

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Bárbara Oliveira Henriques

**ESPÉCIES VEGETAIS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA:
caracterização fitoquímica e atividades anti-TNF- α e antiartrítica de
Stryphnodendron adstringens (MART.) Coville**

Belo Horizonte – MG
Faculdade de Farmácia - UFMG

2024

Bárbara Oliveira Henriques

**ESPÉCIES VEGETAIS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA:
caracterização fitoquímica e atividades anti-TNF- α e antiartrítica de
Stryphnodendron adstringens (MART.) Coville**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito necessário à obtenção do grau de doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientador: Prof. Dr. Fernão Castro Braga – FAFAR, UFMG

Coorientadora: Profa. Dr^a. Rachel Oliveira Castilho – FAFAR, UFMG

Colaboradores: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira – ICB, UFMG, Prof. Dr. Flávio Almeida Amaral – ICB, UFMG, Profa. Dr^a. Danielle da Glória de Souza – ICB, UFMG, Prof. Dr. Rodrigo Maia de Pádua – FAFAR, UFMG.

Belo Horizonte – MG

2024

H519e Henriques, Bárbara Oliveira.
Espécies vegetais com potencial atividade anti-inflamatória [recurso eletrônico] : caracterização fitoquímica e atividades anti-TNF- α e antiartrítica de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville / Bárbara Oliveira Henriques. – 2016.

1 recurso eletrônico (191 f. : il.) : pdf

Orientador: Fernão Castro Braga.

Coorientadora: Rachel Oliveira Castilho.

Colaboradores: Mauro Martins Teixeira.

Flávio Almeida Amaral.

Danielle da Glória de Souza.

Rodrigo Maia de Pádua.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Colite ulcerativa – Teses. 2. Artrite reumatoide – Teses. 3. Polifenóis – Teses. 4. *Stryphnodendron barbatimam* – Teses. 5. Citocinas – Teses. 6. Antioxidantes – Teses. 7. Extratos vegetais – Teses. I. Braga, Fernão Castro. II. Castilho, Rachel Oliveira. III. Teixeira, Mauro Martins. IV. Amaral, Flávio Almeida. V. Souza, Danielle da Glória de. VI. Pádua, Rodrigo Maia de. VII. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. VIII. Título.

CDD: 615.537

Elaborado por Luciene Aparecida Costa – CRB-6/2811



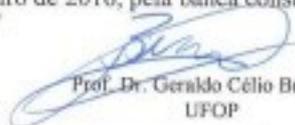
FOLHA DE APROVAÇÃO

Espécies vegetais com potencial atividade anti-inflamatória: caracterização fitoquímica e atividades anti-TNF- α e antiartrítica de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville

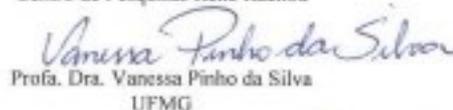
BÁRBARA OLIVEIRA HENRIQUES

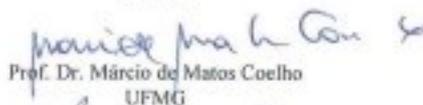
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

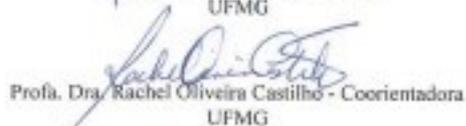
Aprovada em 29 de fevereiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:

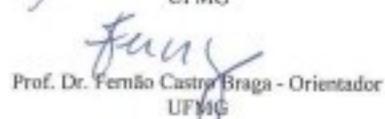

Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão
UFOP


Dra. Betânia Baeros Cota
Centro de Pesquisas René Rachou


Profa. Dra. Vanessa Pinho da Silva
UFMG


Prof. Dr. Márcio de Matos Coelho
UFMG


Profa. Dra. Rachel Oliveira Castilho - Coorientadora
UFMG


Prof. Dr. Fernão Castro Braga - Orientador
UFMG

Belo Horizonte, 29 de fevereiro de 2016.

