenil-2-picril hidrazina) é considerado um radical estável e tem sua absorção máxima em 517 nm. Este radical é utilizado como ferramenta para estudar a ação de compostos como seqüestradores de radicais livres, sendo uma técnica independente de qualquer atividade enzimática. Quando o DPPH um elétron ou um átomo de hidrogênio para se tornar um composto mais estável, sua absorção diminui.

O método descrito por Saint-Cricq et al. (1999) utiliza uma alíquota (0,1 mL) de CESAC (10, 50 e $100 \mu\text{g/mL}$) ou AFM (10, 50 e $100 \mu\text{g/mL}$) que foi misturada com 3,9 mL de DPPH (0,3 mM numa solução de metanol-etanol 1:1). A seguir as soluções foram misturadas com auxílio de vortex por 1 minuto, mantidas em uma temperatura ambiente por 30 minutos e a absorbância foi determinada em 517 nm.

O percentual de inibição foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = [A_0 - (A_c/A_0)] \times 100$$

Onde:

A_0 = absorvância do controle (sem ESPC ou AFM)

A_c = absorvância da solução com ESPC ou AFM

4.3. 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 $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da toxicidade da CESAC e AFM sobre neutrófilos humano

- Efeito da CESAC e AFM sobre a avaliação de citotoxicidade – ensaio de exclusão ao corante Azul de Tripán

O ensaio de viabilidade celular pelo corante azul de tripan em neutrófilos humano permitiu diferenciar células viáveis (não coradas) de células não-viáveis (azul).

Na análise realizada após 15 minutos de incubação com a CESAC (10, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$), sendo correspondente a $95,0 \pm 1,4$; $97,1 \pm 0,86$ e $97,7 \pm 1,29$ %, respectivamente (**Tabela 4**). Resultados semelhantes foram obtidos com a AFM (10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), não foi observada alteração no percentual de células viáveis, sendo correspondentes a $98,5 \pm 0,5$; $99 \pm 0,1$ e $97,3 \pm 0,3$ %, respectivamente (**Tabela 5**).

Vale ressaltar que tanto a CESAC quanto a AFM não causaram redução das células viáveis, sendo estes valores maiores que 95 %, indicando que ambas as drogas não foram citotóxicas.

- Efeito da CESAC e AFM sobre a atividade da enzima Lactato desidrogenase (LDH)

As **figuras 10 e 11** representam o efeito da CESAC e AFM, respectivamente, sobre a toxicidade de neutrófilos mensurada através da enzima LDH. Observou-se que a CESAC (5, 10, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) não promoveu aumento da atividade da LDH, o que indica baixa toxicidade, ($20,76 \pm 2,5$; $24,75 \pm 3,3$; $35,28 \pm 2,2$; $33,3 \pm 1,03$ e $42,02 \pm 4,22$ U/L) quando comparada ao grupo veículo ($41,66 \pm 4,6$ U/L). Resultados semelhantes foram obtidos com a AFM (1, 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) que também não apresentou citotoxicidade, medida pela atividade de LDH ($30,04 \pm 2,8$; $29,86 \pm 1,19$; $30,19 \pm 3,7$ e $38,14 \pm 3,3$ U/L) quando comparada ao veículo ($17,63 \pm 1,1$ U/L). Os resultados corroboram com aqueles encontrados para a contagem celular utilizando o corante Azul de Tripán.

Tabela 4 - Avaliação da toxicidade da CESAC em neutrófilos humano através da exclusão ao corante Azul de Tripan.

Grupos	Número de células (%)	
	Viáveis	Não-viáveis
HBSS	93,66±2,47	6,34±1,07
Veículo	93,47±2,5	6,53±1,32
CESAC 10 µg/mL	95,0±1,4	2,50±0,50
100 µg/mL	97,1±0,86	1,85±0,14
200 µg/mL	97,7±1,29	1,28±0,28
Triton- X 100 (0,2%)	0,33±0,033*	99,67±0,33*

Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com CESAC (10, 100 e 200 µg/mL) durante 15 minutos e aos pellets foi adicionado Azul de Tripan 0,1% em solução salina. A seguir, foi realizada a contagem de células, diferenciando-as em viáveis e não-viáveis. HBSS: células não tratadas; Tx: Triton X – 100 (0,2%, v/v) – padrão citotóxico; Veículo: DMSO 0,04%. Os resultados estão sendo expressos como média ± E.P.M. * vs HBSS ($p < 0,001$ – ANOVA e Teste de Tukey).

Tabela 5 - Avaliação da toxicidade da AFM em neutrófilos humano através da exclusão ao corante Azul de Tripan.

Grupos	Número de células (%)	
	Viáveis	Não-viáveis
HBSS	95,63±2,47	3,67±1,2
Veículo	91,50±2,5	7,33±1,85
AFM 10 µg/mL	98,5±0,5	2,47±0,29
50 µg/mL	99±0,1	1,33±0,33
100 µg/mL	97,3±0,3	1,33±0,33
Triton-X 100 (0,2%)	0,33±0,033*	99,67±0,33*

Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com AFM (10, 50 e 100 µg/mL) durante 15 minutos e aos pellets foi adicionado Azul de Tripan 0,1% em solução salina. A seguir, foi realizada a contagem de células, diferenciando-as em viáveis e não-viáveis. HBSS: células não tratadas; Tx: Triton X – 100 (0,2%, v/v) – padrão citotóxico; Veículo: DMSO 1%. Os resultados estão sendo expressos como média ± E.P.M. * vs HBSS ($p < 0,001$ – ANOVA e Teste de Tukey).

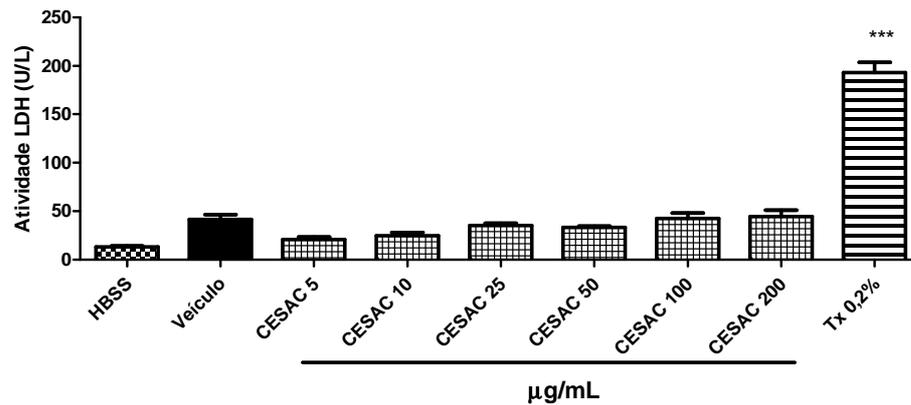


Figura 10. Avaliação da toxicidade da CESAC em neutrófilos humano mensurada através da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH). Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com CESAC (5, 10, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) e após 15 minutos foi determinada a atividade da enzima LDH. HBSS: células não tratadas; Tx: Triton X – 100 (0,2%, v/v) – padrão citotóxico; Veículo: DMSO 0,04%. Os resultados estão sendo expressos como média \pm E.P.M. * vs HBSS ($p < 0,001$ – ANOVA e Teste de Tukey).

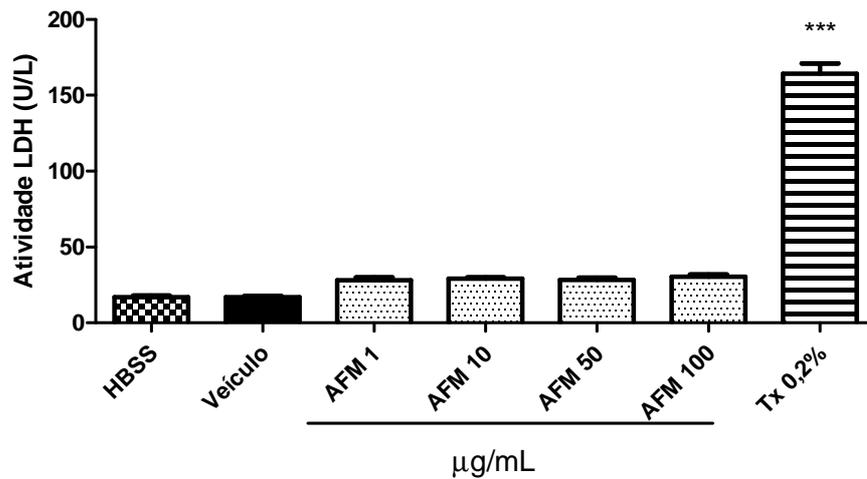


Figura 11. Avaliação da toxicidade da AFM em neutrófilos humano mensurada através da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH). Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com AFM (1, 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) e após 15 minutos foi determinada a atividade da enzima LDH. HBSS: células não tratadas; Tx: Triton X – 100 (0,2%, v/v) – padrão citotóxico; Veículo: DMSO 1%. Os resultados estão sendo expressos como média \pm E.P.M. * vs HBSS ($p < 0,001$ – ANOVA e Teste de Tukey).

- Efeitos de CESAC e AFM sobre a avaliação de citotoxicidade mensurada através do teste de MTT

Na **Figura 12** pode ser observado que a adição da CESAC em concentrações crescentes (5, 10, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) aos neutrófilos humano não causou redução ($71,65 \pm 2,89$; $70,31 \pm 0,88$; $71,9 \pm 1,12$; $73,68 \pm 2,7$ e $82,07 \pm 0,91$ %) da viabilidade celular avaliada pelo teste de MTT quando comparado ao veículo ($78,61 \pm 2,48$ %). À semelhança de CESAC, a AFM (5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) também não promoveu redução significativa da viabilidade celular ($71,84 \pm 2,01$; $73,15 \pm 1,77$; $70,22 \pm 1,8$; $71,35 \pm 1,50$ e $70,21 \pm 2,15$ %; respectivamente) em relação ao veículo ($70,33 \pm 2,47$ %). Já o Triton X-100 (padrão citotóxico) apresentou redução da viabilidade celular igual a $22,34 \pm 1,40$ % para CESAC e $18,80 \pm 1,49$ %. Os resultados mostram que ambas as drogas teste não foram citotóxicas nas concentrações testadas (**Figura 13**).

- Efeitos de CESAC e AFM sobre o padrão de morte celular: marcação diferencial por Laranja de Acridina/Brometo de Etídio (LA/BE)

Os efeitos de CESAC e AFM sobre o padrão de morte celular estão representados nas **Tabelas 6 e 7**, respectivamente. A CESAC nas concentrações de 10, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ promoveu redução significativa no número de células viáveis ($82,67 \pm 0,93$; $79,50 \pm 0,67$ e $70,83 \pm 3,8$ % ; respectivamente) em detrimento das células em processo apoptótico ($11,42 \pm 0,77$; $13,75 \pm 0,56$ e $20,75 \pm 3,36$ %; respectivamente) e necrótico ($5,91 \pm 0,55$; $6,83 \pm 0,98$ e $8,41 \pm 0,55$ %; respectivamente). A AFM (10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), por sua vez, não apresentou citotoxicidade já que não houve redução ($88,67 \pm 1,67$; $89,25 \pm 0,34$ e $91,83 \pm 0,70$, respectivamente) da viabilidade celular nas concentrações testadas, também foi observado que à medida que ocorreu o aumento da concentração, as quantidades de células necróticas ($2,47 \pm 0,29$; $1,33 \pm 0,33$ e $1,58 \pm 0,54$; respectivamente) e apoptóticas ($7,08 \pm 0,5$; $7,33 \pm 0,5$ e $6,58 \pm 1,2$; respectivamente) diminuíram.

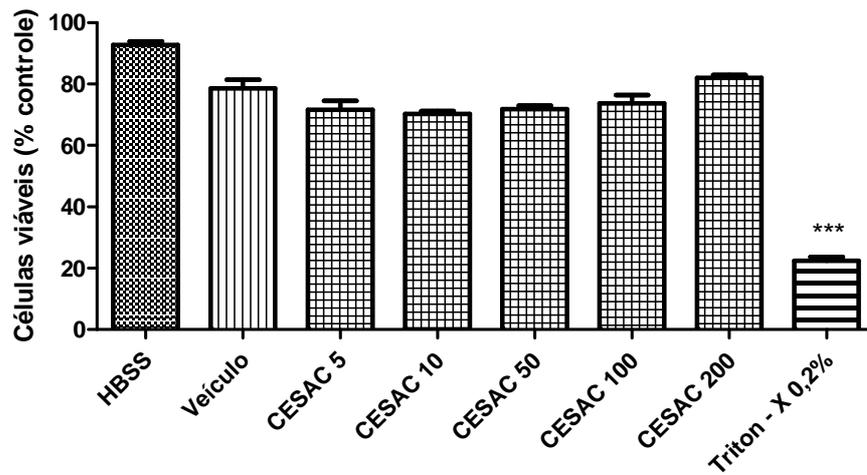


Figura 12. Efeito de CESAC sobre a citotoxicidade determinada através do teste de MTT. Neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados com CESAC (5, 10, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) e 3h depois foi avaliada a viabilidade celular através do teste de MTT. HBSS: células não tratadas; Tx: Triton X – 100 (0,2%, v/v) – padrão citotóxico; Veículo: DMSO 0,04. Os resultados estão sendo expressos como média \pm E.P.M. * vs Controle ($p < 0,001$ – ANOVA e Teste de Tukey).

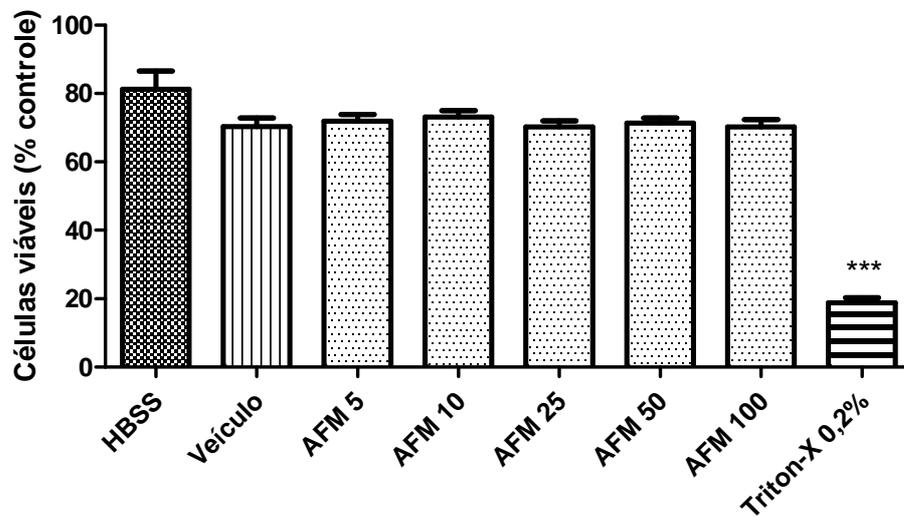


Figura 13. Efeito de AFM sobre a citotoxicidade determinada através do teste de MTT. Neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados com AFM (5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) e 3h depois foi avaliada a viabilidade celular através do teste de MTT. HBSS: células não tratadas; Tx: Triton X – 100 (0,2%, v/v) – padrão citotóxico; Veículo: DMSO 1%. Os resultados estão sendo expressos como média \pm E.P.M. * vs Controle ($p < 0,001$ – ANOVA e Teste de Tukey).

Tabela 6 - Efeito de CESAC sobre o padrão de morte celular em neutrófilos humano através de marcação por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina

Grupos	Número de células (%)		
	Viáveis	Necróticas	Apoptóticas
HBSS	93 ± 2,11	2,90 ± 0,42	2,33 ± 0,33
Veículo	92,42 ± 1,53	3,41 ± 0,34	5,00 ± 0,82
CESAC 10 µg/mL	82,67±0,93 ^c	5,91±0,55 ^{a,b}	11,42±0,77 ^{a,b}
100 µg/mL	79,50±0,67	6,83±0,98 ^{a,b}	13,75±0,56 ^b
200 µg/mL	70,83±3,8	8,41±0,55 ^{a,b}	20,75±3,36 ^b
Triton-X 100 (0,2%)	0±0 ^a	99,67±0,33 ^{a,b}	0±0 ^{a,b}

Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com CESAC (10, 100 e 200 µg/mL) e coradas com Brometo de Etídio/Laranja de Acridina. A seguir, foi realizada a contagem de células, diferenciando-as em viáveis, apoptóticas e necróticas. HBSS: células não tratadas; ; Tx: Triton X – 100 (0,2%, v/v) – padrão citotóxico; Veículo: DMSO 0,4% - veículo. Os resultados estão sendo expressos como média ± E.P.M. **a** vs HBSS; **b** vs Veículo (DMSO 0,4% v/v); **c** vs CESAC 200 µg/mL ($p < 0,001$ – ANOVA e Teste de Tukey).

Tabela 7 - Efeito de AFM sobre o padrão de morte celular em neutrófilos humano através da marcação por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina

Grupos	Número de células (%)		
	Viáveis	Necróticas	Apoptóticas
HBSS	93±2,11	3,67±1,2	4,08±1,76
Controle	91,92±1,96	7,33±1,86 ^a	5±0,82
AFM 10 µg/mL	88,67±1,27	2,47±0,29 ^b	7,08±0,5 ^a
50 µg/mL	89,25±0,34	1,33±0,33 ^{a,b}	7,33±0,5 ^a
100 µg/mL	91,83±0,70	1,58±0,54 ^{a,b}	6,58±1,2 ^a
Triton-X 100 (0,2%)	0±0 ^{a,b}	99,67±0,33 ^{a,b}	0±0 ^{a,b}

Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com AFM (10, 50 e 100 µg/mL) e coradas com Brometo de Etídio/Laranja de Acridina. A seguir, foi realizada a contagem de células, diferenciando-as em viáveis, apoptóticas e necróticas. HBSS: células não tratadas; Tx: Triton X – 100 (0,2%, v/v) – padrão citotóxico; Controle: DMSO 1% - veículo. Os resultados estão sendo expressos como média ± E.P.M. **a** vs HBSS; **b** vs Controle (DMSO 1% v/v) ($p < 0,001$ – ANOVA e Teste de Tukey).

5.2. Avaliação da atividade antiinflamatória das Cápsulas do Extrato Seco de *A. cearensis* (CESAC) em modelos experimentais *in vivo*

- Edema de pata induzido por carragenina

O pré-tratamento de animais com CESAC (100, 200 e 400 mg/kg, v.o.) promoveu redução significativa do volume (μL) do edema de pata nas doses de 200 e 400 mg/kg na 2^a h ($95,02 \pm 7,10$ e $97,21 \pm 8,60$; respectivamente), 3^a h ($100,03 \pm 10,70$ e $92,65 \pm 9,20$; respectivamente) e 4^a h ($88,42 \pm 8,9$ e $84,66 \pm 9,2$; respectivamente) após a injeção de carragenina, quando comparada ao grupo controle (2^a h: $126,12 \pm 6,20$; 3^a h: $141,32 \pm 6,20$ e 4^a h: $139,74 \pm 7,20$). A indometacina (5 mg/kg), utilizada como droga padrão, também inibiu significativamente o volume (μL) do edema de pata (2^a h: $84,05 \pm 8,10$; 3^a h: $73,63 \pm 7,20$ e 4^a h: $80,21 \pm 5,00$) (**Figura 14**).

- Peritonite induzida por carragenina

O efeito de CESAC sobre a migração de leucócitos ($\times 10^6$ células/mL) induzida por carragenina estão representados na **Figura 15**. A CESAC (100, 200 e 400 mg/kg, v.o.) reduziu significativamente o número de leucócitos no infiltrado peritoneal ($0,53 \pm 0,039$; $0,43 \pm 0,035$ e $0,35 \pm 0,07$; respectivamente), à semelhança da dexametasona ($0,22 \pm 0,033$) quando comparados ao grupo controle ($0,86 \pm 0,05$). Os valores corresponderam a inibições de 38, 50 e 60 % da migração celular, respectivamente (**Figura 15**). Análise bioquímica do exsudato peritoneal mostrou que a CESAC (100, 200 e 400 mg/kg) foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica induzida por carragenina ($0,16 \pm 0,036$; $0,07 \pm 0,002$ e $0,05 \pm 0,008$; respectivamente; controle: $0,27 \pm 0,038$), que corresponderam a inibições de 40,7; 50 e 60%, respectivamente (**Figura 16**).