Dedico este trabalho à minha família, Daniel, meu eterno companheiro, por tornar o caminho mais simples e os obstáculos mais fáceis de superar e por estar sempre ao meu lado, ao meu pai, minha grande aspiração, por acreditar em mim e me apoiar, aos meus irmãos, Angelita, Douglas e Rafaela, por todo o apoio e amor incondicional e a minha mãe, meu grande exemplo.

*“Toda a natureza é arte que ignoras.
Todo acaso, direção que não podes ver.
Toda discórdia, harmonia que não entendes.
Todo mal parcial, bem universal.”*

Alexandre Pope

AGRADECIMENTOS

Ao PPGCF, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional, e pelo contínuo investimento na minha formação.

Ao Professor Fernão Castro Braga, pelo direcionamento e apoio.

À Professora Rachel Oliveira Castilho, por todo o conhecimento ensinado, pela atenção, dedicação e paciência.

Ao professor Mauro Martins Teixeira, pela grande colaboração prestada ao trabalho.

Ao professor Flávio Almeida Amaral, pela colaboração e conhecimentos, pela infinita paciência e grande contribuição ao meu trabalho e à minha formação.

Ao professor Rodrigo Maia de Pádua, pela grande contribuição ao meu trabalho e à minha formação.

Aos professores Danielle da Glória de Souza, Ricardo José Alves e José Dias de Souza Filho, pela grande contribuição ao meu trabalho.

Às professoras Dênia Antunes Saúde Guimarães e Jacqueline de Souza por todos os conhecimentos compartilhados e direcionamento.

Aos professores Gustavo Henrique Bianco de Souza, pela confiança e apoio em vários momentos do meu percurso, e Tanus Jorge Nagem, por me acolher e me indicar o caminho acadêmico, pela confiança e apoio.

Ao professor Steyner França Cortes e à amiga Grazielle Caroline Silva, pela receptividade e compartilhamento de conhecimentos e de bons momentos.

Aos professores Vanessa Pinho da Silva, Rodrigo Maia de Pádua e Priscilla Rodrigues Valadares Campana, pelas contribuições prestadas ao trabalho na qualidade de membros da banca de qualificação.

A todos os meus professores, que tanto contribuíram para a minha formação pessoal e profissional, por me mostrarem caminhos e dividirem comigo suas experiências.

Às amigas Ana Letícia Malheiros Silveira, Ana Bárbara Dias Pereira e Raquel Geralda Isidório, pelo grande apoio prestado ao trabalho, pelos conhecimentos divididos e pela atenção.

Aos colegas dos Laboratórios de Imunofarmacologia e Biologia de Micro-organismos, Daiane Boff, Thiago Henrique Caldeira de Oliveira, Vívian Louise Cardoso e Ana Carolina Fialho Dias, pelos conhecimentos compartilhados e contribuições ao meu trabalho.

À professora Heloisa Ribeiro dos Santos e a todos os colegas da FASF, pela paciência, companheirismo e por fazermos parte de uma grande equipe, trabalhando sempre juntos, gerando grandes benefícios a todos.

Ao meu amado marido Daniel Mansur Rabelo, eterno companheiro, que me apoiou de todas as maneiras possíveis e imagináveis, pelo companheirismo, dedicação absoluta e confiança.

Ao meu pai, Jair Fernando Silva Henriques, meu exemplo, pelo apoio e dedicação, e por acreditar e investir em mim.

Aos meus irmãos, Angelita Maria da Silva, Rafaela Oliveira Henriques e Douglas Oliveira Henriques, pelo apoio, confiança, companheirismo e amor incondicional.

A minha mãe, Margarete de Oliveira, pelos conselhos, dedicação e confiança.

A minha família, por entender a minha ausência e me apoiar em todos os momentos da minha vida.

Aos grandes amigos Carlos Augusto Vieira Oliveira, Henrique Ferreira de Araújo Antunes e Camilla Maria Duarte Pinto, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em todos os momentos dos meus percursos.

Aos queridos amigos e companheiros de sociedade secreta, César Lúcio Faria Lopes Júnior, Miguel Ângelo Cançado Assis, Alessandra Duarte Rocha, Nadja Simbera Hemétrio, Danielle Cunha Campos, Cayo Dias e Paulo Damasceno, pelos maravilhosos momentos compartilhados, pelas conversas e por todo o apoio a mim e ao meu trabalho.

Aos queridos amigos da Fitoquímica, Ana Bárbara Dias Pereira, Juliana de Oliveira, Tatiane Freitas Borgati, Diego Pinto Oliveira, Raquel Geralda Isidório, Douglas Gontijo, José Hugo Souza Gomes e todos os demais, pelos conhecimentos compartilhados e apoio prestado durante a realização desse trabalho, além de momentos maravilhosos durante esses quatro anos.

Aos alunos de iniciação científica, Luciano Cecílio de Castro, Mirella Diniz, Izabela Zuppo e Olívia Correa, pelo grande apoio e colaboração a esse trabalho.

A todos os que, de alguma forma, possibilitaram a realização desse trabalho.

RESUMO

O TNF- α é uma das principais citocinas envolvidas no processo inflamatório. Essa citocina e as espécies radicalares de oxigênio desempenham um papel fundamental na etiologia de diversas doenças inflamatórias, como a colite ulcerativa e a artrite reumatoide. A colite ulcerativa é uma doença crônica, recidivante e idiopática do trato gastrointestinal, de natureza inflamatória. Já a artrite reumatoide é uma doença inflamatória crônica do espaço sinovial que acarreta danos à cavidade articular, erosão óssea e alterações na integridade da articulação. As duas doenças não possuem opções terapêuticas efetivas. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante e sobre a produção de TNF- α de extratos vegetais, frações e substâncias isoladas, visando identificar constituintes bioativos para o tratamento de doenças inflamatórias, principalmente a colite ulcerativa e a artrite reumatoide. Um total de 13 espécies vegetais foi selecionado para triagem com base em critérios etnofarmacológico e quimiosistemático. Os extratos etanólicos das espécies foram inicialmente avaliados *in vitro*, em modelo de inibição de produção TNF- α por células THP-1 estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS). A atividade antioxidante dos extratos foi ensaiada *in vitro* no modelo do DPPH. A partir dos resultados da triagem inicial, foram considerados ativos os extratos etanólicos de *Campomanesia lineatifolia*, *Stryphnodendron adstringens* e *Terminalia glabrescens*, que foram então submetidos a fracionamento por partição líquido-líquido entre solventes imiscíveis e avaliados quanto à sua atividade anti-inflamatória *in vivo* em modelo de inflamação induzida por LPS em cavidade articular. As frações aquosa e orgânica de *S. adstringens* (SAA e SAO), administradas por via oral nas doses 10, 100 e 1000 mg/kg, induziram significativa resposta anti-inflamatória, com diminuição na migração de leucócitos para o sítio inflamatório, de maneira dose-dependente. A fração enriquecida em polifenóis, SAO2, e a substância isolada 4'-*O*-metil-galocatequina, SAO1, também exibiram essa atividade nas doses 10, 50 e 100 mg/kg e 5, 10 e 20 mg/kg, respectivamente. As frações SAO e SAO2 também foram eficazes em inibir, nas mesmas doses, a migração de leucócitos, de maneira dose-dependente, em modelo de artrite induzida por antígeno (AIA); SAO1 demonstrou essa capacidade apenas na maior dose avaliada, 20 mg/kg. A fração SAO2 foi incapaz de atenuar os efeitos da colite ulcerativa, em camundongos estimulados por TNBS, na dose 50 mg/kg. A fração orgânica de *S. adstringens* (SAO) foi submetida a fracionamento por técnicas cromatográficas usuais, tendo sido identificada a presença de ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina e galato de epigalocatequina com substâncias de referência e isolada a 4'-*O*-metil-galocatequina, identificada por técnicas espectroscópicas usuais. A

análise de SAO por CLUE-EM permitiu a identificação do ácido gálico e 11 prodelfinidinas, sendo 4 descritas pela primeira vez para a espécie.