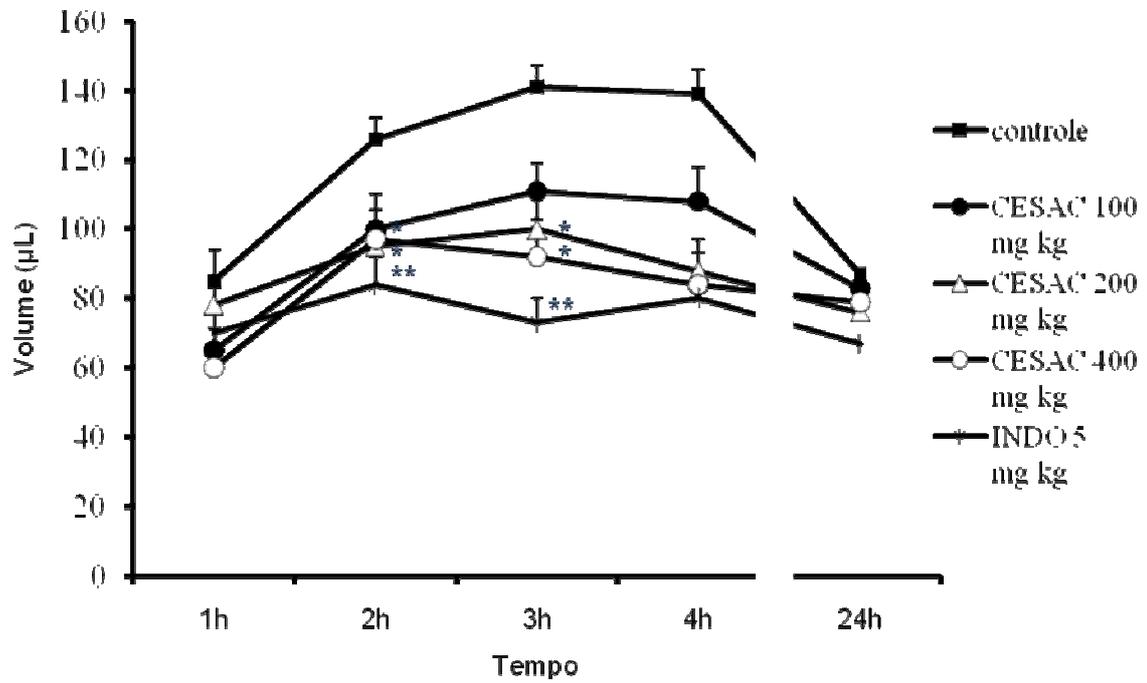


Figura 14. Atividade antiedematogênica da CESAC induzido por carragenina em camundongos. Camundongos Swiss (25 a 30 g) foram tratados por via oral com CESAC (100, 200 e 400 mg/kg), indometacina (INDO, 5 mg/kg) ou Tween 80 (controle) 60 minutos antes da injeção intraplantar da solução de carragenina 1% (20 µL). Os valores representam a média ± E.P.M. de 8 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs grupo controle (ANOVA e Teste de Tukey).

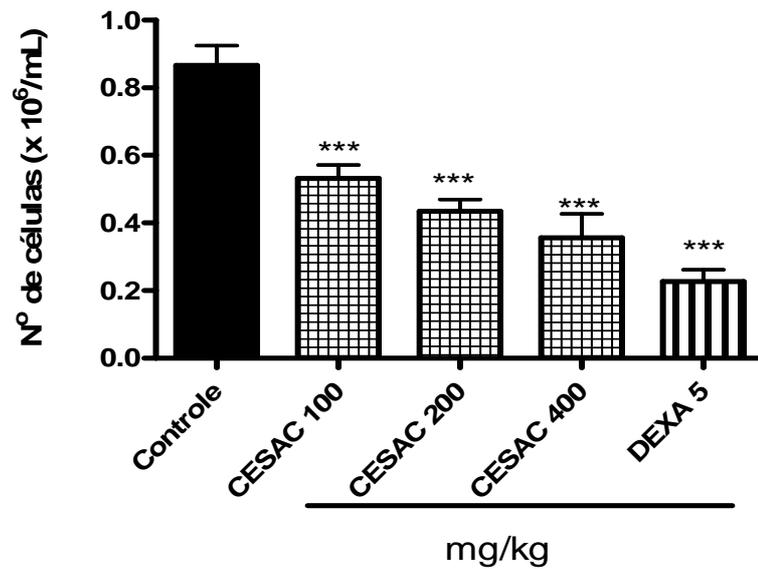


Figura 15. Efeito de CESAC na migração de leucócitos induzida por carragenina na cavidade peritoneal de camundongos. Os animais foram tratados com CESAC (100, 200 e 400 mg/kg), dexametasona (5 mg/kg, DEXA) ou Tween 80 (controle) 60 minutos antes da indução através da injeção intraperitoneal de carragenina 1%. Os valores expressam a média \pm E.P.M. de 8 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs grupo controle (ANOVA e Teste de Tukey).

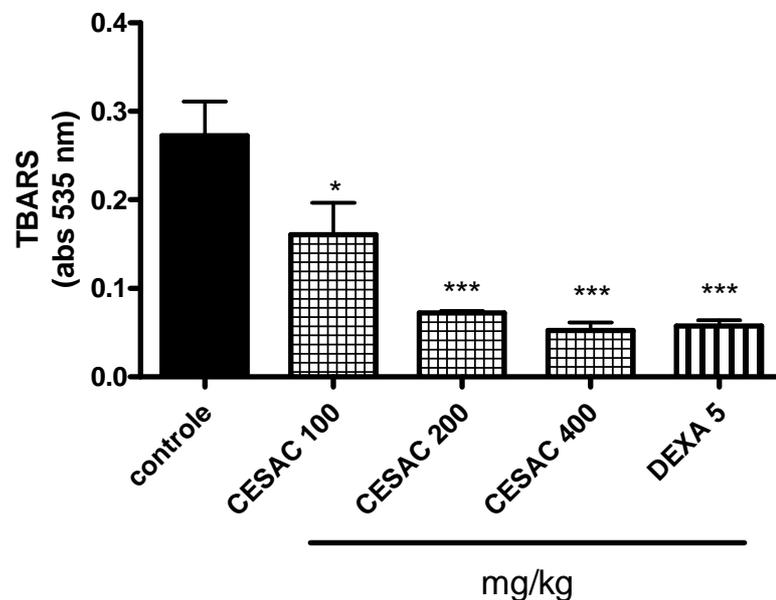


Figura 16. Efeito de CESAC sobre a peroxidação lipídica, mensurada através dos níveis de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) presentes no exsudato peritoneal de camundongos. Os animais foram tratados com CESAC (100, 200 e 400 mg/kg), dexametasona (5 mg/kg, DEXA) ou Tween 80 (controle) 60 minutos antes da injeção intraperitoneal de carragenina 1%. Os valores representam a média \pm E.P.M. de 8 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs grupo controle (ANOVA e Teste de Tukey).

5.3. Avaliação da atividade antiinflamatória das Cápsulas do Extrato Seco de *A. cearensis* (CESAC) no lavado broncoalveolar (LBA) de ratos desafiados com ovalbulmina (OVA)

O desafio antigênico dos animais com OVA promoveu um acúmulo de células inflamatórias ($0,5395 \pm 0,043$) quase 3 vezes superior em relação aos animais não desafiados ($0,1985 \pm 0,004$). Porém, o pré-tratamento dos animais desafiados com CESAC (100, 200 e 400 mg/kg, v.o.) reduziu de forma significativa ($P < 0,001$) o número de leucócitos totais no lavado broncoalveolar ($0,2389 \pm 0,018$; $0,1094 \pm 0,019$ e $0,1073 \pm 0,018$) quando comparado ao grupo controle ($0,5395 \pm 0,043$) (**Figura 17**).

Análises bioquímicas do LBA dos animais desafiados mostraram que a CESAC (100, 200 e 400 mg/kg, v.o.) reduziu significativamente os níveis de nitrito/nitrato ($12,88 \pm 1,25$; $11,68 \pm 11,71$ e $11,56 \pm 1,12$, respectivamente quando comparado ao grupo controle: $24,30 \pm 2,8$) (**Figura 18**), e de TBARS ($0,1850 \pm 0,019$ e $0,1168 \pm 0,021$; respectivamente quando comparado ao grupo controle: $0,318 \pm 0,031$) (**Figura 20**). O pré-tratamento dos animais com CESAC aumentou significativamente o nível de GSH, levando à normalidade a concentração de GSH (Normal/sem OVA: $0,03095 \pm 0,002$; CESAC: $0,0277 \pm 0,002$; $0,0270 \pm 0,0010$ e $0,03055 \pm 0,00098$; respectivamente) no LBA (**Figura 19**).

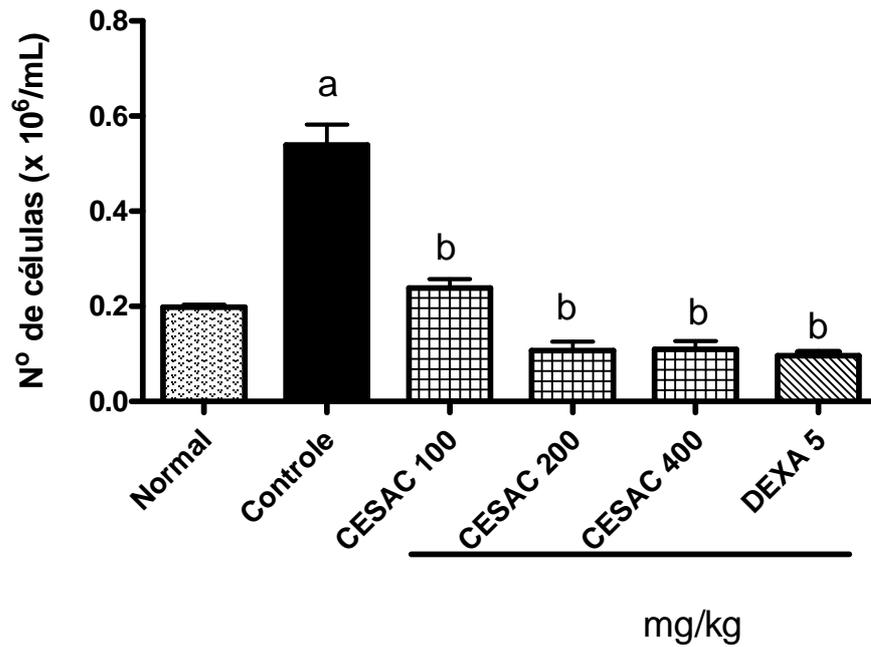


Figura 17. Efeito de CESAC sobre a migração celular no lavado bronco-alveolar de ratos desafiados por ovalbulmina. Os animais foram tratados com CESAC (100, 200 e 400 mg/kg), DEXA (5 mg/kg) ou Tween 80 (controle) 60 minutos antes do desafio com ovalbulmina. Os valores representam a média \pm E.P.M. de 8 animais por grupo, **a** vs grupo normal (não sensibilizado e não desafiado), **b** vs grupo controle ($p < 0,05$ - ANOVA e Teste de Tukey).

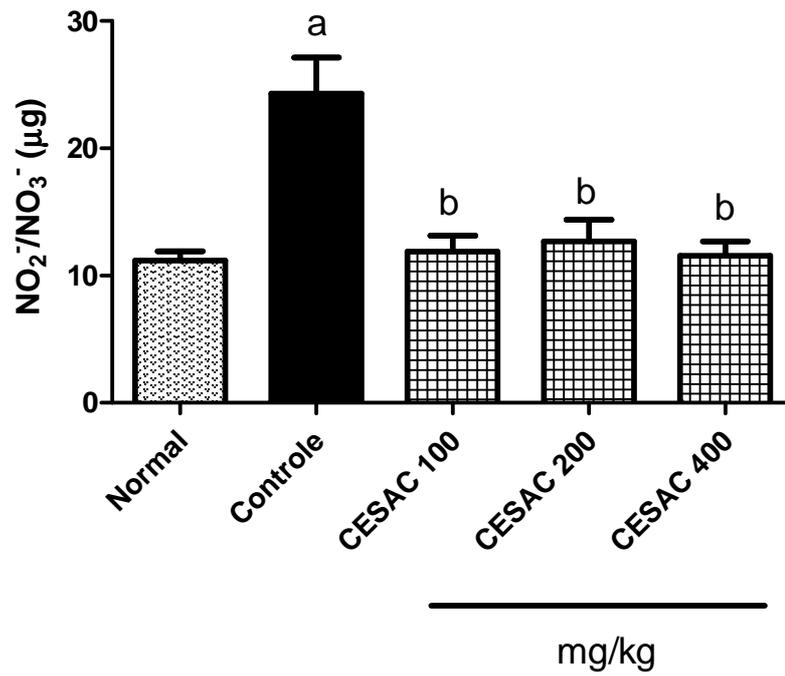


Figura 18. Efeito de CESAC sobre os níveis de nitrito/nitrato presentes no lavado bronco-alveolar de ratos desafiados por ovalbulmina. Os animais foram tratados com CESAC (100, 200 e 400 mg/kg) ou Tween 80 (controle) 60 minutos antes do desafio com ovalbulmina. Os valores representam a média \pm E.P.M. de 8 animais por grupo, **a** vs grupo normal (não sensibilizado e não desafiado), **b** vs grupo controle ($P < 0,05$ - ANOVA e Teste de Tukey).

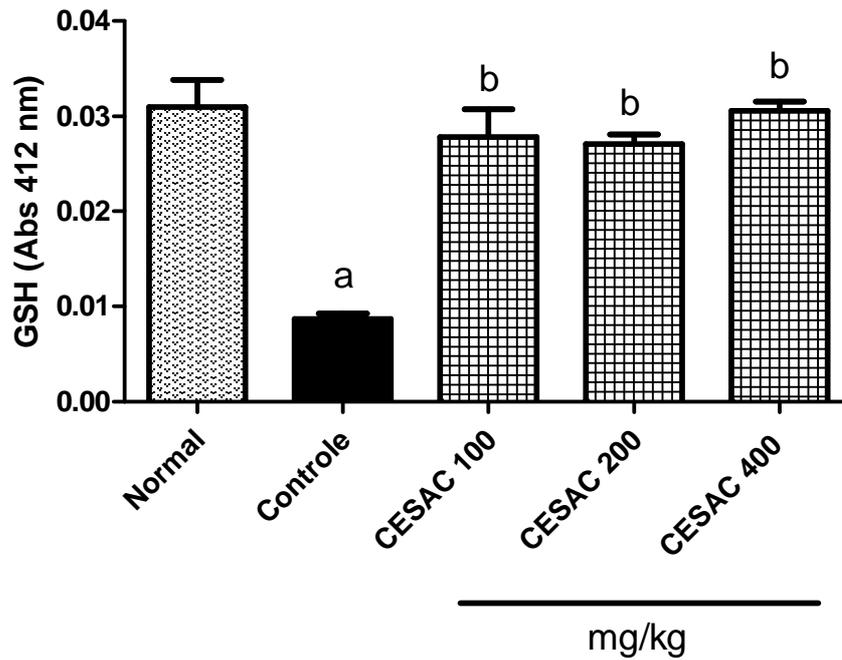


Figura 19. Efeito de CESAC sobre os níveis de glutatona reduzida presentes no lavado bronco-alveolar de ratos desafiados por ovalbulmina. Os animais foram tratados com CESAC (100, 200 e 400 mg/kg) ou Tween 80 (controle) 60 minutos antes do desafio com ovalbulmina. Os valores representam a média \pm E.P.M. de 8 animais por grupo, **a** vs grupo normal (não sensibilizado e não desafiado), **b** vs grupo controle ($P < 0,05$ - ANOVA e Teste de Tukey).

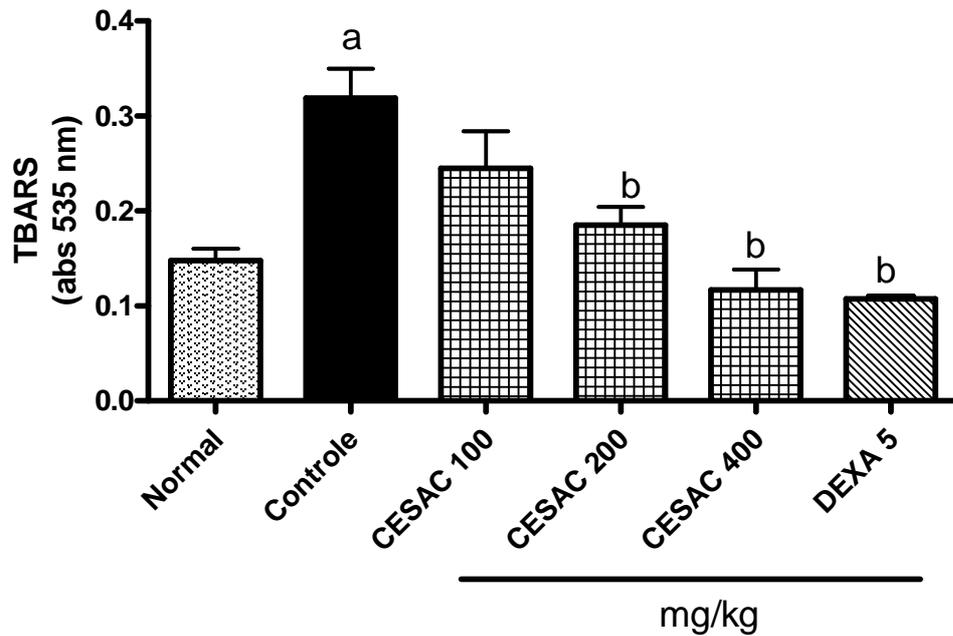


Figura 20. Efeito de CESAC sobre a peroxidação lipídica, mensurada através dos níveis de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) presentes no lavado bronco-alveolar de ratos desafiados por ovalbulmina. Os animais foram tratados com CESAC (100, 200 e 400 mg/kg), DEXA (5 mg/kg) ou Tween 80 (controle) 60 minutos antes do desafio com ovalbulmina. Os valores representam a média \pm E.P.M. de 8 animais por grupo, **a** vs grupo normal (não sensibilizado e não desafiado), **b** vs grupo controle ($P < 0,05$ - ANOVA e Teste de Tukey).

5.4. Avaliação da atividade antiinflamatória de CESAC e AFM em modelos experimentais *in vitro*

- **Efeito da CESAC e da AFM na desgranulação de neutrófilos humano induzida por fMLP ou PMA : liberação da enzima mieloperoxidase**

Os efeitos de CESAC e AFM sobre a inibição da desgranulação de neutrófilos humano estão representados na **Figura 21 e 22, e Tabela 8**. A CESAC (5, 10, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) inibiu significativamente a liberação de MPO induzida por PMA, com inibição de até 72% ($\text{CI}_{50} = 13,36 \mu\text{g/mL}$). A indometacina (35,7 $\mu\text{g/mL}$), droga padrão, inibiu em 77% a desgranulação dos neutrófilos. Resultados semelhantes foram obtidos utilizando como estímulo o fMLP, sendo a inibição máxima de 65% ($\text{CI}_{50} = 19,40 \mu\text{g/mL}$) (**Figura 21**).

A AFM (0,1; 3; 6; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) também reduziu a desgranulação de neutrófilos induzida por PMA, com inibição máxima da liberação de MPO de até 86% ($\text{CI}_{50} = 0,109 \mu\text{g/mL}$) (**Figura 22**), enquanto que em neutrófilos estimulados com fMLP essa inibição foi menos expressiva, sendo máxima de 66% ($\text{CI}_{50} = 19,94$).

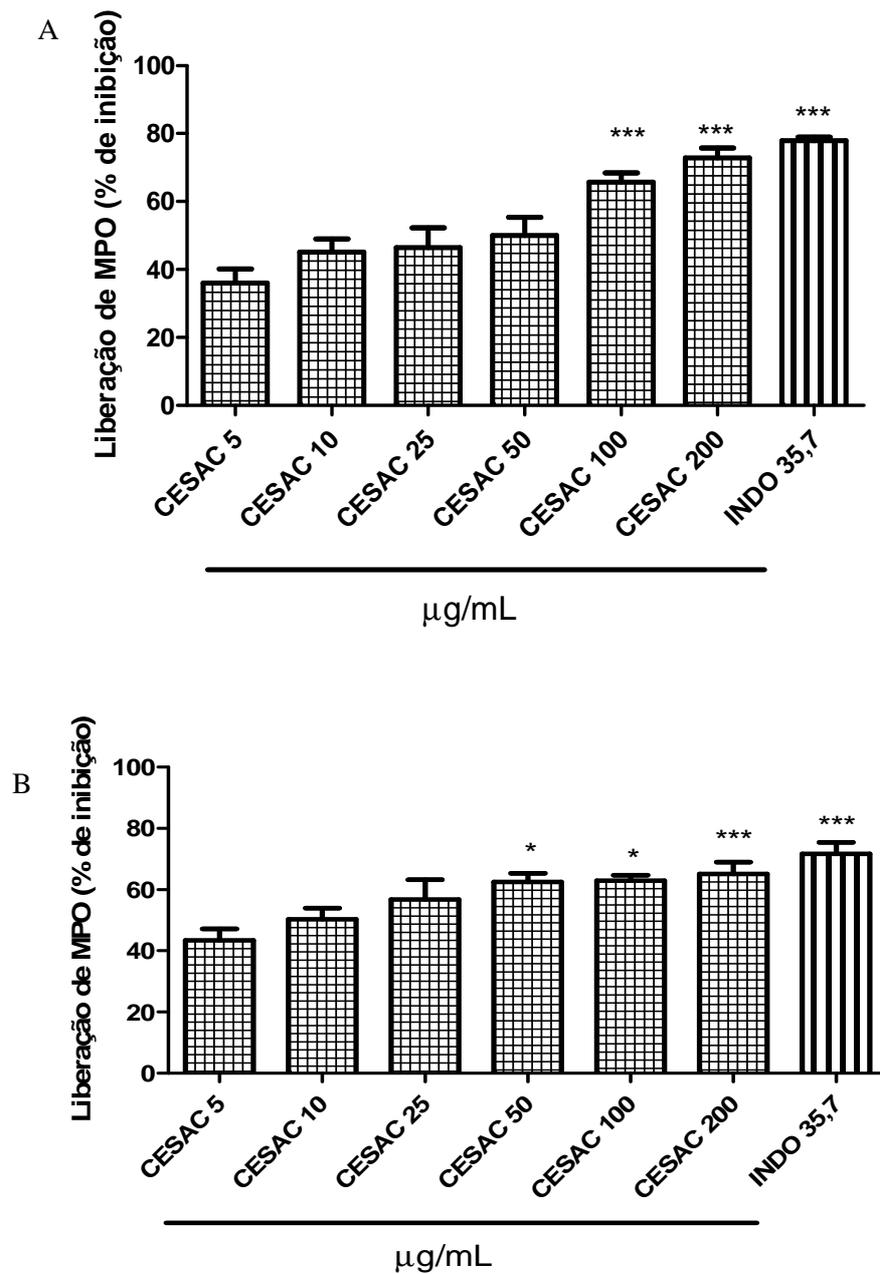


Figura 21. Efeito de CESAC sobre a desgranulação neutrofílica induzida por PMA (A) ou fMLP (B) e determinada pela inibição da liberação da mieloperoxidase. Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com CESAC (5, 10, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) e posteriormente estimulados com PMA (0,1 $\mu\text{mol/L}$) ou fMLP (100 nM). CESAC: cápsulas de extrato seco de *A. cearensis*; INDO: indometacina, droga padrão. Os resultados obtidos na presença de CESAC foram comparados ao grupo controle (100% da liberação de MPO). Os valores estão sendo expressos como média \pm E.P.M. As análises foram realizadas em triplicatas em três dias diferentes. * vs CESAC 5 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,05$ - ANOVA e Teste de Tukey).