Palavras-chave: TNF- α ; colite ulcerativa; artrite reumatoide; polifenóis; *Stryphnodendron adstringens*

ABSTRACT

TNF- α is considered one of the main cytokine involved in the inflammatory process. This cytokine and radical oxygen species play an important role in the etiology of various inflammatory diseases such as ulcerative colitis and rheumatoid arthritis. Ulcerative colitis is a chronic, relapsing, idiopathic and inflammatory disease of gastrointestinal tract. Rheumatoid arthritis is a chronic inflammatory disease of the synovial space which results in damage to the articular cavity, bone erosion and changes in joint integrity. Both diseases have not had therapy therapeutic options effective. Thus, this study aimed to evaluate the antioxidant and TNF- α production inhibition activities of plant extracts, fractions and isolated substances, to identify bioactive constituents for the treatment of inflammatory diseases, especially ulcerative colitis and rheumatoid arthritis. A total of 13 plant species was selected for screening based on ethnopharmacological and chemosystematic criteria. Ethanol extracts of the species were initially assayed *in vitro*, for inhibiting TNF- α production by THP-1 cells stimulated by lipopolysaccharide (LPS). Antioxidant activity of the ethanol extracts was assayed, *in vitro*, in DPPH model. Based on results of the initial screening, ethanol extracts of *Campomanesia lineatifolia*, *Stryphnodendron adstringens* and *Terminalia glabrescens* were considered active, and were then subjected to fractionation by liquid-liquid partition between immiscible solvents and evaluated for their anti-inflammatory activity *in vivo* model of inflammation induced by LPS in the joint cavity. The aqueous and organic fractions of *S. adstringens* (SAA and SAO), administered orally at doses 10, 100 and 1000 mg/kg, induced a significant anti-inflammatory response, with a reduction dose-dependent in the migration of leukocytes to the inflammatory site. The fraction enriched in polyphenols, SAO2, and 4'-*O*-methyl-gallocatechin, SAO1, also exhibited this activity, respectively, at the doses 10, 50 and 100 mg/kg and 5, 10 and 20 mg/kg. The fractions SAO and SAO2 were also effective in inhibiting, in the same doses, leukocyte migration in a dose-dependent manner, in a model of antigen-induced arthritis (AIA); SAO1 showed this ability only in the higher dose evaluated, 20 mg/kg. SAO2 fraction failed to alleviate the effects of ulcerative colitis in mice stimulated by TNBS, at dose 50 mg/kg. The organic fraction *S. adstringens* was subjected to chromatographic fractionation by useful techniques. In the obtained fractions, it was identified the presence of gallic acid, gallocatechin, epigallocatechin and epigallocatechin gallate, and isolated the 4'-*O*-methyl-gallocatechin, identified by standard spectroscopic techniques. The analysis of SAO by UPLC-MS yield the identification of gallic acid and 11 prodelphinidins, that 4 were described for the first time in the species.

Keywords: TNF- α ; ulcerative colitis; reumathoide arthritis; polyphenols; *Stryphnodendron adstringens*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Atividade de extratos vegetais sobre a produção de TNF- α em células THP-1 estimuladas por LPS, avaliados nas concentrações 62,5, 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$	66
Figura 2 - Atividade de extratos vegetais de <i>C. lineatifolia</i> (folhas) sobre a produção de TNF- α em células THP-1 estimuladas por LPS, avaliados nas concentrações 62,5, 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$	74
Figura 3 - Atividade de extratos vegetais de <i>S. adstringens</i> sobre a produção de TNF- α em células THP-1 estimuladas por LPS, avaliados nas concentrações 62,5, 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$	76
Figura 4 - Atividade de extratos vegetais de <i>S. obovatum</i> sobre a produção de TNF- α em células THP-1 estimuladas por LPS, avaliados nas concentrações 62,5, 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$	78
Figura 5 - Atividade de extratos vegetais de <i>T. glabrescens</i> (folhas) sobre a produção de TNF- α em células THP-1 estimuladas por LPS, avaliados nas concentrações 62,5, 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$	80
Figura 6 – Espectro de varredura realizada no ensaio de seletividade para o método de sequestro de radicais livres do DPPH.....	82
Figura 7 – Curva analítica média obtida na avaliação da linearidade do método de sequestro de radicais livres do DPPH, em comprimento de onda 516 nm, para a rutina....	84
Figura 8 – Efeito induzido em animais tratados com veículo ou com a fração aquosa de <i>S. adstringens</i> (SAA) na migração de leucócitos totais.....	92
Figura 9 – Efeito induzido em animais tratados com veículo ou com a fração orgânica de <i>S. adstringens</i> (SAO) na migração de leucócitos totais.....	94
Figura 10 – Efeito induzido em animais tratados com veículo ou com a fração aquosa de <i>C. lineatifolia</i> (CLA) na migração de leucócitos totais.....	96
Figura 11 – Efeito induzido em animais tratados com veículo ou com a fração orgânica de <i>C. lineatifolia</i> (CLO) na migração de leucócitos totais.....	97
Figura 12 – Efeito induzido em animais tratados com veículo ou com a fração aquosa de <i>T. glabrescens</i> (TGA) na migração de leucócitos totais.....	99
Figura 13 – Efeito induzido em animais tratados com veículo ou com a fração orgânica de <i>T. glabrescens</i> (TGO) na migração de leucócitos totais.....	100
Figura 14 – Efeito induzido em animais tratados com veículo ou com a fração enriquecida em polifenóis de <i>S. adstringens</i> (SAO2) na migração de leucócitos totais.....	105
Figura 15 – Efeito induzido em animais tratados com veículo ou com 4'- <i>O</i> -metil-galocatequina isolada de <i>S. adstringens</i> (SAO1) na migração de leucócitos totais.....	106
Figura 16 – Efeito induzido em animais tratados com veículo ou com a fração orgânica (SAO) ou 4'- <i>O</i> -metil-galocatequina (SAO1) de <i>S. adstringens</i> na liberação de TNF- α no tecido periarticular.....	109
Figura 17 – Efeito induzido em animais tratados com veículo ou com a fração orgânica de <i>S. adstringens</i> (SAO), com a fração enriquecida em polifenóis de <i>S. adstringens</i> (SAO2) e com a 4'- <i>O</i> -metil-galocatequina (SAO1) isolada das cascas de <i>S. adstringens</i> , na migração de leucócitos totais.....	111
Figura 18 – Efeito induzido em animais tratados com veículo ou com a fração enriquecida em polifenóis (SAO2) de <i>S. adstringens</i> em camundongos com colite ulcerativa induzida por injeção intracolônica de TNBS.....	116
Figura 19 - Perfis cromatográficos obtidos por CCD de sílica gel para extratos e frações das espécies selecionadas para estudo.....	122
Figura 20 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para o extrato etanólico (a)	