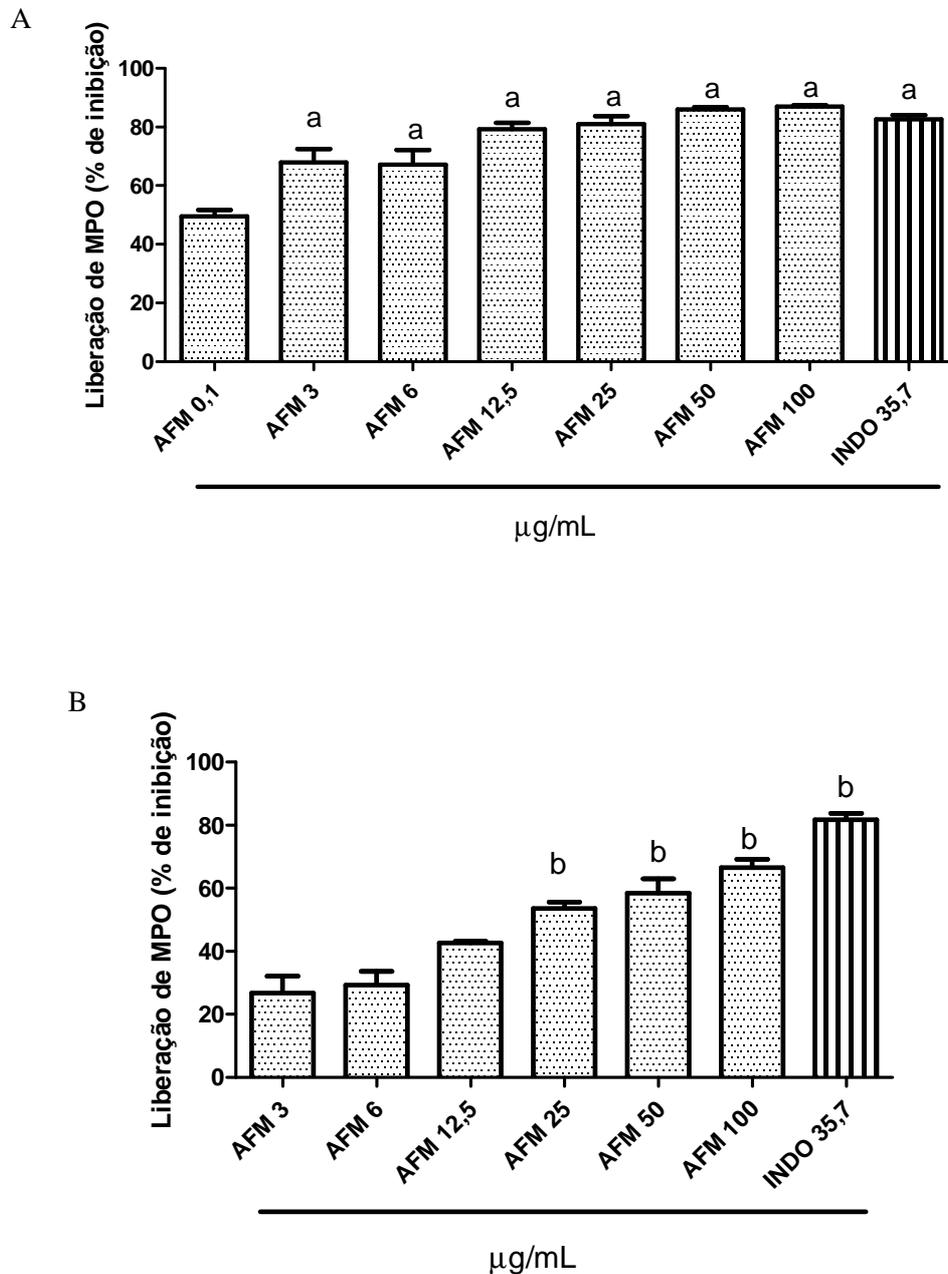


Figura 22. Efeito de AFM sobre a desgranulação neutrofílica induzida por PMA (A) ou fMLP (B) e determinada pela inibição da liberação da mieloperoxidase. Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com AFM (3; 6; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) e posteriormente estimulados com PMA (0,1 $\mu\text{mol/L}$) ou fMLP (100 nM). AFM: afrormosina; INDO: indometacina, droga padrão. Os resultados obtidos na presença de AFM foram comparados ao grupo controle (100% da liberação de MPO). Os valores estão sendo expressos como média \pm E.P.M. As análises foram realizadas em triplicatas em três dias diferentes. **a** vs AFM 0,1 $\mu\text{g/mL}$; **b** vs AFM 3 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,05$ - ANOVA e Teste de Tukey).

Tabela 8 - Concentração de CESAC e AFM capaz de inibir em 50 % a desgranulação de neutrófilo induzida por PMA ou fMLP e determinada pela liberação de MPO.

Grupos	Liberação de MPO - CI₅₀ (µg/mL)	
	fMLP	PMA
CESAC	19,40	13,36
AFM	19,94	0,109

- **Efeito da CESAC e da AFM sobre a atividade catalítica de mieloperoxidase**

A enzima mieloperoxidase está presente em grandes quantidades nos neutrófilos e é considerada um marcador da inflamação. Dessa forma, sua inibição direta é um indicativo de atividade antiinflamatória. As **Figuras 23 e 24** mostram os efeitos de CESAC e AFM, respectivamente, diretamente sobre a enzima mieloperoxidase. A CESAC (1, 5, 10, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) promoveu uma inibição de até 74% ($\text{CI}_{50} = 6,55 \mu\text{g/mL}$) (**Tabela 9**). Resultados semelhantes foram obtidos com AFM (0,1; 3; 6; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), que inibiu de 38 a 75% ($\text{CI}_{50} = 4,62 \mu\text{g/mL}$) (**Tabela 9**) a atividade da MPO. As inibições promovidas por ambas as substâncias foram superiores a indometacina (71%), droga padrão.

- **Efeito da CESAC e da AFM sobre a atividade catalítica de elastase**

A atividade elastase humana foi determinada através da formação de p-nitroanilina, produto da reação da enzima sobre a SAAVNA (substrato). As **Figuras 25 e 26** mostram o efeito da CESAC e da AFM sobre a atividade da elastase humana. O CESAC (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) inibiu em até 88% a atividade da elastase ($\text{CI}_{50} = 41,02 \mu\text{g/mL}$). Por outro lado, a AFM não interferiu significativamente na atividade da elastase.

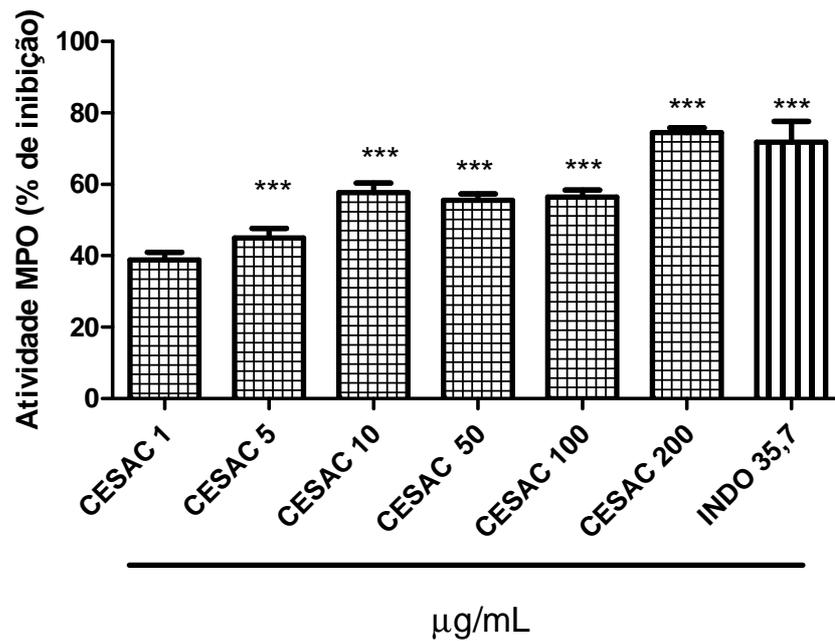


Figura 23. Efeito de CESAC sobre a atividade da mieloperoxidase. Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram previamente estimulados com PMA ($0,1 \mu\text{mol/L}$), centrifugados e o sobrenadante incubado com CESAC (1, 5, 10, 50, 100 e $200 \mu\text{g/mL}$). INDO: indometacina, droga padrão. Os resultados obtidos na presença de CESAC foram comparados ao grupo controle (100% da atividade enzimática). Os valores estão sendo expressos como média \pm E.P.M. As análises foram realizadas em triplicatas em três dias diferentes. * vs CESAC $1 \mu\text{g/mL}$ ($P < 0,05$ - ANOVA e Teste de Tukey).

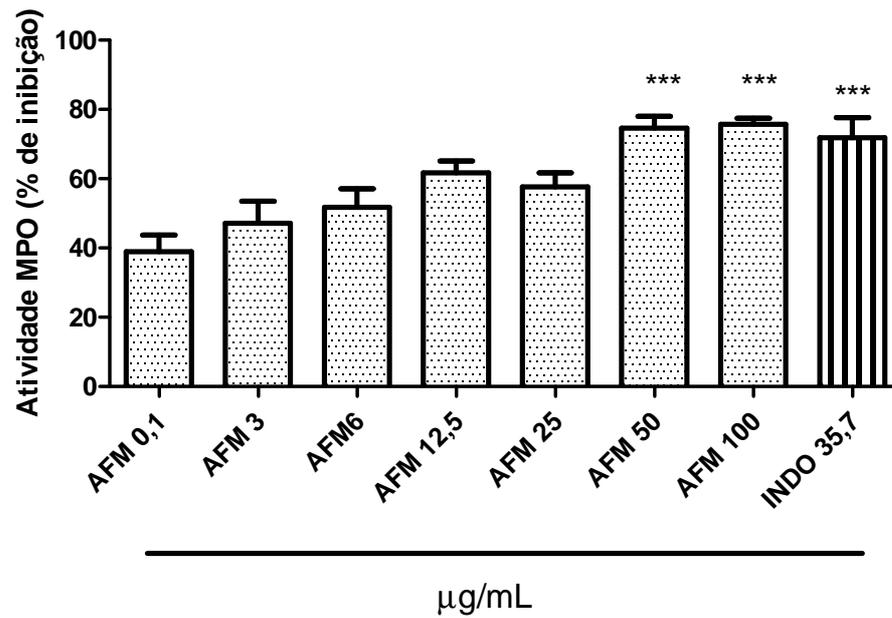


Figura 24. Efeito de AFM sobre a atividade da mieloperoxidase. Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram previamente estimulados com PMA ($0,1 \mu\text{mol/L}$), centrifugados e o sobrenadante incubado com AFM (0,1; 3; 12,5; 25; 50 e $100 \mu\text{g/mL}$). INDO: indometacina, droga padrão. Os resultados obtidos na presença de AFM foram comparados ao grupo controle (100% da atividade enzimática). Os valores estão sendo expressos como média \pm E.P.M. As análises foram realizadas em triplicatas em três dias diferentes. * vs AFM $0,1 \mu\text{g/mL}$ ($P < 0,05$ - ANOVA e Teste de Tukey).

Tabela 9 - Concentração de CESAC e AFM capaz de inibir em 50 % a atividade de MPO em neutrófilo induzida por PMA.

Grupos	Atividade MPO - CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
CEAC	6,55
AFM	4,62

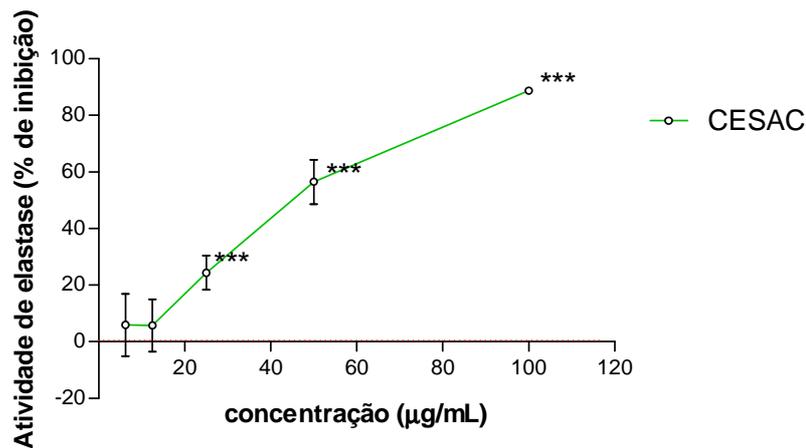


Figura 25. Efeito de CESAC sobre a atividade da elastase humana. Ao sobrenadante rico em enzimas secretadas por neutrófilos, após ativados fMLP (1µM), foram adicionados CESAC (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL) e após 20 minutos foi determinado a atividade da elastase. Os resultados obtidos na presença de CESAC foram comparados ao grupo controle (100% da atividade enzimática). Os valores estão sendo expressos como média ± E.P.M. As análises foram realizadas em triplicatas em três dias diferentes. * $p < 0,05$ vs CESAC 6,25 µg/mL (ANOVA e Teste de Tukey como *post hoc*).

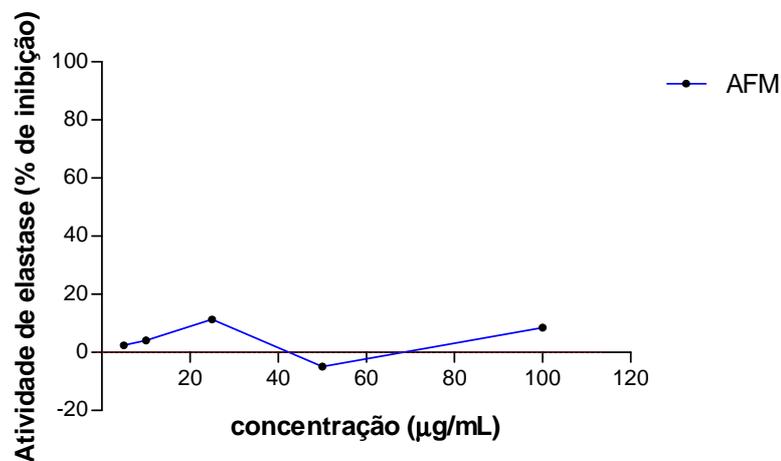


Figura 26. Efeito de AFM sobre a atividade da elastase humana. Ao sobrenadante rico em enzimas secretadas por neutrófilos, após ativados fMLP (1µM), foram adicionados AFM (5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) e após 20 minutos foi determinado a atividade da elastase. Os resultados obtidos na presença de AFM foram comparados ao grupo controle (100% da atividade enzimática). Os valores estão sendo expressos como média ± E.P.M. As análises foram realizadas em triplicatas em três dias diferentes. Efeitos da CESAC e da AFM sobre os níveis de TNF α

- Efeitos da CESAC e da AFM sobre os níveis de TNF α

A adição de PMA (0,1 $\mu\text{mol/L}$) à suspensão de neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) aumentou significativamente os níveis de TNF α ($47,46 \pm 2,97$ pg/mL) em relação ao grupo não ativado, tratado somente com solução tampão HBSS ($11,97 \pm 0,43$ pg/mL). Contudo, tanto CESAC (5, 10, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) quanto AFM (5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) reduziram os níveis de TNF α . A CESAC nas maiores concentrações reduziu (**Figura 27**) quase completamente os níveis de TNF α ($\text{CI}_{50} = 6,85$ $\mu\text{g/mL}$). Enquanto a AFM reduziu os níveis de TNF α em até 44% (**Figura 28**).

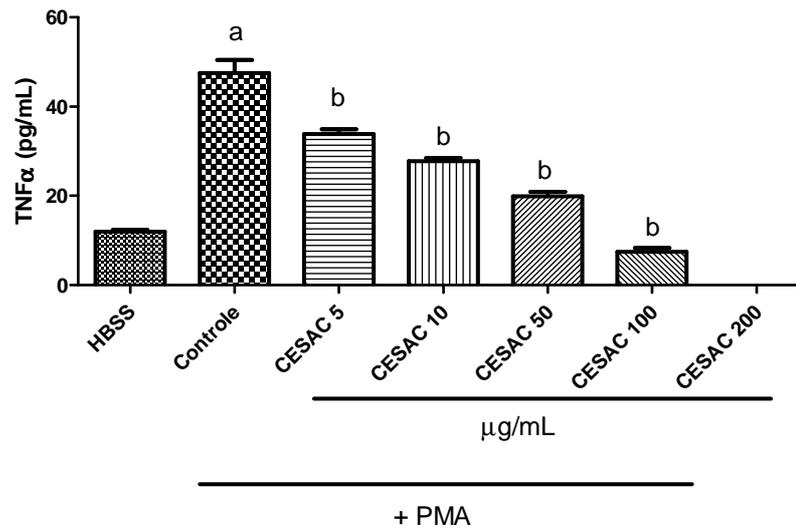


Figura 27. Efeito de CESAC sobre o aumento dos níveis de TNF α induzido por PMA. O CESAC (5, 10, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionado à suspensão de neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) 15 minutos antes da adição de PMA (0,1 $\mu\text{mol/L}$), que foi sucedida pela determinação dos níveis de TNF α . HBSS: células sem adição de PMA; Controle: DMSO - veículo. Os resultados estão sendo expressos como média \pm E.P.M. **a** vs HBSS, **b** vs Controle ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

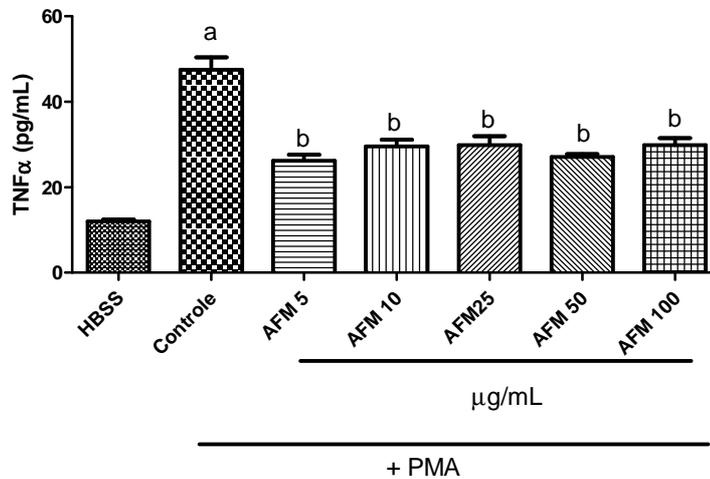


Figura 28. Efeito de AFM sobre o aumento dos níveis de TNF α induzido por PMA. A AFM (5, 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionada à suspensão de neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) 15 minutos antes da adição de PMA (0,1 $\mu\text{mol/L}$), que foi sucedida pela determinação dos níveis de TNF α . HBSS: células sem adição de PMA; Controle: DMSO - veículo. Os resultados estão sendo expressos como média \pm E.P.M. **a** vs HBSS, **b** vs Controle ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

5.5. Avaliação da atividade antioxidante da CESAC e da AFM *in vitro*

- Efeito da CESAC e da AFM sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos mensurado por quimioluminescência

Para avaliar os efeitos de CESAC e AFM sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos ativados por PMA foram feitos ensaios de quimioluminescência utilizando como sondas o luminol (QL lum) e a lucigenina (QL luc). A CESAC (0,78; 3,12; 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) foi capaz de inibir de forma significativa a produção de QL lum pelos neutrófilos estimulados por PMA (**Figuras 29 e 30**), com inibição de 88% ($\text{CI}_{50} = 6,42 \mu\text{g/mL}$) (**Tabela 10**). Da mesma forma, a CESAC (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) também causou inibição da produção de QL luc (**Figura 31 e 32**), porém em menor grau (igual a 51%; $\text{CI}_{50} = 95,49 \mu\text{g/mL}$) (**Tabela 10**). A AFM (5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) inibiu em até 73% a produção de QL lum (**Figuras 33 e 34**), com valor de CI_{50} igual a 19,09 $\mu\text{g/mL}$ (**Tabela 10**) e 44% a produção de QL luc (**Figuras 35 e 36**).