e as frações orgânica (b) e aquosa (c) de <i>Campomanesia lineatifolia</i>	124
Figura 21 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para o extrato etanólico (a) e as frações orgânica (b) e aquosa (c) de <i>Stryphnodendron adstringens</i>	126
Figura 22 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para o extrato etanólico (a) e as frações orgânica (b) e aquosa (c) de <i>Terminalia glabrescens</i>	128
Figura 23 – Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD para a fração orgânica de <i>S. adstringens</i> (SAO), registrado no comprimento de onda de 220 nm.....	129
Figura 24 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD para a fração aquosa de <i>S. adstringens</i> (SAA), registrado no comprimento de onda de 220 nm.....	131
Figura 25 - Cromatogramas da fração orgânica de <i>S. adstringens</i> (SAO), registrados em comprimento de onda 220 nm (a) e por UPLC-MS-ESI no modo de detecção negativo (ESI).....	133
Figura 26 - Cromatogramas da fração orgânica de <i>S. adstringens</i> (SAO), registrados em comprimento de onda 220 nm (a) e por UPLC-MS-ESI no modo de detecção negativo (ESI).....	135
Figura 27 – Proposta de fragmentação de prodelfinidinas por fissão de Retro-Diels-Alder.....	137
Figura 28 –Espectro de ESI-MS/MS obtido no modo negativo de ionização, indicando os íons pais do fragmento em m/z 137 Da.....	138
Figura 29 – Fragmentos obtidos por UPLC-MS-ESI para a substância correspondente ao pico com TR de 16,50 min, identificada como 4'- <i>O</i> -metil-galocatequina (8).....	139
Figura 30 – Espectro de massas da substância 8 (4'- <i>O</i> -metil-galocatequina, TR= 16,50 min).....	140
Figura 31 – Fragmentos obtidos por UPLC-MS-ESI para a substância correspondente ao pico eluído em 28,22 min, identificada como galato de 4'- <i>O</i> -metil-galocatequina (12).....	141
Figura 32 – Espectro de massas da substância 12 (galato de 4'- <i>O</i> -metil-galocatequina, TR= 28,22)	143
Figura 33 – Dímeros de prodelfinidinas cujos monômeros apresentam estereoquímica da ligação α (a) ou β (b).....	144
Figura 34 – Dímeros de prodelfinidinas cujos monômeros estão ligados entre os carbonos 4 da unidade superior e 8 da unidade inferior (a) ou entre os carbonos 4 da unidade superior e 6 da unidade inferior (b).....	145
Figura 35 – Fragmentos obtidos por UPLC-MS-ESI para a substância correspondente ao pico eluído em 8,70 min, identificada como um dímero composto por duas unidades de (epi)galocatequina (2).....	146
Figura 36 – Espectro de massas da substância 2 (dímero composto por duas unidades de (epi)galocatequina, TR= 8,70 min).....	147
Figura 37 – Fragmentos obtidos por UPLC-MS-ESI para a substância correspondente ao pico eluído em 15,54 min, identificada como um dímero composto por uma unidade de galato (epi)galocatequina e uma unidade de (epi)galocatequina (7).....	148
Figura 38 – Prováveis estruturas para a substância 7, um dímero composto por uma unidade superior (epi)galocatequina e uma unidade inferior galato de (epi)galocatequina, que podem estar ligados em α ou em β	149
Figura 39 – Espectro de massas da substância 7 (dímero composto por uma unidade de (epi)galocatequina e uma unidade de galato de metil-(epi)galocatequina, TR= 15,54 min).....	150
Figura 40 – Fragmentos obtidos por UPLC-MS-ESI para as substâncias correspondentes aos picos eluídos em 12,17 min e em 20,57, identificada como dímeros compostos por duas unidades de galato (epi)galocatequina (4 e 9).....	151

Figura 41 – Espectro de massas da substância 4 (dímero composto por duas unidades de galato de (epi)galocatequina, TR= 12,17 min).....	152
Figura 42 – Espectro de massas da substância 9 (dímero composto por duas unidades de galato de (epi)galocatequina, TR= 2,57 min).....	153
Figura 43 – Fragmentos obtidos por UPLC-MS-ESI para a substância correspondente ao pico eluído em 12,84 min, identificada como um dímero composto por uma unidade de galato (epi)galocatequina e uma unidade de galato de metil-(epi)galocatequina (5).....	154
Figura 44 – Espectro de massas da substância 5 (dímero composto por uma unidade de galato de (epi)galocatequina e uma unidade de galato de metil-(epi)galocatequina, TR= 12,84 min).....	155
Figura 45 – Fragmentos obtidos por UPLC-MS-ESI para a substância correspondente ao pico eluído em 23,25 min, identificada como um dímero composto por uma unidade de (epi)galocatequina e uma unidade de metil-(epi)galocatequina (11).....	156
Figura 46 – Espectro de massas da substância 11 (dímero composto por uma unidade (epi)galocatequina e uma unidade de metil-(epi)galocatequina, TR= 23,25 min).....	157
Figura 47 – Estrutura de uma prodelfinidina (a) e de uma prorobinetinidina (b).....	158
Figura 48 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para os grupos de frações reunidas, resultantes do fracionamento da fração orgânica de <i>S. adstringens</i> (SAO) em coluna de sílica-gel.....	161
Figura 49 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para os grupos de frações resultantes do fracionamento da fração SAO2 em coluna de sílica gel.....	163
Figura 50 – Representação esquemática dos resultados obtidos no trabalho. A espécie vegetal <i>S. adstringens</i> apresentou atividade anti-inflamatória, atribuída à presença de polifenóis, confirmada em modelo de artrite reumatóide, mas não no modelo de colite ulcerativa.....	170