- Teste de DPPH

Este teste foi utilizado com a finalidade de avaliar a capacidade sequestradora de radicais livres da CESAC e da AFM. Somente CESAC na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ mostrou inibição significativa (22%) (**Figura 37**). A AFM nas concentrações testadas (10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) não promoveu nenhum efeito sequestrador significativo frente ao grupo controle (**Figura 38**).

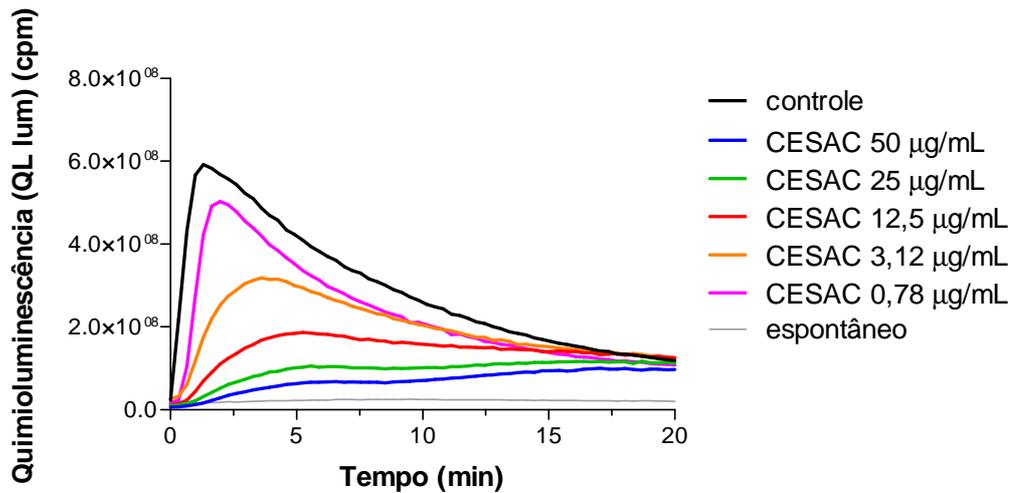


Figura 29. Perfil de quimioluminescência de CESAC dependente de luminol (QL lum) produzidos por neutrófilos registrada em contagens por minuto (cpm) em função do tempo (20 minutos). Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$) foram incubados com CESAC (0,78; 3,12; 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) e posteriormente estimulados com PMA (0,1 $\mu\text{mol/L}$). HBSS: células não estimuladas; Controle: DMSO – veículo.

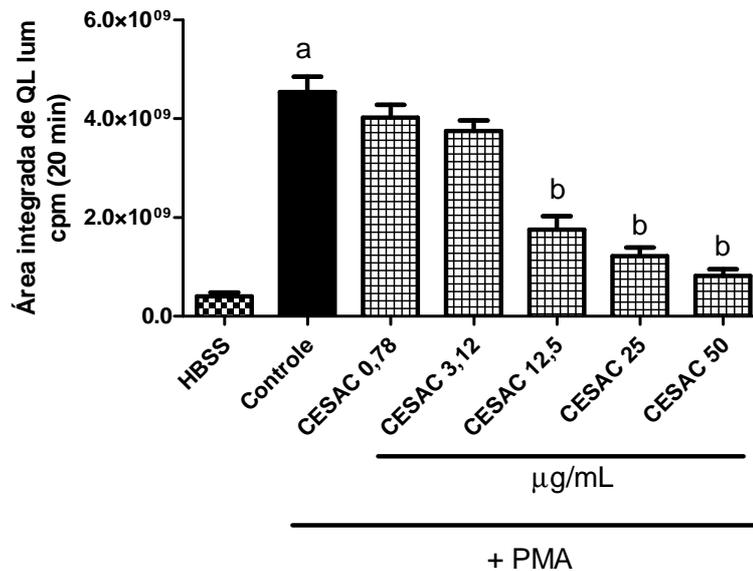


Figura 30. Efeito de CESAC sobre a produção de quimioluminescência dependente de luminol (QL lum) de neutrófilos estimulados com PMA. Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$) foram incubados com CESAC (0,78; 3,12; 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) e posteriormente estimulados com PMA (0,1 $\mu\text{mol/L}$). HBSS: células não estimuladas; Controle: DMSO – solvente. Os resultados estão sendo expressos como média \pm E.P.M. **a** vs HBSS, **b** vs Controle ($P < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

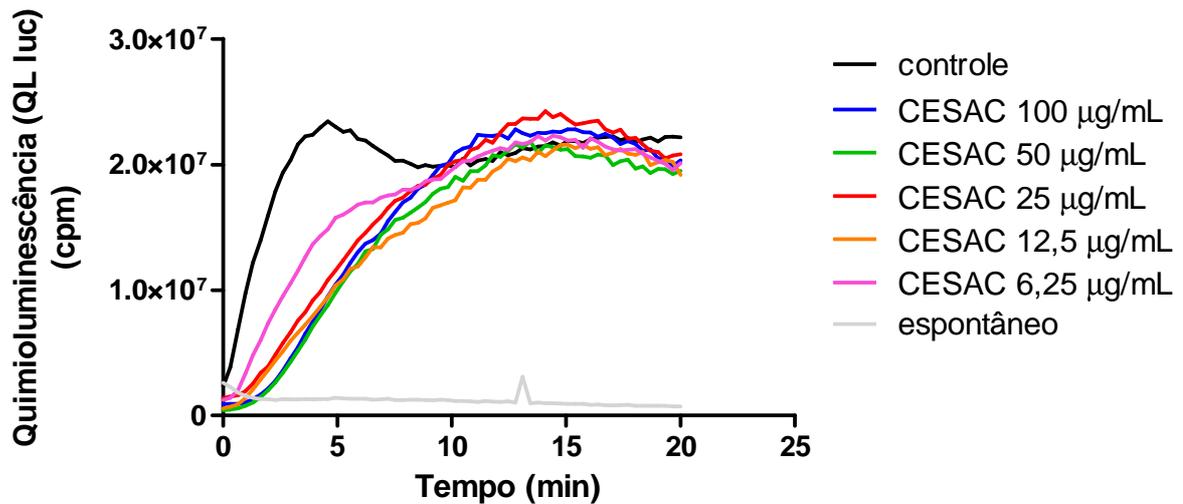


Figura 31. Perfil de quimioluminescência de CESAC dependente de lucigenina (QL luc) produzidos por neutrófilos registrada em contagens por minuto (cpm) em função do tempo (20 minutos). Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$) foram incubados com CESAC (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) e posteriormente estimulados com PMA (0,1 $\mu\text{mol/L}$). HBSS: células não estimuladas; Controle: DMSO – veículo.

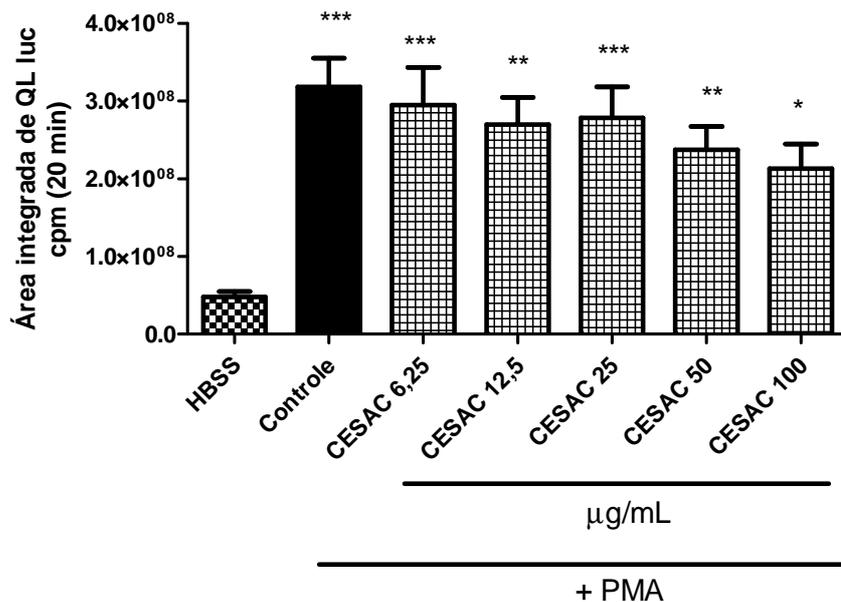


Figura 32. Efeito de CESAC sobre a produção de quimioluminescência dependente de lucigenina (QL luc) de neutrófilos estimulados com PMA. Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$) foram incubados com CESAC (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) e posteriormente estimulados com PMA (0,1 $\mu\text{mol/L}$). HBSS: células não estimuladas; Controle: DMSO – veículo. Os resultados estão sendo expressos como média \pm E.P.M. * vs HBSS ($P < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

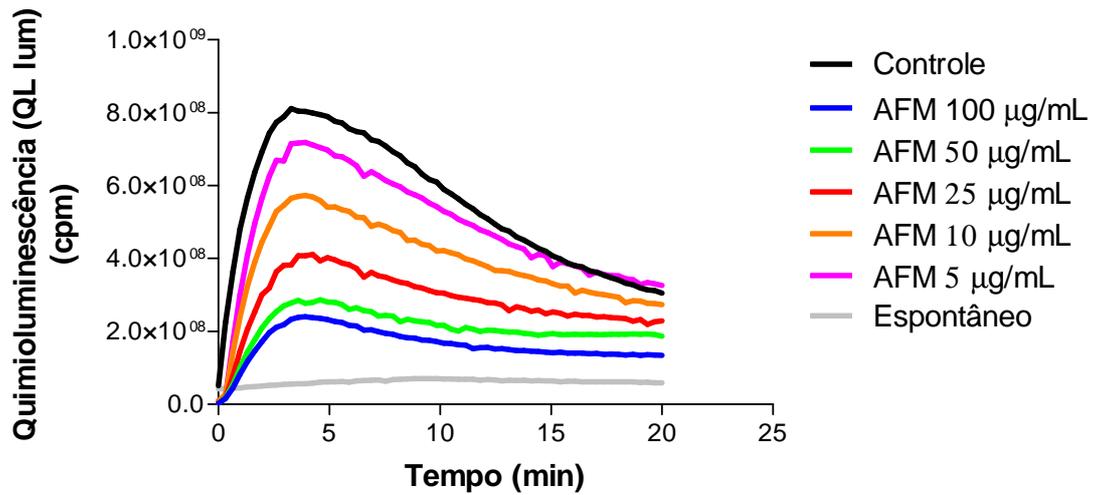


Figura 33. Perfil de quimioluminescência de AFM dependente de luminol (QL lum) produzidos por neutrófilos registrada em contagens por minuto (cpm) em função do tempo (20 minutos). Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$) foram incubados com AFM (5, 10, 25, 50 E 100 $\mu\text{g/mL}$) e posteriormente estimulados com PMA (0,1 $\mu\text{mol/L}$). HBSS: células não estimuladas; Controle: DMSO – veículo.

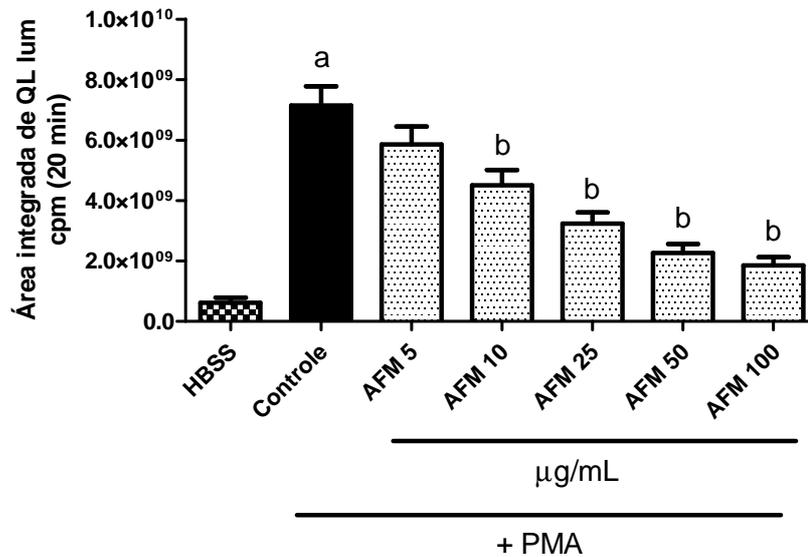


Figura 34. Efeito de AFM sobre a produção de quimioluminescência dependente de luminol (QL lum) de neutrófilos estimulados com PMA. Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$) foram incubados com AFM (5; 10; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) e posteriormente estimulados com PMA (0,1 $\mu\text{mol/L}$). HBSS: células não estimuladas; Controle: DMSO – veículo. Os resultados estão sendo expressos como média \pm E.P.M. **a** vs HBSS, **b** vs Controle ($P < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

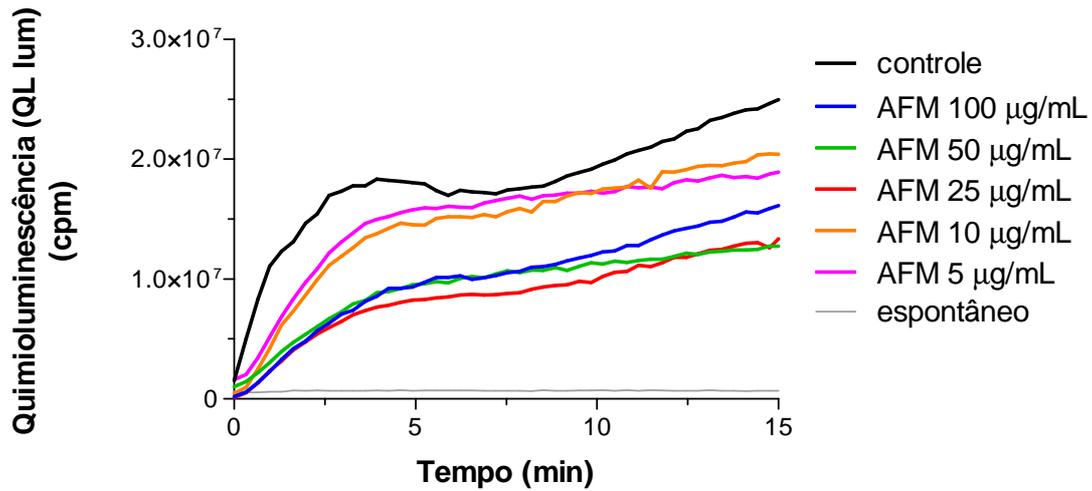


Figura 35. Perfil de quimioluminescência de AFM dependente de lucigenina (QL luc) produzidos por neutrófilos registrada em contagens por minuto (cpm) em função do tempo (20 minutos). Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$) foram incubados com AFM (5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) e posteriormente estimulados com PMA (0,1 $\mu\text{mol/L}$). HBSS: células não estimuladas; Controle: DMSO – veículo.

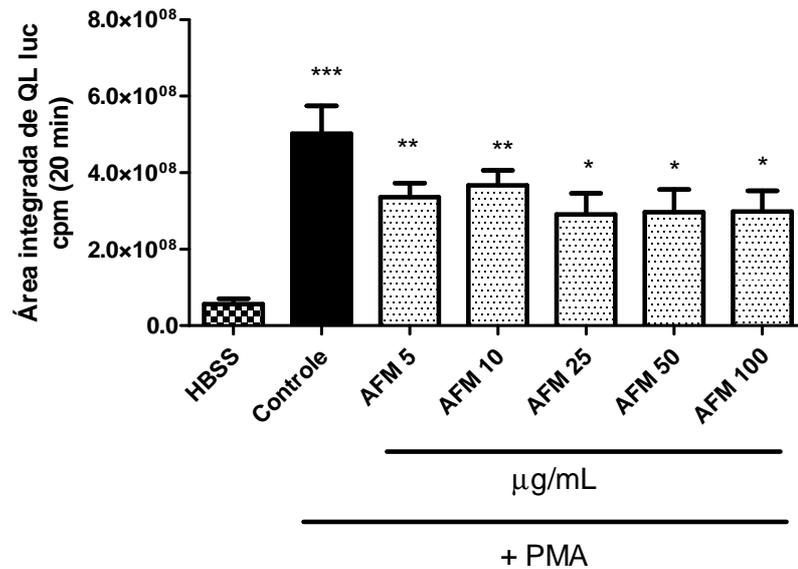


Figura 36. Efeito de AFM sobre a produção de quimioluminescência dependente de lucigenina (QL luc) de neutrófilos estimulados com PMA. Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$) foram incubados com AFM (5; 10; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) e posteriormente estimulados com PMA (0,1 $\mu\text{mol/L}$). HBSS: células não estimuladas; Controle: DMSO – veículo. Os resultados estão sendo expressos como média \pm E.P.M. * vs HBSS ($P < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

Tabela 10 - Concentração de CESAC e AFM capaz de inibir em 50 % o metabolismo oxidativo (produção de EROs) de neutrófilos estimulados com PMA e mensurado através de quimioluminescência.

Grupos	Produção de EROs - CI₅₀ (µg/mL)	
	QL lum	QL luc
CESAC	6,42	95,49
AFM	19,09	-

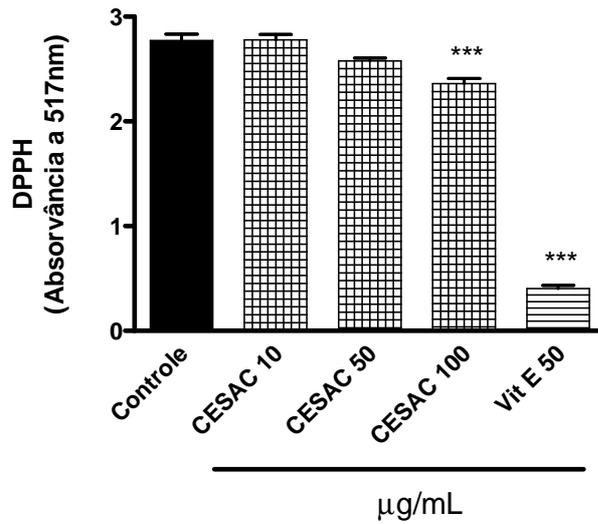


Figura 37. Avaliação da capacidade sequestrante de radicais livres de CESAC (10, 50 e 100 µg/mL) e da vitamina E determinada pelo teste de DPPH. Vit E: vitamina E. Os resultados estão sendo expressos como média \pm E.P.M. *vs Controle ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

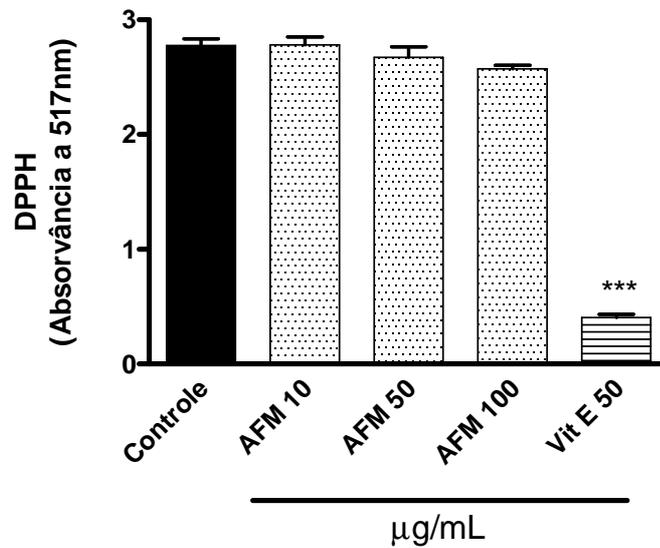


Figura 38. Avaliação da capacidade sequestrante de radicais livres de AFM (10, 50 e 100 µg/mL) e da vitamina E determinada pelo teste de DPPH. Vit E: vitamina E. Os resultados estão sendo expressos como média \pm E.P.M. *vs Controle ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

6. DISCUSSÃO

Amburana cearensis, Fabaceae, conhecida popularmente como cumaru, é uma árvore utilizada tradicionalmente no nordeste do Brasil no tratamento de afecções respiratórias como tosse, bronquite e asma (MATOS, 2000). Suas cascas do caule têm sido empregadas na produção de chás e xaropes, estes produzidos por programas governamentais de fitoterapia ou por indústrias farmacêuticas nacionais. Estudos anteriores mostraram as atividades antinociceptiva, antiinflamatória e broncodilatadora do extrato hidroalcoólico (solução não padronizada), da cumarina e da fração flavonóide (LEAL et al., 1997; 2000; 2003), bem como de dois compostos fenólicos isolados da casca do caule da planta, o amburosídeo A e o isocampferídeo (LEAL et al., 2006). No presente estudo foram investigados os possíveis efeitos citotóxicos, bem como as atividades antiinflamatória e antioxidante das cápsulas do extrato seco (CESAC) padronizado (CLAE-DAD) e da afrormosina (AFM, isoflavonóide), obtidos a partir da casca do caule do cumaru.

A avaliação da citotoxicidade da CESAC e da AFM foi realizada em neutrófilos humano através de alguns modelos experimentais visando investigar possíveis efeitos tóxicos das drogas testes sobre a membrana plasmática, metabolismo e morte celular. Nesse contexto, foram empregados alguns modelos experimentais como o teste de exclusão com azul tripan, lactato desidrogenase (LDH), brometo 3[4,5 dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e laranja de acridina/brometo de etídio. A seleção dos neutrófilos deu-se por seu papel importante na inflamação, sendo empregado inclusive no presente estudo como um dos modelos experimentais de inflamação.