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Produtos naturais já relatados na literatura com capacidade de inibição da produção de TNF- α	24
Tabela 1 - Dados de coleta e identificação das espécies selecionadas para estudo.....	44
Tabela 2 - Extratos obtidos das espécies vegetais selecionadas para estudo e rendimentos em extrativos.	45
Tabela 3 - Fracionamento dos extratos etanólicos por extração entre solventes imiscíveis, usando o sistema água / acetato de etila / isopropanol / <i>n</i> -butanol (54:42:12:6).....	46
Tabela 4 – Fracionamento da fração orgânica do extrato etanólico de <i>S. adstringens</i> (SAO) em coluna de sílica-gel.....	59
Tabela 5 – Refracionamento da subfração SAO2 em coluna de sílica gel.....	59
Tabela 6 – Inibição da produção de TNF- α (% \pm d.p., $n = 3$) induzida por extratos etanólicos de plantas brasileiras.....	64
Tabela 7 – Inibição da produção de TNF- α (% \pm d.p., $n = 3$) induzida por extratos etanólicos de plantas brasileiras nas concentrações 250, 125 e 62,5 μ g/mL.....	65
Tabela 8 – Dados da regressão linear para as curvas analíticas da rutina, em três dias consecutivos de análise do método de sequestro de radicais livres do DPPH.....	83
Tabela 9 - Resultados da avaliação da exatidão do método de sequestro de radicais livres do DPPH.....	84
Tabela 10 - Resultados da avaliação da precisão do método de sequestro de radicais livres do DPPH.	85
Tabela 11: Resultados da avaliação da robustez do método de sequestro de radicais livres do DPPH.	86
Tabela 12 – Atividade antioxidante das espécies vegetais determinada no ensaio de sequestro de radicais livres utilizando o DPPH.	87
Tabela 13 – Tempos de retenção (TR min) e máximos de absorção (λ nm) no UV registrados para substâncias de referência em análises por CLAE-DAD.....	130
Tabela 14 - Atribuições dos picos e dados de fragmentações obtidos pelas análises de SAO por UPLC-MS-ESI.....	134
Tabela 15 – Atribuições das bandas observadas no espectro no IV obtido para SAO2b....	165
Tabela 16 – Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H obtidos para SAO2b e dados previamente publicados para a substância 4'- <i>O</i> -metil-galocatequina (GARCIA et al., 1993).....	166
Tabela 17 – Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C obtidos para SAO2b e dados previamente publicados para a substância 4'- <i>O</i> -metil-galocatequina (GARCIA et al., 1993).....	167