O teste de exclusão por azul tripan constitui um ensaio preliminar na avaliação da citotoxicidade de uma droga teste, sendo capaz de distinguir as células viáveis, impermeáveis ao corante ácido azul de tripan, daquelas permeáveis ao corante. Essa última condição constitui um forte indicativo de dano à membrana plasmática que culmina na morte celular (HYNES et al., 2003; MINERVINI et al., 2004). Ainda, na mesma linha de investigação a medida da atividade da lactato desidrogenase, enzima presente no citoplasma celular, constitui num marcador de membrana íntegra com sensibilidade considerável. No presente estudo tanto a CESAC quanto a AFM (0,1 – 200 µg/mL) não interferiram na viabilidade celular avaliada através do teste de exclusão com azul de tripan e da atividade da lactato desidrogenase, sugerindo a ausência de toxicidade sobre a membrana celular de neutrófilos humano.

Dando continuidade a avaliação da possível citotoxicidade foram investigados os efeitos da CESAC e da AFM no metabolismo celular com auxílio do teste do MTT. Nesse

ensaio tanto o CESAC quanto a AFM ao contrário do Triton X-100 (droga padrão, citotóxica) não interferiram na viabilidade celular em relação aos grupos controle (veículo) e HBSS (solução tampão), sugerindo ausência de toxicidade sobre o metabolismo celular, particularmente relacionado à atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase.

As causas mais comuns de lesões celulares são: ausência de oxigênio (hipóxia), agentes físicos (traumas, radiação, choque etc), agentes químicos e drogas; agentes infecciosos; reações imunológicas; distúrbios genéticos e desequilíbrios nutricionais. Essa lesão pode ser reversível até certo ponto, depois da qual a célula morre. A morte celular de mamíferos tem sido classificada em dois tipos: apoptose e necrose (KROEMER et al., 2005). A autofagia, que tem sido proposta como um terceiro modo de morte celular, trata-se de um processo no qual as células produzem energia e metabólitos por digestão de suas próprias organelas e macromoléculas (KLIONSKY, 2007).

A apoptose é uma via de morte celular programada e controlada intracelularmente através da ativação de enzimas que degradam o DNA nuclear e as proteínas citoplasmáticas. Na apoptose a membrana celular permanece intacta, o que difere bastante da necrose, e ocorre tanto em eventos patológicos quanto fisiológicos. O reconhecimento de que a morte celular pode dar-se por processos geneticamente controlados tem permitido avanços na elucidação de mecanismos de várias doenças, o que auxilia consideravelmente o desenvolvimento de fármacos que podem deflagrar ou inibir a morte celular programada (THOMPSON, 1995; KROEMER; BOUCHIER-HAYES et al., 2005).

A necrose tem sido usualmente considerada como uma forma acidental de morte celular, isto é não programada, que ocorre em resposta a uma hipóxia aguda ou uma lesão isquêmica, como o infarto do miocárdio. A exposição das células a condições suprafisiológica (ex.: calor, frio e toxinas) também promove a necrose (HOTCHKISS et al., 2009). Evidências indicam que a necrose, tradicionalmente considerada como uma forma de morte celular acidental e patológica, parece ser mais ordenada do que se pensava. As primeiras células que morrem por necrose funcionam como sentinelas, alertando o hospedeiro para a necessidade de respostas defensivas ou reparadora. Além disso, a necrose pode ser iniciada pela ativação de receptores na superfície celular, por exemplo, concentrações elevadas de TNF é capaz de induzir a necrose de hepatócitos (LASTER et al., 1988; BOUCHIER-HAYES et al., 2005).

Alguns ensaios podem ser utilizados para investigar o possível efeito de drogas sobre o padrão de morte celular incluindo a detecção das mudanças morfológicas celulares por microscopia de luz, microscopia eletrônica ou através da citometria de fluxo, dentre

outros métodos, usando corantes fluorescentes como rodamina 123 (DIVE et al., 1992; KOOPMAN et al., 1994).

No presente estudo, a avaliação do efeito da AFM sobre o padrão de morte celular mostrou que esse isoflavonóide não aumentou significativamente o número de células apoptóticas em relação ao controle e reduziu o efeito necrótico induzido pelo DMSO 1 %, veículo da AFM. Esses dados diferem de estudos realizados com outros derivados isoflavônicos como a genisteína, um isoflavonóide da soja (*Glycine max*) que possui efeito anti-proliferativo por induzir a apoptose em células do câncer de mama - MCF-6 (SHIM et al., 2007). Além disso, foi mostrado que a inclusão de mais uma hidroxila no anel B da genisteína aumentou seu potencial citotóxico. Assim, observando a fórmula estrutural da AFM (**Figura 7**) possivelmente o seu caráter monohidroxilado contribua para a ausência de toxicidade em neutrófilo humano, causando inclusive uma proteção em relação à citotoxicidade promovida pelo DMSO.

Estudos realizados (TAKAHASHI et al., 1985; BAKKEN, 2006) para investigar as condições ideais de uso de conservantes (ex.: DMSO, o glicerol e o etilenoglicol) durante o congelamento de células, tem mostrado que o potencial tóxico desses produtos pode variar dependendo da população celular, concentração do conservante, tipo celular e o tempo de exposição.

Considerando os resultados obtidos nos demais testes de citotoxicidade, como da lactato desidrogenase, onde o tempo de incubação das drogas testes e DMSO (0,4% - CESAC; 1% - AFM, 37°C) em neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foi de 15 min, e não foi observado citotoxicidade ao DMSO; possivelmente o aumento no número de células necróticas induzido pelo DMSO durante o estudo do efeito das drogas testes sobre o padrão de morte celular esteja relacionado ao maior tempo de incubação (2h) adotado nesse ensaio. Contudo estudos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese.

O extrato seco de *Amburana cearensis* possui como marcadores químicos/princípios ativos, duas substâncias o amburosídeo A (glucosídeo fenólico) e a cumarina (1,2-benzopirona). Estudos realizados com amburosídeo A têm mostrado a baixa citotoxicidade dessa molécula, além de algumas propriedades farmacológicas, como antiinflamatório, hepatoprotetor e neuroprotetora (COSTA-LOTTUFO et al., 2003; LEAL et al., 2006). A cumarina, por sua vez, embora também apresente inúmeras propriedades farmacológicas, como antiedematogênica, antinociceptiva e efeito relaxante no músculo liso

traqueal (LEAL et al., 1997); possui comprovado efeito antiproliferativo em linhagem de células tumorais (NSCLC), por indução da apoptose não associada com a fragmentação do DNA (LOPEZ-GONZALEZ et al., 2004). No presente estudo, a adição de concentrações crescentes da CESAC na suspensão de neutrófilos aumentou tanto o número de células necróticas quanto apoptóticas. Assim, possivelmente parte da toxicidade mostrada pela CESAC em neutrófilo pode está relacionada, pelo menos em parte pela presença da cumarina na planta.

Diante do exposto, é importante registrar que estudos toxicológicos realizados anteriormente no nosso laboratório, mostrou que a administração oral da CESAC (250, 500 e 750 mg/kg, v.o) durante 30 dias em ratos não promoveu alterações dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, não apresentando efeitos tóxicos ou repercussões sistêmicas (SÁ-LEITÃO, 2009). Contudo, certamente estudos adicionais são necessários para determinar o grau de segurança da CESAC.

Estudos anteriores (LEAL et al., 1997; 2003) mostraram o potencial antiinflamatório *in vivo* do extrato hidroalcoólico não padronizado da casca do caule de *A. cearensis*, entretanto por a CESAC tratar-se de um novo fitoproducto obtido com a agregação de novas tecnologias (CLAE-DAD e *spray-dryer*), foi realizada uma nova avaliação do potencial antiinflamatório do cumaru. Nesse sentido, foram investigados os efeitos da CESAC sobre o edema de pata e o acúmulo de leucócitos polimorfonucleares no peritônio e no lavado broncoalveolar de ratos.

O modelo de inflamação aguda induzido por carragenina (edema de pata e peritonite) é bastante difundido e tem sido extensamente usado para bioprospecção de novas drogas antiinflamatórias (WINTER et al., 1962; DI ROSA et al., 1971; POSADAS et al.; GUAY et al., 2004).

A carragenina induz a formação do edema de maneira bifásica (HENRIQUES et al., 1987). A primeira fase é caracterizada por um aumento na permeabilidade vascular (1-6 horas), mediada por histamina, serotonina e bradicinina, seguida por uma fase mais sustentada (12-24 horas) principalmente pelo aumento dos níveis de prostaglandinas (PG) (GUAY et al., 2004). Esse aumento nos níveis de PGs coincide com a infiltração celular, na maioria neutrófilos, que contribui para a produção de outros mediadores incluindo espécies reativas de oxigênio (EROs), proteases (elastase, collagenase) e peroxidases como a MPO, cuja mensuração de tem sido utilizada como marcador para a infiltração neutrofílica (POSADAS et al., 2004).

À semelhança de estudos anteriores (LEAL et al., 1997; LEAL, 1995) que mostrou o potencial anti-edematogênico da solução extrativa hidroalcoólica (EtOH a 20%) da casca do caule do cumaru (produto não padronizado quanto ao teor de marcador), a cápsula do extrato seco da planta obtido a partir do extrato etanólico (marcadores: cumarina e amburosídeo A) inibiu significativamente o edema induzido por carragenina em camundongos. A indometacina, anti-inflamatório inibidor inespecífico da COX, após administração sistêmica, mostrou também seu potencial anti-edematogênico.

Um dos aspectos que caracteriza o edema de pata induzido por carragenina é a intensa celularidade (predominantemente polimorfonucleares) que amplificam, por sua vez, a resposta inflamatória com a produção e secreção de mediadores químicos, incluindo espécies reativas de oxigênio, de nitrogênio e proteases (FANTONE & WARD, 1982; POSADAS et al., 2004). Nesse sentido, foi investigado o efeito da CESAC sobre o acúmulo de células inflamatórias e a produção de espécies químicas tóxicas resultantes da peroxidação lipídica induzida por carragenina no peritônio de camundongos.

Análise do exsudato peritoneal dos animais submetidos ao tratamento agudo com carragenina mostrou que a CESAC foi capaz de reduzir à semelhança da dexametasona, o acúmulo de leucócitos e a produção de TBARS/malondialdeído induzido por carragenina em camundongos.

A inflamação brônquica constitui o mais importante fator fisiopatogênico da asma. É resultante de interações complexas entre os mediadores liberados por células inflamatórias, como linfócitos T, mastócitos, macrófagos, eosinófilos, basófilos e neutrófilos (KUMAR, 2001; BARNES, 1998; DJUKANOVIC et al., 1990). A resposta asmática possui duas fases, a inicial e a tardia. A resposta inicial ocorre usualmente dentro de uma hora após a exposição ao antígeno, devido a ligação do complexo alérgeno - IgE específica à receptores de alta afinidade nos mastócitos e subsequente degranulação e liberação de vários mediadores inflamatórios. A resposta tardia inicia-se 3 - 4h após a exposição ao antígeno, tendo seu pico em torno de 9h, enquanto a obstrução das vias aéreas dá-se entre 12 - 24h após exposição ao alérgeno (PETERS et al., 1998; VARNER & LEMANSKE, 2000; BHARADWAJ & AGRAWAL, 2004).

Alguns mediadores secretados incluindo histamina, leucotrienos (LTB₄, LTC₄, LTD₄ e LTE₄), e fator ativador de plaquetas (PAF) são broncoconstritores altamente potentes que também aumentam a permeabilidade vascular e são quimiotáticos para células

inflamatórias (DELVES & ROITT; HOLGATE, 2000). Na fase tardia da doença, o papel de destaque encontra-se com as citocinas pró-inflamatórias produzidas pelas células inflamatórias, incluindo fator de necrose tumoral (TNF α) e as interleucinas (IL-1, IL-4 e IL-5).

Os eosinófilos são células sanguíneas que circulam em pequena quantidade no sangue, mas têm sua síntese estimulada na asma. Estas células liberam de seus grânulos polipeptídios muito básicos, como a proteína básica principal e peroxidase eosinofílica, que podem causar danos aos tecidos, incluindo a destruição do epitélio respiratório nos asmáticos (DELVES & ROITT, 2000). Vários mediadores inflamatórios são liberados também pelos macrófagos (TNF α , IL-6 e óxido nítrico), pelos linfócitos T (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, fator alfa de crescimento de colônia de granulócitos - GM-CSF), pelos neutrófilos (elastase, mieloperoxidase) e pelas células epiteliais (endotelina-1, mediadores lipídicos, óxido nítrico (HOLGATE, 1997).

Uma das principais indicações do cumaru pela medicina tradicional é o seu emprego no tratamento da asma, sob a forma de chá, lambedor ou xarope. Nesse sentido, foi investigado o potencial antiinflamatório da CESAC, agora empregando um modelo experimental utilizado há alguns anos pelo seu mimetismo da asma humana, é a sensibilização de ratos Wistar com ovalbumina (antígeno) (BELLOFIORE & MARIN, 1998; WATANABE & MISHINA, 1995). O procedimento de broncoprovocação pela repetição da exposição ao antígeno por inalação ao animal sensibilizado corresponde a um modelo de resposta asmática precoce (MANZOLLI et al., 1999), e 24 horas após o desafio, ocorre a fase inflamatória, caracterizada pela migração de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos que promovem a liberação de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios (HAMID et al., 2009).

No presente estudo, o tratamento sistêmico dos animais desafiados com a CESAC reduziu significativamente a quantidade de células no lavado broncoalveolar (LBA) de animais desafiados com antígeno, à semelhança da dexametasona, glicocorticóide utilizado como droga padrão. Dessa forma, os resultados obtidos comprovam o potencial antiinflamatório da planta, que parece estar relacionado pelo menos em parte à sua habilidade em modular o acúmulo de PMNs e a produção de mediadores químicos no foco inflamatório inclusive na via aérea de animais desafiados com antígeno.

Nos últimos anos tem sido dispensada muita atenção ao papel do estresse oxidativo na asma. O estresse oxidativo pode iniciar e amplificar uma resposta inflamatória, que pode ser iniciada pela exposição a diversos agentes, como a fumaça do tabaco, a exaustão do diesel e outros poluentes capazes de gerar oxidantes. O estresse oxidativo pode alterar a resposta imune (Th1/Th2), levando a ativação de NF- κ B, um potente indutor de genes pró-inflamatórios (BOWLER, 2004; DOZOR, 2010).

Estudo realizado com asmáticos leves, a atividade da SOD foi significativamente menor nestes pacientes em relação aos controles (TEKIN et al., 2001). Em outro estudo, os níveis plasmáticos de produtos da peroxidação lipídica, medidos pela técnica TBARS/malondialdeído, foram significativamente maiores em pacientes asmáticos crônicos, quando comparados com indivíduos normais. Um aumento na carga oxidante pode resultar da liberação de intermediários reativos de oxigênio, bem como de óxido nítrico nesta doença. O ânion superóxido e o óxido nítrico reagem rapidamente para formar peroxinitrito (ONOO⁻), que tem forte capacidade oxidante (AL-MEHDI et al., 1998). Análises bioquímicas do LBA dos animais desafiados mostrou que a CESAC foi capaz de reduzir os níveis de TBARS, bem como de nitrito/nitrato, além de restabelecer praticamente a normalidade a concentração de GSH, um dos agentes antioxidantes mais importante do sistema de defesa da célula envolvido, por exemplo, na detoxificação de agentes químicos e na eliminação de produtos da peroxidação lipídica.

Muitos tipos celulares estão envolvidos na fisiopatologia da asma. Pacientes com asma sintomática apresentam níveis elevados de neutrófilos que mostram sinais de estarem ativados. Tanto a quantidade de neutrófilos quanto o nível de sua ativação apresentam-se menores na ausência de sintomas ou após o tratamento e resolução do processo alérgico (RADEAU et al., 1990). Neutrófilos ativados produzem vários tipos de quimiocinas, incluindo IL-8, GRO α , proteína inflamatória do macrófago (MIP-1 α) e MIP-1 β (SCAPINI et al., 2000). IL-8 e GRO α são quimioatraentes para os neutrófilos e por esse motivo formam um mecanismo de retroalimentação positiva que induz o acúmulo de grandes quantidades de neutrófilos nas vias aéreas (MONTESEIRÍN, 2009).

Os neutrófilos quando ativados liberam algumas proteases presentes nos seus grânulos como: catepsina G, proteinase-3 e elastase. Esta última causa dano às células epiteliais, aumento da permeabilidade vascular, hipersecreção de muco, broncoconstrição, hiperreatividade brônquica e desgranulação de eosinófilos que produzem superóxido (AMITANI et al., 1991). Este mecanismo pode constituir parte da base da patogênese da asma

e a inibição efetiva destas proteases pode servir como uma ferramenta farmacológica num futuro próximo (HIRAGUCHI et al., 2008).

Dessa forma, no sentido de avançar na descrição do possível mecanismo de ação antiinflamatória da CESAC, e ainda iniciar uma avaliação do potencial farmacológico de mais um flavonóide da planta, Afrormosina (AFM), foram investigados os efeitos dessas drogas testes sobre a ativação de neutrófilos, atividade de enzimas proteolíticas e produção de mediadores inflamatórios.

No presente estudo foram utilizados fMLP e PMA como estímulos de ativação neutrofílica. Os resultados obtidos mostraram que tanto o fMLP quanto o PMA induziram a ativação de neutrófilos humano, observada pela liberação expressiva de mieloperoxidase no meio, que foi reduzida significativamente pela CESAC, bem como pela AFM.

O fMLP é um fator quimiotático produzido por bactérias, que é capaz de ativar quase todas as funções fisiológicas do neutrófilo (MARASCO et al., 1984). Seus efeitos são desencadeados por meio de ligação aos receptores de formilpeptídeos (fMLP-R), que são receptores clássicos acoplados à proteína G, caracterizados por possuírem sete segmentos transmembrânicos hidrofóbicos (LIU et al., 2004). Após a ligação do fMLP, o receptor sofre mudança conformacional, que o possibilita a interagir com a proteína G, trocando GDP por GTP no sítio de ligação da subunidade α e causando a dissociação das subunidades $\beta\gamma$. A ativação da proteína G desencadeia diversos sistemas de sinalização de neutrófilos, envolvendo quinases e fosfolipases. Uma das vias deste processo inicia-se pela ativação de fosfolipase C (PLC), resultando na hidrólise de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), gerando diacilglicerol (DAG), que ativa a proteína quinase C (PKC), e inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃), que promove a liberação de íons cálcio dos estoques intracelulares (ANDERSSON et al., 1987).

Alguns autores comprovaram a participação de fosfolipase D (PLD) na ativação via fMLP. Uma vez ativada, a PLD catalisa a hidrólise de fosfatidilcolina (PC) para produzir ácido fosfatídico (PA), que pode ser convertido em DAG pela ação de uma fosfolipase, aumentando a ativação de PKC (BAGGIOLINI et al., 1993).

O PMA (forbol-miristato-acetato), representante mais difundido dos análogos de ésteres de forbol, é um composto sintético que ativa a transdução de sinais no neutrófilo sem a

necessidade de um receptor de membrana (THELEN et al., 1993), mimetizando as ações do DAG e ativando diretamente a PKC (EDWARDS, 1996).

Alguns autores (KESSELS et al., 1993) observaram que haviam diferenças na inibição da desgranulação de neutrófilos induzidos por fMLP e PMA, mesmo utilizando inibidores específicos de PKC. Eles concluíram que em neutrófilos estimulados por fMLP, a menor potência de inibição estava possivelmente relacionado ao papel da PLD. Isso, possivelmente explica os resultados obtidos presente estudo, onde tanto a CESAC quanto a AFM mostraram-se mais potentes ao inibir a desgranulação de neutrófilos induzida por PMA (AFM/CI50: 0,109 $\mu\text{g/mL}$; CESAC/CI50: 13,36 $\mu\text{g/mL}$) em relação ao fMLP (AFM/CI50: 19,94 $\mu\text{g/mL}$; CESAC/CI50: 19,40 $\mu\text{g/mL}$). Prosseguindo os estudos foram investigados o efeito da CESAC e da AFM sobre as enzimas MPO e elastase humana.

A MPO é uma das principais enzimas liberadas dos grânulos azurofílicos dos neutrófilos. É uma heme proteína abundantemente expressa nos PMNs e corresponde a um pouco mais de 5% do total de proteínas da célula (KLEBANOFF, 1999). A MPO tem sido considerada por longo tempo um constituinte chave do arsenal citotóxico neutrofílico por catalisar a formação de ácido hipocloroso (HOCl), um potente oxidante que exibe atividade bactericida *in vitro* (MIDWINTER et al., 2001). Entretanto, observações recentes têm expandido essa visão e mostram que substâncias oxidantes derivadas do sistema MPO-H₂O₂ estão criticamente envolvidas na modulação de vias de sinalização, por exemplo, ativação de MAPK (MIDWINTER et al., 2001), indução de translocação de fatores de transcrição, como NF κ B (SCHOONBROODT et al., 1997), regulação de crescimento celular pela ativação de proteínas tumorais (VILE et al., 1998) e modulação na atividade de metaloproteinases (FU et al., 2004).

Além disso, Lau e colaboradores (2005) demonstraram que MPO liga-se à β_2 -integrinas (CD11b/CD18) nos PMNs, levando à indução de cascatas de sinalização intracelular e aumento da desgranulação de neutrófilos, expressão de CD11b na superfície destas células e ativação do complexo NADPH oxidase.

Estudos anteriores (LEFKOWITZ et al.1993) têm evidenciado que MPO pode modular respostas imunes através da ativação de macrófagos. Nesses estudos, a exposição *in vitro* de macrófagos à MPO provocou a liberação de TNF- α e pequenas quantidades de IFN- γ , juntamente com o aumento da citotoxicidade macrófago-dependente. Além disso, algumas interações entre MPO e macrófagos podem ser determinantes na perpetuação de algumas

doenças inflamatórias crônicas (VAN DER VEEN et al., 2009). Estudos recentes mostraram que a interação de MPO com CD11b/CD18 integrinas afetam a duração da viabilidade do neutrófilo, prolongando-a, sugerindo que as funções exercidas pela MPO podem influenciar na duração das respostas inflamatórias (EL KEBIR et al, 2008).

A elastase é também uma enzima abundantemente encontrada nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos, trata-se de uma serino-protease. Apesar de sua importância na eliminação de patógenos, a elastase tem sido relacionada com uma variedade de doenças inflamatórias como fibrose cística (FC) e DPOC por promover o aumento da expressão de IL-8 pelas células endoteliais e de LTB₄ pelos macrófagos (WALSH et al., 2001; HUBBARD et al., 1991). A elastase é capaz de degradar moléculas da matriz extracelular como colágeno, fibronectina, laminina, proteoglicano e, mais importante, elastina, um composto abundante no parênquima pulmonar através da ativação direta sobre metaloproteinases como MMP-9 e, indireta, pela inativação de TIMP-1, inibidor desta molécula (SHAMAMIAN et al., 2001).

Além disso, a elastase também possui influência sobre macrófagos durante a apoptose. A resolução da inflamação nas doenças é realizada através da remoção de neutrófilos apoptóticos por macrófagos. Este processo envolve a sinalização das células apoptóticas e seu reconhecimento pelos receptores dos macrófagos, como o receptor fosfatidilserina CD36. Entretanto, na presença de atividade de elastase existe uma diminuição dessa remoção de células apoptóticas devido à clivagem da fosfatidilserina dos macrófagos, impedindo a interação da célula apoptótica com o receptor (VANDIVIER et al., 2002).

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que tanto a CESAC quanto a AFM inibiram a atividade da MPO, porém apenas a CESAC foi capaz de inibir a atividade da elastase. Certamente, pelo menos parte desse efeito da CESAC está relacionado à presença de amburosídeo A no produto. Isso, considerando que estudos anteriores (LEAL, 2006; LEAL et al., 2009) realizados no nosso laboratório mostraram o potencial antiinflamatório desse princípio ativo/marcador químico da CESAC, capaz de bloquear tanto o acúmulo de células inflamatórias no foco inflamatório em roedores, quanto a ativação de neutrófilos humano e a secreção de mediadores químicos.

Na resposta inflamatória várias citocinas possuem a habilidade de dirigir neutrófilos ativados, aumentando suas atividades microbicidas em resposta a estímulos (MORRISSON, 1987; STEINBECK & ROTH, 1989). Algumas citocinas como IFN- γ , IL-1 β e TNF- α estimulam as funções de neutrófilos como a produção de O₂⁻, migração celular,

atividade fagocítica e liberação de enzimas proteolíticas. O TNF- α é o principal mediador de respostas imunes e inflamatórias agudas, como aquelas que ocorrem no choque séptico (NANES, 2003), e contribui para o desenvolvimento de várias condições como doenças inflamatórias crônicas e auto-imunes (TRACEY & CERAMI, 1994). Também há relatos na literatura que TNF- α ao ligar-se com seu receptor TNFR2 promove a mobilização de NF κ B, com conseqüente expressão de genes inflamatórios (FAUSTMAN & DAVIS, 2010).

Estudo anterior (LEAL et al., 2009) realizado no nosso laboratório mostrou que o amburosídeo A e o isocampferídio, flavanol, isolados de *A. cearensis* foram capazes de reduzir os níveis de TNF α induzido por LPS em neutrófilo humano. Diante disso, e considerando o papel importante do TNF α na resposta inflamatória, foi investigado no presente estudo o efeito da CESAC e da AFM sobre a concentração de TNF α liberado por neutrófilo induzido por fMLP. Confirmando o potencial das drogas em estudo, foi observado que tanto o CESAC quanto a AFM foram capazes de reduzir os níveis de TNF α em neutrófilo humano.

Durante a fagocitose, os neutrófilos ativados podem gerar grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) desencadeado principalmente pela ativação do sistema NADPH oxidase. Esse processo é chamado de explosão oxidativa (KITAGAWA et al., 2003). Para que o complexo NADPH oxidase seja ativado, deve haver a reunião de seus componentes na membrana plasmática ou na membrana dos grânulos. A migração dos componentes citosólicos para a membrana está diretamente relacionada com as suas ativações, através da fosforilação de resíduos por proteínas quinases.

O envolvimento da proteína quinase C (PKC) na ativação e regulação do complexo NADPH oxidase é sugerida por diversos autores que demonstraram a atuação do componente citosólico p47^{phox} como substrato dessa proteína (LETO et al., 2009). Uma vez ativado este complexo, ocorre a formação do radical O₂⁻ por meio da transferência de elétron do NADPH para o oxigênio molecular. Conseqüentemente, outras espécies reativas de oxigênio são formadas na presença de outras enzimas, as quais fazem parte dos mecanismos microbicidas oxigênio-dependentes dos neutrófilos (SELVATICI et al., 2006).

O estresse oxidativo é definido como um acúmulo de espécies reativas de oxigênio que causam danos à estrutura das biomoléculas como DNA, lipídios, carboidratos e proteínas, além de outros componentes celulares, podendo iniciar respostas inflamatórias através da ativação de fatores de transcrição redox-sensíveis (GUYTON et al., 1996;

RAHMAN & MACNEE, 2000). Além disso, a degradação de lipídios da membrana (peroxidação lipídica) induzida por EROs pode produzir moléculas bioativas pró-inflamatórias que afetam monócitos e neutrófilos, causando um aumento da interação destes com as células endoteliais (LEE et al., 2000; YEH et al., 2001), exercendo desta maneira um papel importante em várias doenças inflamatórias crônicas (LEITINGER et al., 1999).

Nos grânulos neutrofílicos, a atividade de NADPH oxidase é dependente de PKC e PI3K para sua montagem apropriada (BROWN et al., 2003; SERGEANT et al., 1997). O complexo NADPH oxidase recebe elétrons de NADPH reduzido na superfície citosólica da membrana e os transfere para o O_2 na superfície extracelular da membrana. O produto dessa reação é o O_2^- , que pode ser convertido em H_2O_2 pela SOD, desencadeando a produção de EROs. O H_2O_2 formado serve de substrato para a MPO que, junto com Cl^- , leva à formação de HOCl, que é um agente microbicida potente, mas que atua como mediador de ativação de pró-colagenases e pró-gelatinases que levam ao dano tecidual (WEISS et al., 1985; HEINECKE et al., 1994).

A quimioluminescência é um importante método para estudar a produção de EROs, em tempo real, por fagócitos ativados. Para amplificar a quimioluminescência produzida por fagócitos durante a explosão oxidativa são utilizadas sondas quimioluminescentes, como o luminol e lucigenina que diferem com relação a sua sensibilidade resultante de diferentes mecanismos moleculares que levam à emissão de luz (KOPPRASCH et al., 2003).

O luminol é capaz de reagir com uma variedade de agentes oxidantes, em uma reação onde ele é oxidado a um íon aminoftalato eletronicamente excitado, que retorna a um estado basal emitindo fóton (ALLEN & LOOSE, 1976). Ainda não existe um consenso a respeito de quais espécies oxidativas reagem com o luminol, mas sabe-se que ele detecta diversos tipos de EROs, embora haja uma maior sensibilidade para aquelas envolvidas no sistema MPO- H_2O_2 (DAHLGREN & STENDAHL, 1983; ANIANSSON et al., 1984; O'DOWD et al., 2004).

A dependência de MPO para a produção de quimioluminescência dependente de luminol (QL lum) foi inicialmente constatada por meio de experimentos utilizando neutrófilos deficientes desta enzima, os quais após serem ativados não produziram QL lum (DAHLGREN & STENDAHL, 1983; ANIANSSON et al., 1984). No entanto, nesses

mesmos estudos, ensaios realizados com a lucigenina demonstraram que a deficiência de MPO não influenciava na quimioluminescência dependente de lucigenina (QL luc).

Estudos (LI et al., 1999) mostram 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 dioxietano, 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.

Nos ensaios quimioluminescência dependente de luminol (QLlum), tanto CESAC quanto AFM exibiram atividade modulatória do metabolismo oxidativo dos neutrófilos bastante expressiva. No entanto, na quimioluminescência dependente de lucigenina (QLluc) as atividades modulatórias da CESAC e AFM foram acentuadamente menores, sugerindo que seus efeitos antioxidantes sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estejam mais relacionados ao sistema MPO- H_2O_2 .

Dando continuidade aos estudos de avaliação da atividade antioxidante *in vitro* da CESAC e da AFM, foi investigada se seus efeitos estão relacionados a uma capacidade sequestradora de radicais livres. Este ensaio revelou apenas a CESAC na maior concentração mostrou uma ação antioxidante, indicando que a atividade antioxidante apresentada pelos ensaios de quimioluminescência está pouco relacionada à atividade sequestrante apresentada pela CESAC, ou não está relacionada no caso da AFM.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa (LEAL, 1995; LEAL, 2006; LEAL et al., 1995; 2003; 2009) relacionados a avaliação da segurança e das atividades antioxidante e antiinflamatória de produtos derivados e moléculas obtidos de *Amburana cearensis*. Entretanto, o estudo farmacológico com o extrato seco padronizado da planta com tecnologia agregada, é o primeiro a ser realizado. Da mesma forma, o presente estudo com a afrormosina (isoflavona), abordando seus efeitos antiinflamatórios e antioxidantes foi pioneiro. Inclusive, esses dados justificam que num futuro próximo a inclusão da determinação do teor de flavonóides totais em fitoprodutos e fitoterápicos produzidos a partir do cumaru, como parâmetro a mais no controle de qualidade desses produtos.

Por fim, o presente estudo mostrou as atividades antiinflamatória e antioxidante da CESAC e da AFM que parecem estar relacionadas a uma ação moduladora da resposta inflamatória, incluindo redução da ativação de neutrófilo, da atividade de proteases, produção de citocinas e do estresse oxidativo. As atividades farmacológicas determinadas para a CESAC e a AFM ratificam o potencial antiinflamatório do cumaru a ser empregado no tratamento de doenças inflamatórias como a asma.

7. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente estudo com as cápsulas do extrato seco de *A. cearensis* (CESAC) e com a afrormosina (AFM), isoflavonóide isolado da planta, podemos concluir:

- A CESAC e a AFM não interferiram na viabilidade de neutrófilos humano. Contudo, no ensaio de laranja de acridina a CESAC mostrou uma citotoxicidade relativa, possivelmente relacionada à presença da cumarina na planta.
- A CESAC demonstrou atividade antiinflamatória nos modelos experimentais de edema de pata, peritonite e de broncoprovocação induzida por antígeno, que parece está relacionada ao bloqueio no acúmulo de leucócitos no foco inflamatório, bem como a modulação do estresse oxidativo.
- Tanto a CESAC quanto a AFM mostraram uma atividade antiinflamatória *in vitro*, relacionada à inibição da ativação de neutrófilos, da atividade da mieloperoxidase e elastase, além da redução dos níveis de TNF α .
- A CESAC e a AFM possuem atividade inibitória sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, detectada através da quimioluminescência dependente de luminol.
- A CESAC e a AFM possuem atividade antioxidante modulando produtos relacionados com a atividade de NADPH, principalmente através do sistema mieloperoxidase-H₂O₂, onde a ação sequestradora de radicais livres parece não possuir um papel importante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGWU, D. E.; McPHAIL, L. C.; CHABOT, M. C.; DANIEL, L. W.; WYKLE, R. L.; McCALL, C. E. Choline-linked phosphoglycerides. A source of phosphatidic acid and diglycerides in stimulated neutrophils. **J Biol Chem.** v. 264, p. 1405-13, 1989.

ALLEN, R. C.; LOOSE, L. D. Phagocytic activation of a luminol-dependent chemoluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 69, p. 245-52, 1976.

AL-MEHDI, A. B.; ZHAO, G.; DODIA, C.; TOZAWA, K.; COSTA, K.; MUZYKANTOV, V.; ROSS, C.; BLECHA, F.; DINAUER, M.; FISHER, A. B. Endothelial NADPH oxidase as the source of oxidants in lungs exposed to ischemia or high K⁺. **Circ Res.** v. 83, p. 730-37, 1998.

ALVES-FILHO, J. C.; BENJAMIN, C.; TAVARES-MURTA, B. M.; CUNHA, F. Q. Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **100** (suppl 1): 223Y226, 2005.

ALVES-FILHO, J. C.; TAVARES-MURTA, B. M.; BARJA-FIDALGO, C.; BENJAMIN, C. F.; BASILE-FILHO, A.; ARRAES, S. M., CUNHA, F. Q. Neutrophil function in severe sepsis. **Endocr Metab Immune Disord Drugs Targets.** 6:151Y158, 2006.

ALVES-FILHO, J. C.; FREITAS, A.; SPILLER, F.; SOUTO, F. O.; CUNHA, F. Q. The role of neutrophils in severe sepsis. **Shock**, vol 30, supplement 1, p. 3-9, 2008.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American.** v. 90, p. 7915-922, 1993.

AMITANI, R.; WILSON, R.; RUTMAN, A.; READ, R.; WARD, C.; BURNETT, D.; STOCKLEY, R. A.; COLE, P. J. Effects of human neutrophil elastase and *Pseudomonas aeruginosa* proteinases on human respiratory epithelium. **Am J Respir Cell Mol Biol.** v. 4, p. 26-32, 1991.

ANDERSSON, T.; DAHLGREN, C.; LEW, P. D.; STENDAHI, O. Cell surface expression of fMet-Leu-Phe receptors on human neutrophils. Correlation to changes in the cytosolic free

Ca²⁺ level and action of phorbol myristate acetate. **The journal of Clinical Investigation**. v. 79, p. 1226-233, 1987.

ANDREWS, P. C.; KRINSKY, N. I. The reductive cleavage of myeloperoxidase in half, producing enzymically active hemi-myeloperoxidase. **Journal of Biological Chemistry**. v. 256, p. 4211-218, 1981.

ANIANSOON, H.; STENDAHL, O.; DAHLGREN, C. Comparison between luminol- and lucigenin-dependent chemoluminescence of polymorphonuclear leukocytes. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**. v. 92, p. 357-961, 1984.

ARARUNA, S. M. Desenvolvimento e Padronização (HLPC-DAD) do Extrato Seco por *Spray Dryer* de *Amburana cearensis* A. C. SMITH (CUMARU). 2008. **Dissertação de Mestrado** – Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

ARORA, A.; MURALEEDHARAN, G.N.; STRASBURG, G.M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biology and Medicine**. v.24, p.1355-1363, 1998.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**. v. 89, p. 357-361, 2005.

BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **The American Journal of Medicine**. v. 109, p. 33-44, 2000.

BAGGIOLINI, M.; BOULAY, F.; BADWEY, J. A.; CURNUTTE, J. T. Activation of neutrophil leukocytes: chemoattractant receptors and respiratory burst. **FASEB J**. v. 7, p. 1004-10, 1993.

BAKKEN, A. M. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells. **Curr Stem Cell Res Ther**. v. 1, p. 47-54, 2006.

BARNES, P. J.; CHUNG, K. F.; PAGE, C. P. Inflammatory mediators of asthma: an update. **Pharmacological Reviews**. v. 50, p. 515-96, 1998.

BELAAOUAJ, A. A.; McCARTHY, R.; BAUMANN, M.; GAO, Z.; LEY, T. J.; ABRAHAM, S. N.; SHAPIRO, S. D. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. **Nature Medicine**. v. 4, p. 615-18, 1998.

BELLOFIORE, S.; MARIN, J. G. Antigen challenge of sensitized rats increases airway responsiveness to methacoline. **J Appl Physiol**. v. 65, p. 1642-646, 1998.

BERMAN, M.E.; MULLER, W. A. Ligation of platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1/CD31) on monocytes and neutrophils increases binding capacity of leukocyte CR3 (CD11b/CD18). **J Immunol**. v. 154, p. 299-307, 1995.

BERTON, G.; LOWELL, C. A. Integrin signaling in neutrophils and macrophages. **Cell Signal**. v. 11, p. 621-35, 1999.

BEVILACQUA, M. P.; NELSON, R. M.; MANNORI, G.; CECCONI, O. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. **Annual Review of Medicine**. v. 45, p. 361-78, 1994.

BHARADWAJ, A.; AGRAWAL, D. K. Immunomodulation in asthma: a distant dream or a close reality? **International Immunopharmacology**. v. 4, p. 495-511, 2004.

BIAVA, M.; PORRETTA, G. C.; POCE, G.; SUPINO, S. FORLI, S.; ROVINI, M.; CAPPELLI, A.; MANETTI, F.; BOTTA, M.; SAUTEBIN, L.; ROSSI, A.; PERGOLA, C.; GHELARDINI, C.; VIVOLI, E.; MAKOVEC, S.; ANZELLOTTI, P.; PATRIGNANI, P.; ANZINI, M. Cyclooxygenase-2 inhibitors. 1,5-Dyarylpyrrol-3-acetic Esters with enhanced inhibitory activity toward cyclooxygenase-2 and improved cyclooxygenase-2/cyclooxygenase-1 selectivity. **J. Med. Chem**. v. 50, p. 5403-411, 2007.

BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Effects of aqueous extract of *Caesaria sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. **Comp Biochem and Physiol**. v. 127, p. 21-30, 2000.

BORNE, R. F.; LEVI, M.; WILSON, N. Nonsteroid anti-inflammatory drugs. *In*: FOYE, W. O.; LEMKE, T. L. **Principles of Medicinal Chemistry**. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. 6ed., p. 954-1003.

BORREGAARD, N.; HEIPLE, J. M.; SIMONS, E. R.; CLARCK, R. A. **J Cell Biol.** v. 138, p. 3913-17, 1983.

BOUCHIER-HAYES, L.; LARTIGUE, L.; NEWMAYER, D. D. Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death. **J Clin Invest.** v. 115, p. 2640-47, 2005.

BOWLER, R. P. Oxidative stress in the pathogenesis of asthma. **Curr Allergy Asthma Rep.** v. 4, p. 116-22, 2004.

BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y.; WEISS, D. S.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science.** v. 303, p. 1532-35, 2004.

BROWN, E. J. Phagocytosis. **BioEssays.** v. 17, p. 109-17, 1995.

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.

BURG, N. D.; PILLINGER, M. H. The neutrophil function and regulation in innate and humoral immunity. **Clinical Immunology.** v. 99, p. 7-17, 2001.

CABRE, M.; COMPS, J.; PATERNAIN, J. L.; FERRE, N.; JOVEN, J. Time course of changes in hepatic lipid peroxidation and glutathione metabolism in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.** v. 27, p. 694-99, 2002.

CAI, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms and consequences. **Cardiovascular Research.** v. 68, p. 26-36, 2005.

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.

CARVALHO, E. M. Xarope de Cumaru como Terapia Complementar na Asma Persistente Leve. 2009. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Fisiologia e Farmacologia - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

CASCÃO, R.; ROSARIO, H. S.; FONSECA, J. E. Neutrophils : warriors and commanders in immune mediated inflammatory diseases. **Acta Reumatol Port**. v. 34, p. 313-26, 2009.

CASTILLO, T.; KOOP, D. R.; KAMIMURA, S.; TRIADAFILOPOULOS, G.; TSUKAMODO, H. Role of cytochrome P-450 2E ethanol-carbon tetrachloride- and iron-dependent microsomal lipid peroxidation. **Hepatology**. v. 16, p. 992-96, 1992.

CHAPPLE, D. S.; JOANNOU, C. L.; MASON, D. J.; SHERGILL, J. K.; ODELL, E. W.; GANT, V.; EVANS, R. W. A helical region on human lactoferrin. Its role in antibacterial pathogenesis. **Adv Exp Med Biol**. v. 443, p. 215-20, 1998.

CHEN, J. C.; CHEN, H. M.; SHRY, M. H.; FAN, L. L.; CHI, T. Y.; CHY, C. P.; CHEN, M. F. Selective inhibition of inducible nitric oxide in ischemia-reperfusion of rat small intestine. **J Formos Med Assoc**. v. 99, p. 213-18, 2000.

CHOKCHAISIRI, R.; SUAISOM, C.; SRIPHOTA, S.; CHINDADUANG, A.; CHUPRAJOB, T.; SUKSAMRARN, A. Bioactive flavonoids of the flowers of *Butea monosperma*. **Chem Pharm Bull**. v. 57, p. 428-32, 2009.

CHUAMMITRI, P. et al. Chicken neutrophil extracellular traps (HETs): novel defense mechanism of chicken heterophils. **Vet Immunol Immunopathol**. v. 129, p. 126-31, 2009.

CLARK, S. R. et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. **Nature**. v. 13, p. 463-69, 2007.

COS, E.; RAMJIGANESH, T.; ROY, S.; YOGANATHAN, S.; NICOLOSI, R. J.; FERNANDEZ, M.L. Soluble fiber and soybean protein reduce atherosclerotic lesions in guinea pigs. Sex and hormonal status determine lesion extension. **Lipids**. v. 36, p. 1209-211, 2001.

COSTA-LOTUFO, L. V.; JIMENEZ, P. C.; WILKE, D. V.; LEAL, L. K.; CUNHA, G. M.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; VIANA, G. S.; MORAES, M. E.; DE MORAES, M. O.;

PESSOA, C. Antiproliferative effects of several compounds isolated from *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Z Naturforsch C**. v. 58, p. 675-80, 2003.

DAHLGREN, C.; STENDAHL, O. Role of myeloperoxidase in Luminol-dependent chemoluminescence of polymorphonuclear leukocytes. **Infection and Immunity**. v. 39, p. 736-41, 1983.

DALLEGRI, F.; OTONELLO, L. Tissue injury in neutrophilic inflammation. **Inflammation**. v. 46, p. 382-91, 1997.

DAUGHERTY, A.; DUNN, J. L.; RATERI, D. L.; HEINECKE, J. W. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. **Journal of Clinical Investigations**. v. 94, p. 437-44, 1994.

DAVIES, N. M.; JAMALLI, F. COX-2 selective inhibitors cardiac toxicity: getting to the heart of the matter. **Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences**. v. 7, p. 332-36, 2004.

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. N. The immune system – First of two parts. **New England Journal of Medicine**. v. 343, p. 37-49, 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.

DIJSSELBLOEM, N.; VANDEN BERGHE, W.; DE NAEYER A.; HAEGEMAN, G. Soy isoflavone phyto-pharmaceuticals in interleukin-6 affections. Multi-purpose nutraceuticals at the crossroad of hormone replacement, anti-cancer and anti-inflammatory therapy. **Biochem Pharmacol**. v. 68, p. 1171-185, 2004.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology**. v. 104, p. 15-29, 1971.

DI STASI, M. R.; LEY, K. Opening the flood-gates: how neutrophil-endothelial interactions regulate permeability. **Trends Immunol**. v. 30, p. 547–556, 2009.

DIVE, C.; GREGORY, C. D.; PHIPPS, D. J.; EVANS, D. I.; MILNER, A. E.; WYLLIE, A. H. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1133, p. 275-85, 1992.

DJUKANOVIC, R.; WILSON, J. W.; BRITTEN, K. M. Quantification of mast cells and eosinophils in the mucosa of symptomatic atopic asthmatics and healthy control subjects using immunohistochemistry. **American Review of Respiratory Diseases**. v. 142, p. 863-71, 1990.

DOZOR, A. J. The role of oxidative stress in the pathogenesis and treatment of asthma. **Ann N Y Acad Sci**. v. 1203, p. 133-37, 2010.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of the cell function. **Physiol Rev**. v. 82, p. 47-95, 2002.

EDWARDS, S. W. The O_2^- generating NADPH oxidase of phagocytes: structure and methods of detection. **Methods: A companion to methods in enzymology**, New York, v. 9, p. 563-77, 1996.

EL KEBIR, D.; JÓZSEF, L.; PAN, W.; FILEP, J. G. Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation. **Circ Res**. v. 103, p. 352-59, 2008.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.82, p. 70-77, 1959.

FALLMAN, M.; GULLBERG, M.; HELLBERG, C.; ANDERSSON, T. Complement receptor-mediated phagocytosis is associated with accumulation of phosphatidylcholine-derived diglyceride in human neutrophils. Involvement of phospholipase D and direct evidence for a positive feedback signal of protein kinase. **J Biol Chem**. v. 267, p. 2656-63, 1992.

FANTONE, J. C.; WARD, P. A. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. **American Journal of Pathology**. v. 107, p. 395-418, 1982.

FAURSCHOU, M.; SORENSEN, O. E.; JOHNSEN, A. H.; ASKAA, J.; BORREGAARD, N. Defensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory properties. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1591, p. 29-35, 2002.

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

FAUSTMAN, D.; DAVIS, M. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. **Nature.** v. 09, p. 482- 93, 2010.

FERRÁNDIZ, M.L.; ALCARAZ, M.J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents actions.** v. 32, p. 283-288, 1991.

FIALKOW, L.; WANG, Y.; DOWNEY, G. P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radical Biology and Medicine.** v. 42, p. 153-64, 2006.

FITCH, P. M.; ROGHANIAN, A.; HOWIE, S. E. M.; SALLENAVE, J. M. Human neutrophil elastase inhibitors in innate and adaptative immunity. **Biochemical Society Transactions.** v. 42, p. 279-82, 2006.

FILEP, J. G.; DELALANDRE, A.; PAYETTE, Y; FÖLDES-FILEP, E. Glucocorticoid regulates expression of L-selectin and CD11/CD18 on human neutrophils. **Circulation.** v. 96, p. 295-301, 1997.

FOOK, J. M. S. L. L.; MACEDO, L. L. P.; MOURA, G. E. D. D.; TEIXEIRA, F. M. A serine proteinase inhibitor isolated from Tamarindus indica seeds and its effects on the release of human neutrophil elastase. **Life Sciences.** v. 76, p. 2881-91, 2005.

FRANCK, T.; KOHNEN, S.; GRULKE, S.; NEVEN, P.; GOUTMAN, Y.; PETERS, F.; PIROTTE, B.; DEBY-DUPONT, G.; SERTEYN, D. Inhibitory effects of curcuminoids and tetrahydrocurcuminoids on equine activated neutrophils and myeloperoxidase activity. **Physiol Res.** v. 57, p. 577-87, 2008.

FU, X.; KAO, J. L.; BERGT, C; KASSIM, S. Y.; HUQ, N. P.; D'AVIGNON, A.; PARKS, W. C.; MECHAM, R. P.; HEINECKE, J. W. **J Biol Chem.** v. 279, p. 6209-12, 2004.

FUORTES, M.; JIN, WW.; NATHAN, C. Adhesion-dependent protein tyrosine phosphorylation in neutrophils treated with tumor necrosis factor. **J Cell Biol.** v. 120, p. 777-84, 1993.

GARDAM, M. A. et al. Anti-tumor necrosis factor agents and tuberculosis risk: mechanism of action and clinical management. **Lancet Infect Dis.** v. 3, p. 148-55, 2003.

GAUTAM, N. Heparin-binding protein (HBP/CAP37): a missing link in neutrophil-evoked alteration of vascular permeability. **Nat Med.** v. 191, p. 1123-27, 2001.

GARWICZ, D.; LENNARTSSON, A.; JACOBSEN, S. E. W.; GULLBERG, U.; LINDBARK, A. Biosynthetic profiles of neutrophil serine proteases in a human bone marrow-derived cellular myeloid differentiation model. **Haematologica.** v. 90, p. 2528-31, 2005.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORN, B. A. Cells and organs of the immune system. **Immunology.** v. 4, 2000.

GOPPELT-STRUEBE, M. Molecular mechanisms involved in the regulation of prostaglandin biosynthesis by glucocorticoids. **Biochem Pharmacol.** v. 53, p. 1389-95, 1997.

GREEN, P. S.; MENDEZ, A. J.; JACOB, J. S.; CROWLEY, J. R.; GROWDON, W.; HYMAN, B. T.; HEINECKE, J.W. Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. **J Neurochem.** v. 90, p. 724-33, 2004.

GUAY, J.; BATEMAN, K.; GORDON, R.; MANCINI, J.; RIENDEAU, D. Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E2 (PGE2) response in the system associated with the induction of microsomal PGE2 synthase-1. **Journal of Biological Chemistry.** v. 279, p. 24866-72, 2004.

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.

HÄGER, M.; COWLAND, J. B.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules in health and disease. **Journal of International Medicine.** v. 268, p. 25-34, 2010.

HALABALAKI, M.; ALEXI, X.; ALIGIANNIS, N.; LAMBRINIDIS, G.; PRATSINIS, H.; FLORENTIN, I.; MITAKOU, S.; MIKROS, E.; SKALTSOUNIS, A. L.; ALEXIS, M. N. Estrogenic activity of isoflavonoids from *Onobrychis ebenoides*. **Planta Med.** v. 72, p. 48-93, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? **Journal of Laboratorial Clinical Medicine.** v. 119, p. 598-620, 1992.

HAMID, Q. Immunobiology of asthma. **Annu Rev Physiol.** v. 71, p. 489- 507, 2009.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. **Blood.** v. 92, p. 3007-17, 1998.

HARRAK, Y.; ROSELL, G.; DAIDONE, G.; PLESCIA, S.; SCHILLACI, D.; PUJOL, M. D. Synthesis and biological activity of new anti-inflammatory compounds containing the 1,4-benzodioxine and/or pyrrole system. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** v. 15, p. 4876-890, 2007.

HARTMANN, J; SCEPEK, S.; LINDAU, M. Regulation of granule size in human and horse eosinophils by number of fusion events among unit granules. **J Physiol.** v. 483, p. 201-299, 1995.

HASTY, K. A.; POURMOTABBED, T. F.; GOLDBERG, G. I.; THOMPSON, J. P.; SPINELLA, D. G.; STEVENS, R. M.; MAINARDI, C. L. Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. **J Biol Chem.** v. 265, p. 11421-424, 1990.

HAWKEY, C. J.; New drug class. COX-2 inhibitors. **The Lancet.** v. 353, p. 307-14, 1999.

HEINECKE, J. W.; LI, W.; MUELLER, D. M.; BOHRER, A.; TURK, J. Cholesterol chlorohydrins synthesis by the myeloperoxidase-hydrogen peroxidase-chloride system: potential markers for lipoproteins oxidatively damaged by phagocytes. **Biochemistry.** v. 33, p. 10127-36, 1994.

HELLBERG, C.; MOLONY, L.; ZHENG, L.; ANDERSSON, T. Ca²⁺ signaling mechanisms of the beta 2 integrin on neutrophils: involvement of phospholipase C gamma 2 and Ins(1,4,5)P₃. **Biochem.** v. 317, p. 403-09, 1996.

HENRIQUES, M. G.; SILVA, P. M.; MARTINS, M. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R. S. Mouse paw edema. A new model for inflammation? **Braz J Med Biol Res.** v.20, p. 243-49,1987.

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

HERATH, H. M. T. B.; DASSANAYAKE, R. S.; PRIYADARSHANI, A. M. A.; DE SILVA, S.; WANNIGAMA, G. P.; JAMIE, J. Isoflavonoids and a pterocarpan from *Glicirida sepium*. **Phytochemistry.** v. 47, p. 117-19, 1998.

HEYWORTH, P. G. et al. Chronic granulomatous disease. **Current Opinion in Immunology.** v. 15, p. 578-84, 2003.

HIRAGUCHI, Y.; NAGAO, M.; HOSOKI, K.; TOKUDA, R.; FUJISAWA, T. Neutrophil Proteases Activate Eosinophil Function *in vitro*. **Int Arch Allergy Immunol.** v. 146, p. 16-21, 2008.

HOLGATE, S. T. Inflammatory and structural changes in the airway of patients with asthma. **Respir Med.** v. 94, p. 03-06, 2000.

HOLGATE, S. T. Asthma: a dynamic disease of inflammations and repair. In: **The rising trends in asthma.** 1997. 5 p.

HOLLMAN, P.C.; KATAN, M.B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology.** v. 37, p. 937-42, 1999.

HOTCHKISS, R. S.; STRASSER, A.; MCDUNN, J. E.; SWANSON, P. E. Cell Death. **N Engl J Med.** v. 361, p. 1570-1583, 2009.

HUBBARD, R. C.; FELLS, G.; GADEK, J.; PACHOLOK, S.; HUMES, J.; CRYSTAL, R. G. Neutrophil accumulation in the lung in alpha 1-antitrypsin deficiency. Spontaneous release of leukotriene B4 by alveolar macrophages. **J Clin Invest.** v. 88, p. 891-97, 1991.

HUONG, N. T. T.; MATSUMOTO, K.; KASAI, R.; YAMASAKI, K.; WATANABE, H. In vitro antioxidant activity of Vietnamese Ginseng saponin and its constituents. **Biological Pharmaceutical Bulletin.** v. 21, p. 978-81, 1998.

HUTSON, P. A. Investigations into the mechanisms of late phase responses in guinea pig airways. 1989. 282 f. **Thesis (Doctor of Philosophy)** – Faculty of Medicine, University of Southampton.

HYNES, J.; FLOYD, S.; SOINI, A. E.; O'CONNOR, R.; PAPKOVSKY, D. B. Fluorescence-based cell viability screening assays using water-soluble oxygen probes. **J Biomolec Screen.** v. 8, p. 264-72, 2003.

JESAITIS, A. J.; BUESCHER, E. S.; HARRISON, D.; QUINN, M. T.; PARKOS, C. A.; LIVESEY, S.; LINNER, J. Ultrastructural localization of cytochrome b in the membranes of resting and phagocytosing human granulocytes. **J Clin Invest.** v. 85, p. 821-35, 1990.

JOHANSSON, S.; GORANSSON, U.; LUIJENDIJK, T.; BACKLUND, A.; CLAESON, P.; BOHLIN, L. A neutrophil multitarget functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products. **Journal of Natural Products.** v. 65, p. 32-41, 2002.

JOINER, K. A.; GANZ, T.; ALBERT, J.; ROTROSEN, D. The opsonizing ligand on *Salmonella typhimurium* influences incorporation of specific, but not azurophil, granules constituents into neutrophil phagosomes. **J Cell Biol.** v. 109, p. 2771-82, 1989.

KANASHIRO, A.; POLIZELLO, A. C.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Inhibitory activity of flavonoids from *Lychnophora* sp. on generation of reactive oxygens species by neutrophils upon stimulation by immune complexes. **Phytotherapy Research.** v. 81, p. 61-65, 2004.

KANASHIRO, A.; SOUZA, J. G.; KABEYA, L. M.; AZZOLINI, A. E. C. S.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Elastase Release by Stimulated Neutrophils Inhibited by Flavonoids: Importance of the Catechol Group. **Z. Natuforsch.** v. 62, p. 357-61, 2007.

KANG, T.; YI, J.; YANG, W.; WANG, X.; JIANG, A.; PEI, D.. Functional characterization of MT3-MMP in transfected MDCK cells: Progelatinase A activation and tubulogenesis in 3-D collagen lattice. **Faseb J.** v. 14, p. 2559–2568, 2001.

KANOFSKY, J. R.; WRIGHT, J.; MILES-RICHARDSON, G. E.; TAUBER, A. I. Biochemical requirements for singlet oxygen production by purified human myeloperoxidase. **The Journal of Clinical Investigation.** New Haven, v. 74, p. 1489-95, 1984.

KEANE, J. et al. Tuberculosis associated with Infliximab, a tumor necrosis factor α -neutrizing agent. **N Engl J Med.** v. 345, p. 1098-1104, 2001.

KERR, L. D.; DUCKETT, C. S.; WAMSLEY, P.; ZHANG, Q.; CHIAO, P.; NABEL, G.; McKEITHAN, T. W.; BAEUERLE, P. A.; VERMA, I.M. The proto-oncogene BCL-3 encodes an I κ B protein. **Genes & Dev.** v. 6, p. 2352-63, 1992.

KESSELS, G. C.; KRAUSE, K. H.; VERHOEVEN, A. J. Protein kinase C activity is not involved in N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine-induced phospholipase D activation in human neutrophils, but is essential for concomitant NADPH oxidase activation: studies with a staurosporine analogue with improved selectivity for protein kinase C. **Biochem J.** v. 292, p. 781-85, 1993.

KESSMANN, H.; EDWARDS, R.; GENO, P. W.; DIXON, R. A. Stress response in Alfalfa (*Mendicago sativa* L.). **Plant Physiol.** v. 94, p. 227-32, 1990.

KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S. G.; KHALIL, N. M.; VILEGAS, W.; FONSECA, L. M. Effect of the isocoumarin paepalantine on the luminol and lucigenin amplified chemoluminescence of rat neutrophils. **Biological and Pharmaceutical Bulletin.** v. 26, p. 905-08, 2003.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase. **Proceedings of the Association of American Physicians** v. 111, p. 383-89, 1999.

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

KLIONSKY, D. J. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 8, p. 931-37, 2007.

KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M.; NIZET. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. **Blood**. v. 111, p. 3070-80, 2008.

KONOSHIMA, T.; KOKUMAI, M.; KOZUKA, M. Anti-tumor-promoting activities of afrormosina and soyasaponin I isolated from *wistaria brachybotrys*. **Journal of Natural Products**. v. 55, p. 1776-78, 1992.

KOOPMAN, G.; REUTELINGSPERGER, C. P.; KUIJTEN, G. A.; KEEHNEN, R. M.; PALS, S. T.; VAN OERS, M. H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**. v. 84, p. 1415-420, 1994.

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

KUMAR, R. K. Understanding airway remodeling in asthma: a basis of improvements in therapy. **Pharmacology and Therapeutic**. v. 91, p. 93-104, 2001.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. **International Immunopharmacology**. 2010.

KROEMER, G.; MARTINI, S. J. Caspase-independent cell death. **Nat Med**. v. 11, p. 725-30, 2005.

LAI, Z.; GAN, X.; WEI, L.; ALLISTON, K. R. Potent inhibitor of human leukocyte elastase by 1,2,5-thiadiazolidium-3-one 1,1 dioxide-based sulfonamide derivatives. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 429, p. 191-97, 2004.

LASTER, S. M.; WOOD, J. G.; GOODING, L. R. Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis. **J Immunol.** v. 141, p. 2629-34, 1988.

LAU, D.; MOLLNAU, H.; EISERICH, J. P.; FREEMAN, B. A.; DAIBER, A.; GEHLING, U. M.; BRUMMER, J.; RUDOLPH, V.; MUNZEL, T.; HEITZER, T.; MEINERTZ, T.; BALDUS, S. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. **PNAS.** v. 02, p. 431-36, 2005.

LAUDANNA, C.; CONSTANTIN, G.; BARON, P.; SCARPINI, E.; SCARLATO, G.; CABRINI, G.; DECHECCHI, C.; ROSSI, F.; CASSATELLA, M. A.; BERTON, G. Sulfatides trigger increase of cytosolic free calcium and enhanced expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8 mRNA in human neutrophils. Evidence for a role of L-selectin as a signaling molecule. **J Biol Chem.** v. 269, p. 4021-26, 1994.

LEAL, L. K. A. M. **Estudos farmacológicos do extrato hidroalcolólico e constituintes químicos de *Torresea cearensis* Fr. Allem.** 128 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, 1995.

LEAL, L. K. A.M.; MATOS, F. J. A.; VIANA, G.S.B. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the hydroalcoholic extract and coumarin from *Torresea cearensis* Fr. All. **Phytomedicine.** v. 04, p. 221–7, 1997.

LEAL, L. K. A. M.; NOBRE-JÚNIOR, H. V.; MORAES, G. A.; PESSOA, C.; OLIVEIRA, R. A.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; VIANA, G. S. B. Anti-inflammatory and Smooth Muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical constituents of *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Phytotherapy Research.** v. 17, p. 335-40, 2003.

LEAL, L. K. A. M. Contribuição para a validação do uso medicinal de *Amburana cearensis* (cumaru): estudos farmacológicos de princípios bioativos, isocampferídio e amburosídio A. 2006. 189 f. **Tese (Doutorado em Farmacologia)** - Departamento de Farmacologia e Fisiologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

LEAL, L. K. A. M.; COSTA, M.F.; PITOMBEIRA, M.; BARROSO, V. M.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; VIANA, G. S. B. 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.; FONSECA, F. N.; PEREIRA, F. A.; CANUTO, K. M.; FELIPE, C. F.; FONTENELE, J.B.; PITOMBEIRA, M. V.; SILVEIRA, E. R.; VIANA, G. S. Protective effects of amburoside A, a phenol glucoside from *Amburana cearensis*, against CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. **Planta Med.** v. 74, p. 407-502, 2008.

LEAL, L. K.; CANUTO, K. M.; DA SILVA COSTA, K. C.; NOBRE-JÚNIOR, H. V.; VASCONCELOS, S.M.; SILVEIRA, E. R.; FERREIRA, M. V.; FONTENELE, J. B.; ANDRADE, G. M.; DE BARROS VIANA, G. S. Effects of amburoside A and isokaempferide, polyphenols from *Amburana cearensis*, on rodent inflammatory processes and myeloperoxidase activity in human neutrophils. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** v. 104, p. 198-205, 2009.

LEE, H.; SHI, W.; TONTONOZ, P.; WANG, S.; SUBBANAGOUNDER, G.; HEDRICK, C. C. Role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha in oxidized phospholipid-induced synthesis of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 by endothelial cells. **Circ Res.** v. 87, p. 516–21, 2000.

LEE, W. L.; DOWNEY, G. P. Leukocyte elastase physiological functions and role in acute lung injury. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.** v. 194, p. 896-904, 2001.

LEES, P. et al. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.** v. 27, p. 479-90, 2004.

LEFKOWITZ, D. L.; MILLS, K. C.; MOGUILJEVSKI, N.; BOLLEN, A.; VAZ, A.; LEFKOWITZ, S. S. Regulation of macrophage function by human recombinant myeloperoxidase. **Immuno Lett.** v. 36, p. 43-49, 1993.

LEITINGER, N.; TYNER, T. R.; OSLUND, L.; RIZZA, C.; SUBBANAGOUNDER, 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.

LIANG, B.; PETTY, H. R. Imaging neutrophil activation: analysis of the translocation and utilization of NAD(P)H-associated autofluorescence during antibody-dependent target oxidation. **J Cell Physiol.** v. 152, p. 145-56, 1992.

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.

LIU, Y.; SHAW, S. K.; MA, S.; YANG, L.; LUSCINSKAS, F. W.; PARKOS, C. A. Regulation of leukocyte transmigration: cell surface interactions and signaling events. **J Immunol.** v. 172, p. 07-13, 2004.

LOPEZ-GONZALEZ, J. S.; PRADO-GARCIA, H.; AGUILAR-CAZARES, D.; MOLINA-GUARNEROS, J. A.; MORALES-FUENTES, J.; MANDOKI, J. J. Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cells. **Lung Cancer.** v. 43, p. 275-83, 2004.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas.** Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 298 p.

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.

MAJNO, G.; PALADE, G. E. Studies in inflammation. I. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. **J Biophys Biochem Cytol.** v. 11, p. 571-605, 1961.

MALLE, E.; FURTMÜLLER, P. G.; SATTLER, W.; OBINGER, C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? **British Group of Pharmacology.** v. 152, p. 838-54, 2007.

MANZOLLI, S.; MACEDO-SOARES, M. F.; VIANNA, E. O.; SANNOMIYA, P. Allergic airway inflammation in hypothyroid rats. **J Allergy Clin Immunol.** v. 104, p. 595-600, 1999.

MARASCO, W. A.; PHAN, S. H.; KRUTZSCH, H.; SHOWELL, H. J.; FELTNER, D. E.; NAIM, R.; BECKER, E. L.; WARD, P. A. Purification and identification of formyl-

methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 259, p. 5430-439, 1984.

MARNETT, L. J.; KALGUTKAR, A. S. Design of selective inhibitors of cyclooxygenase-2 as nonulcerogenic anti-inflammatory agents. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 2, p. 482-90, 1998.

MARTIN-PADURA, I.; LOSTAGLIO, S.; SCHNEEMANN, M.; WILLIAMS, L.; ROMANO, M.; FRUSCELLA, P.; PANZERI, C.; STOPPACCIARO, A.; RUCCO, L.; VILLA, A.; SIMMONS, D.; DEJANA, E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. **J Cell Biology**. v. 142, p. 117-27, 1998.

MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais – Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 2ed., Fortaleza, Imprensa Universitária, 2000.

MAYER-SCHOLL, A.; AVERHOFF, P.; ZYCHLINSKY, A. How do neutrophils and pathogens interact? **Current Opinion in Microbiology**. v. 7, p. 62-66, 2004.

MACGAHON, A. J.; MARTIN, S. M.; BISSONNETTE, R. P.; MAHIBOUBI, A.; SHI, Y.; MOGIL, R. J.; NISHIOKA, W. K.; GREEN, D. R. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods Cell Biology**. v. 1785, p. 96-132, 1995.

McGARVEY, L. P.; DUNBAR, K.; MARTIN, S. L.; BROWN, V.; MACMAHON, J.; ENNIS, M.; ELBORN, J. S. Cytokine concentrations and neutrophil elastase activity in bronchoalveolar lavage and induced sputum from patients with cystic fibrosis, mild asthma and healthy volunteers. **J Cyst Fibros**. v. 1, p. 269-275, 2002.

McMURRAY, T. B. H.; THENG, C. Y. **Journal of the Chemical Society**. 1960.

MEDZHITOF, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**. v. 454, p. 428-35, 2008.

MEISCHL, C.; ROOS, D. The molecular basis of chronic granulomatous disease. **Immunopathol**. v. 19, p. 417-34, 1998.

METZLER, K. D.; FUCHS, T. A.; NAUSEEF, W. M.; REUMAUX, D.; ROESLER, J.; SCHULZE, I.; WAHN, V.; PAPAYANNOPOULOS, V.; ZYCHLINSKY, A. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. **Blood**. 2010.

MIDWINTER, R. G.; VISSERS, M. C.; WINTERBOURN, C. C. **Arch Biochem Biophys**. v. 394, p. 13-20, 2001.

MINERVINI, F.; FORNELLI, F.; FLYNN, K. M. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, depxynivalenol, and fumonisin B1 in a human erythroleukemia cell line. **Toxicol In Vitro**. v. 18, p. 21-28, 2004.

MIRANDA, F. G. G.; VILAR, J. C.; ALVES, I. A. N.; CAVALCANTI, S. C. H.; ANTONIOLLI, A. R. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellanedae* Lor. Ex Griseb. Inner bark aqueous extract. **BMC Pharmacol**. v. 1, p. 6, 2001.

MOHAN, N. et al. Demyelination occurring during anti-tumor necrosis factor α therapy for inflammatory arthritides. **Arthritis Rheum**. v. 44, p. 2862-69, 2001.

MONTESEIRÍN, J. Neutrophils and asthma. **J Investig Allergol Clin Immunol**. v. 19 (5), p. 340-354, 2009.

MOORE, K. L.; PATEL, K. D.; BRUEHL, R. E.; FUGANG, L.; JOHNSON, D. A.; LICHENSTEIN, H. S. P-selectin glycoprotein Ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. **J Cell Biol**. v. 128, p. 661, 1995.

MORENO, J. J. Antiflammins: endogenous nonapeptides with regulatory effect on inflammation. **Gen Pharmacol**. v. 28, p. 23-6, 1997.

MORRISSON, D.C. Endotoxins and disease mechanisms. **Annu Rev Med**. v. 38, p. 417-32, 1987.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal plants of Brazil**. Reference publications, Inc. Michigan, 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.

MOTA, L. M. H.; LAURINDO, I. M. M.; SANTOS-NETO, L. L. S. Artrite reumatóide inicial – conceitos. **Revista Associação Médica Brasileira**. v. 56, 2010.

MULLER, W. A. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. **Laboratory Investigation**. v. 82, p. 521-34, 2002.

NAGRA, R. M.; BECHER, B.; TOURTELLOTE, W. W.; ANTEL, J. P.; GOLD, D.; PALADINO, T.; SMITH, R. A.; NELSON, J. R.; REYNOLDS, W. F. Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. **J. Neuroimmunol**. v. 78, p. 97-107, 1997.

NANES, M. S. Tumor necrosis factor- α : molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. **Gene**. v. 321, p. 1–15, 2003.

NAUSEEF, W. M. The NADPH-dependent oxidase of phagocytes. **Proc Assoc Am Physicians**. v. 111, p. 373-82, 1999.

NG-SIKORSKI, J.; ANDERSSON, R.; PATARROYO, M.; ANDERSSON, T. Calcium signaling capacity of the CD11b/CD18 integrin on human neutrophils. **Exp Cell Res**. v. 195, p. 504-08, 1991.

O'DOWD, Y.; DRISS, F.; MY-CHAN DANG, P.; ELBIM, C.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A.; PASQUIER, C.; EL-BENNA, J. 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.

PALIC, D. et al. Fish cast NETs: neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. **Developmental and Comparative Immunology**. v. 129, p. 126-31, 2007.

PARINANDI, N. L.; KLEINBERG, M. A.; USATYUK, P. V.; CUMINGS, R. J.; PENNATHUR, A.; CARDOUNEL, A. J. Hypoxia-induced NAD(P)H oxidase activation

and regulation by MAP kinases in human lung endothelial cells. **American Journal of Physiology. Lung Cell Molecular Physiology**. v, 284, p. L26-38, 1999.

PEREIRA, F. E. L.; BOGLIOLO, L. **Patologia Geral**. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 111-147, 1998.

PETERS, S. P.; ZANGRILLI, J. G.; FISH, J. E. Late phase allergic reactions. In: Middleton Jr. E.; REED, C. F. ; ELLIS, E. F.; ADKINSON JR., N. F. 5th Edition. **Allergy: Principles and practice**, vol. 1. St. Louis: Mosby-Year Book; 1998. 342-55 p.

PHAM, C. T. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. **Nat Rev Immunol**. v. 6, p. 541-50, 2006.

PILLINGER, M. H.; CAPODICI, C.; ROSENTHAL, P.; KHETERPAL,N.; HANFT, S.; PHILIPS, M. R.; WEISSMANN, G. Modes of action of aspirin-like drugs: salicylates inhibit erk activation and integrin-dependent neutrophil adhesion. **Proc Natl Acad Sci**. v. 95, p. 14540-545, 1998.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**. v. 142, p. 331-38, 2004.

PRADO, F. C. et al. **Atualização Terapêutica**. 2001. 20ed., São Paulo: Artes Médicas, 2001. p. 177-78.

PUEBLA, P.; OSHIMA-FRANCO, Y.; FRANCO, L.M.; SANTOS, M. G.; SILVA, R. V.; RUBEM-MAURO, L.; FELICIANO, A. S. Chemical constituents of the bark of *Dipteryx odorata* alata Vogel, na active species against Bothrops jararacussu venom. **Molecules**.v .12, p. 8193-204, 2010.

RADEAU, T.; CHAVIS, C.; DAMON, M.; MICHEL, F. B.; CRASTES DE PAULET, A.; GODARD, P. H. Enhanced arachidonic acid metabolism and human neutrophil migration in asthma. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. v. 41, p. 131-38, 1990.

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

REDDY, R. V.; KHALIVULLA, S. I.; REDDY, B. A.; REDDY, M. V.; GUNASEKAR, D.; DEVILLE, A.; BODO, B. Flavonoids from *Tephrosia calophylla*. **Nat Prod Commun.** v. 4, p. 59-62, 2009.

REID, P. T.; SALLENAVE, J. M. Neutrophil-derived elastases and their inhibitors: potential role in the pathogenesis of lung disease. **Current Opinion in Investigation Drugs.** v. 2, p. 337-42, 2001.

RENZI, D.; VALTOLINA, M.; FORSTER, R. The evaluation of a multi endpoint citotoxicity assay. Italian Culture Meeting. **Alternative to Laboratory Animals.** v.21, p. 86-89, 1993.

ROBINSON, W.; GENOVESE, M.; MORELAND, L. Demyelinating and neurologic events reported in association with tumor necrosis factor α antagonism improve rheumatoid arthritis but exarcebate multiple sclerosis? **Athritis Rheum.** v. 44, p. 1977-83, 2001.

ROGHANIAN, A.; SALLENAVE, J. M. Neutrophil elastase (NE) and NE inhibitors: canonical and noncanonical functions in lung chronic inflammatory diseases (cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease). **Journal of Aereosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery.** v. 21, p. 125-44, 2008.

ROTHMAN, J. E. The protein machinery of vesicle budding and fusion. **Protein Sci.** v. 5, p. 185-94, 1996.

ROY, P.; KULKARNI, A. P. Oxidation of ascorbic acid by lipoxigenase: effect of selected chemicals. **Food Chemical Toxicology.** v. 34, p. 563-70, 1996.

SABINO, K. C. C. et al. In vitro and in vivo toxicological study of *Pterodon pubescens* seed oil. **Toxicology Letters.** v. 108, p. 27-35, 1999.

SAINT-CRICQ DE GAULEJAC, N. S.; PROVOST, C.; VIVAS, N. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. **Journal of Agriculture and Food Chemistry.** v. 47, p. 425-31, 1999.

SALTER, E. A.; WIERZBICKI, A.; SPERL, G.; THOMPSON, W. J. Molecular modeling study of COX-2 inhibition by diarylheterocycles and sulindac sulfide. **Journal of Molecular Structure**. v. 549, p. 111-21, 2001.

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

SÁ-LEITÃO, K. S. AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA DO EXTRATO SECO PADRONIZADO (HPLC-PDA) DE *Amburana cearensis*- CUMARU. **Monografia** - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SCAPINI, P.; LAPINET-VERA, J. A.; GASPERINI, S.; CALZETTI, F.; BAZZONI, F.; CASSATELLA, M.A. The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunol Rev**. v. 177, p. 195-203, 2000.

SCHIEFFER, B.; DREXLER, H. Role of 3-hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, angiotensin-converting-enzyme inhibitors, cyclooxygenase-2 inhibitors, and aspirin in anti-inflammatory and immunomodulatory treatment of cardiovascular diseases. **American Journal of Cardiology**. v. 91, p. 12-18, 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.

SCHOONBROODT, S.; LEGRAND-POELS, S.; BEST-BELPOMME, M.; PIETTE, J. **Biochem J**. v. 321, p. 777-85, 1997.

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.

SENGELØV, H.; KJELDSEN, L.; BORREGAARD, N. Control of exocytosis in early neutrophil activation. **J Immunol**. v. 150, p. 1535-43, 1993.

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, 1997.

SERTIÉ, J. A. A.; BASILE, A. C.; PANIZZA, S. et al. Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. **Planta Medica.** v. 56, p. 36-40, 1990.

SHAMAMIAN, P.; SCHWARTZ, J.D.; POCOCK, B.J.; MONEA, S.; WHITING, D.; MARCUS, S.G.; MIGMATTI, P. Activation of progelatinase A (MMP-2) by neutrophil elastase, cathepsin G, and proteinase-3: a role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis. **J Cell Physiol.** v.189, p. 197–206, 2001.

SHIM, H. Y.; PARK, J. H.; PAIK, H. D.; NAH, S. Y.; KIM, D. S.; HAN, Y. S. Genistein-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells involves calpain-caspase and apoptosis signaling kinase 1-p38 mitogen-activated protein kinase activation cascades. **Anticancer Drugs.** v. 18, p. 649-57, 2007.

SIMON, A. R.; RAI, U.; FANBURG, B.L.; COCHRAN, B. H. Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. **Am J Physiol.** v. 275, p. 1640-52, 1998.

SOARES, A. K. A. et al. Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico composto de *Torresea cearensis* em voluntários saudáveis. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.** v. 9, n. 2, p. 55-60, 2007.

SPISANI, S.; FALZARANO, S.; TRANIELLO, S.; NALLI, M.; SELVATIVI, R. A “pure” chemoattractant formylpeptide analogue triggers a specific signalling pathway in human neutrophil chemotaxis. **FEBS J.** v. 272, p. 883-91, 2005.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant defence: vitamins E and C and carotenoids. **Diabetes.** v. 46, p. 14-18, 1997.

STEINFELD, S.; BJØRKE, P. A. Results from a patient survey to assess gastrointestinal burden of non-steroidal anti-inflammatory drug therapy contrasted with a review of data from EVA to determine satisfaction with rofecoxib. **Rheumatology (Oxford).** v. 41, p. 35-42, 2002.

STEINBECK, M.J.; ROTH, J.A. Neutrophil activation by recombinant cytokines. **Rev Infect Dis.** v. 11, p.549–68, 1989.

SUCHARD, S. J.; NAKAMURA, T.; ABE, A.; SHAYMAN, J. A.; BOXER, L. A. Phospholipase D-mediated diradylglycerol formation coincides with H₂O₂ and lactoferrin release in adherent human neutrophils. **J Biol Chem.** v. 269, p. 8063-68, 1994.

SUNDARESAN, M.; YU, Z. X.; FERRANS, V. J.; IRANI, K.; FINKEL, T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. **Science.** v. 270, p. 296-99, 1995.

TAKAHASHI, T.; BROSS, J. B.; SHABER, R. E.; WILLIAMS, R. J. Effect of cryoprotectants on the viability and function of unfrozen human polymorphonuclear cells. **Cryobiology.** v. 22, p. 336-50, 1985.

TEKIN, D.; YAVUZER, S.; TEKIN, M. et al. Possible effects of antioxidant status on increased platelet aggregation in childhood iron-deficiency anaemia. **Pediatr Int.** v. 43, p. 74-77, 2001.

THELEN, M.; DEWALD, B.; BAGGIOLINI, M. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. **Physiological Reviews.** v. 73, p. 797-821, 1993.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science.** v. 267, p. 1456-62, 1995.

TKALCEVIC, J.; NOVELLI, M.; PHYLLACTIDES, M.; IREDALE, J. P.; SEGAL, A. W.; ROES, J. Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. **Immunity.** v. 12, p. 201-10, 2000.

TODA, S.; SHIRATAKI, Y. Inhibitory Effects of Isoflavones on Lipid Peroxidation by Reactive Oxygen Species. **Phytotherapy Research.** v. 13, p. 163-65, 1999.

TRACEY, K. J.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. **Annu Rev Med.** v. 45, p. 491–503, 1994.

TREMBLAY, G. M.; JANELLE, M. F.; BOURBONNAIS, Y. Anti-inflammatory activity of neutrophil elastase inhibitors. **Curr Opin Investig Drugs**. v. 4, p. 556-65, 2003.

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 antiinflamatorio**. CYTED – Subprograma X Proyecto X.6. Espanha, 2002.

VAN BUUL, J. D.; HORDIJK, P. L. Signaling in leukocyte transendothelial migration. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 24, p. 824-33, 2004.

VAN DER VEEN, B.; WINTHER, M. P. J.; HEERINGA, P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. **Antioxidants and Redox Signaling**. v. 11, p. 2900-24, 2009.

VANDIVIER, R. W.; FADOK, V. A.; HOFFMANN, P. R.; BRATTON, D. L.; PENVARI, C.; BROWN, K. K.; BRAIN, J. D.; ACCURSO, F. J.; HENSON, P. M. Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis. **J Clin Invest**. v. 109, p. 661–70, 2002.

VARNER, A. E.; LEMANSKE JR, R. F. The early and late response to allergen. In: BUSSE, W. W.; HOLGATE, S. T. 2nd Edition. **Asthma and rhinitis**. London: Blackwell; 2000. 1172-85 p.

VILLACORTA, H.; MASETTO, A. C.; MESQUITA, A. T. Proteína C-reativa: marcador inflamatório com valor prognóstico em pacientes com insuficiência cardíaca descompensada. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 88, 2007.

VILE, G. F.; ROTHWELL, L. A.; KETTLE, A. J. Hypochlorous Acid Activates the Tumor Supression Protein p53 in Cultured Human Skin Fibroblasts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 359, p. 51-56, 1998.

VINOLA, A. M.; KIPS, J.; BOUSHEY, H. A. Airway inflammation and remodeling in asthma. **J Allergy Clin Immunol**. v. 105, p. 1041-53, 2003.

WALSH, D.E.; GREENE, C.M.; CARROLL, T.P.; TAGGART, C.C.; GALLAGHER, P. M.; O'NEILL, S.J.; McELVANEY, N.G. IL-8 up-regulation by neutrophil elastase is mediated by MyD88/IRAK/TRAF-6 in human bronchial epithelium. **J Biol Chem.** v. 276, P. 35494–99, 2001.

WALTER, M. F. et al. Sulfone COX-2 inhibitors increase susceptibility of human LDL and plasma to oxidative modification: comparison to sulfonamide COX-2 inhibitors and NSAIDs. **Artherosclerosis.** v. 177, p. 235-43, 2004.

WANG, H.Y.; KOMOLPIS, K.; KAUFMAN, P.B.; MALAKUL, P.; SHOTIPRUK, A. Permeabilization of metabolites from biologically viable soybeans (*Glycine max*). **Biotechnol Prog.** v. 17, p. 424-30, 2001.

WARNER, T. D.; MITCHELL, J. A. Cyclooxygenase-3 (COX-3): filling in the gaps toward a COX continuum? **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 99, p. 13371-373, 2002.

WARTHA, F. et al. Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. **Curr Opin Microbiol.** v. 10, p. 52-56, 2007.

WATANABE, A.; MISHIMA, H.; RENZI, P. M.; XU, L. J.; HAMID, Q.; MARTIN, J. G. Transfer of allergic airway responses with antigen-primed CD4⁺ but not CD8⁺ T cells in brown Norway rats. **J Clin Invest.** v. 96, p. 1303-310, 1995.

WEISS, S. J.; PEPPIN, G.; ORTIZ, X.; RAGSDALE, C.; TEST, S. T. Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils. **Science.** v. 227, p. 747-49, 1985.

WILKENS, T.; DE RIJK, R. Glucocorticoids and immune function. **Immunol Today.** v. 18, p. 418, 1998.

WINTER, C. A.; RISELY, E. A.; NUSS, G. W. Carragenan-induced edema in the hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.** v. 111, p. 544-47, 1962.

WITZUM, J. L. The oxidative hypothesis of atherosclerosis. **Lancet.** v. 344, p. 793-95, 1994.

WITKO-SARSAT, V.; RIEU, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; LESAVRE, P.; HALBWACHS-MECARELLI, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Lab Invest.** v. 80, p. 617-653, 2000.

WOLFE, F.; MICHAUD, K.; ANDERSON, J.; URBANSKY, K. Tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis and the effect of infliximab therapy. **Arthritis Rheum.** v. 50, p. 372-79, 2004.

WRIGHT, H. L.; MOOTS, R. J.; BUCKNALL, R. C.; EDWARDS, S. W. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology.** v. 49, p. 1618- 631, 2010.

YAMAMORI, T.; INAMARI, O.; NAGAHATA, H.; CUI, Y.; KUWABARA, M. Roles of p38 MAPK, PKC and PI3-K in the signaling pathways of NADPH oxidase activation and phagocytosis in bovine polymorphonuclear leucocytes. **FEBS Lett.** v. 467, p. 253-58, 2000.

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

ZYCHLINKSY, A.; WEINRAUCHE, Y.; WEISS, J. Forum in immunology. Introduction: Forum in immunology on neutrophils. **Microbes and Infection.** v. 5, p. 1289-91, 2003.