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1 Inflamação.....	20
3.2 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)	21
3.3 Colite ulcerativa.....	27
3.4 Espécies vegetais e produtos naturais com atividade contra a colite ulcerativa.....	29
3.5 Artrite reumatoide.....	32
3.6 Espécies vegetais e produtos naturais com atividade contra a artrite reumatoide.....	34
3.7 Participação de radicais livres em processos inflamatórios.....	34
3.8 Espécies vegetais selecionadas.....	36
3.9 <i>Stryphnodendron adstringens</i>	37
4 Experimental.....	40
4.1 Equipamentos.....	40
4.2 Material.....	41
4.3 Coleta das espécies vegetais.....	42
4.4 Preparo dos extratos.....	43
4.5 Fracionamento dos extratos por partição entre solventes imiscíveis.....	46
4.6 Obtenção dos perfis cromatográficos exploratórios dos extratos por CCD, CLAE-DAD e UPLC-MS.....	46
4.6.1 Análises das frações por CCD.....	46
4.6.2 Análises dos extratos e frações por CLAE-DAD.....	47
4.6.3 Análise por CLAE-DAD em condições otimizadas para <i>S. adstringens</i>	47
4.6.4 Análise por UPLC-MS em condições otimizadas para <i>S. adstringens</i>	47
4.6.5 Análise de MS/MS por UPLC-MS.....	48
4.7 Avaliação da atividade sequestradora de radicais livres (DPPH).....	48
4.7.1 Adaptação do método para microescala	48
4.7.2 Validação do método.....	49
4.8 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade dos extratos sobre a produção de TNF- α	50
4.8.1 Protocolo experimental.....	51
4.8.2 Quantificação de TNF- α por ELISA.....	51
4.8.3 Avaliação da viabilidade celular.....	52
4.8.4 Análise estatística.....	52
4.9 Avaliação da atividade anti-inflamatória em modelos animais.....	52
4.9.1 Inflamação aguda induzida por LPS.....	52
4.9.2 Modelo de artrite induzida por antígeno – AIA.....	53
4.9.3 Contagem total e diferencial de leucócitos.....	53
4.9.4 Processamento do tecido do joelho.....	54
4.9.5 Determinação de TNF- α e CXCL-1 por ELISA.....	54
4.9.6 Avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO).....	54
4.9.7 Análises estatísticas.....	55
4.10 Investigação da liberação de TNF- α <i>in vivo</i>	55
4.11 Avaliação da atividade anti-inflamatória em modelo <i>in vivo</i> de colite ulcerativa....	56
4.11.1 Avaliação do escore clínico.....	57
4.11.2 Avaliação do cólon.....	57
4.11.3 Avaliação da atividade de peroxidase eosinofílica (EPO).....	58

4.12 Estudo fitoquímico de <i>Stryphnodendron adstringens</i>	58
4.13 Elucidação estrutural de SAO2b.....	60
4.13.1 Caracterização por IV.....	60
4.13.2 Caracterização por UPLC-MS.....	60
4.13.3 Caracterização por RMN.....	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
I Avaliação da atividade anti-inflamatória e antioxidante <i>in vitro</i>	62
I.1 Avaliação da atividade anti-TNF- α <i>in vitro</i>	63
I.1.1 Extratos que inibiram a produção de TNF- α	64
I.1.2 Extratos que não inibiram a produção de TNF- α	72
I.1.3 Atividade anti-TNF- α de extratos de polaridades variadas das plantas ativas.....	73
I.2 Ensaio do DPPH.....	81
I.2.1 Seletividade.....	82
I.2.2 Linearidade.....	83
I.2.3 Exatidão.....	84
I.2.4 Limite de detecção e limite de quantificação.....	85
I.2.5 Precisão.....	85
I.2.6 Robustez.....	86
I.2.7 Avaliação do potencial sequestrante de radicais livres dos extratos.....	86
II Avaliação da atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i>	90
II.1 Inflamação aguda induzida pela injeção intra-articular de LPS.....	91
II.2 Atividade anti-inflamatória em modelo de Artrite Induzida por Antígeno – AIA.....	110
II.3 Modelo de colite ulcerativa induzida por injeção intracolônica de TNBS.....	114
III Fitoquímica das espécies vegetais selecionadas.....	120
III.1 Caracterização cromatográfica dos extratos e frações.....	121
III.1.1 Análises por CCD de sílica gel.....	121
III.1.2 Análises por CLAE-DAD.....	122
III.1.2.1 <i>Campomanesia lineatifolia</i>	123
III.1.2.2 <i>Stryphnodendron adstringens</i>	125
III.1.2.3 <i>Terminalia glabrescens</i>	127
III.2 Estudo fitoquímico de <i>S. adstringens</i>	129
III.2.1 Análise de <i>S. adstringens</i> por CLAE-DAD em condições otimizadas.....	129
III.2.2 Caracterização fitoquímica da fração orgânica de <i>S. adstringens</i> (SAO) por UPLC-MS-ESI.....	131
III.2.2.1 Ácido gálico.....	136
III.2.2.2 Prodelfinidinas.....	136
III.2.2.2.1 Monômeros de prodelfinidinas identificados por comparação com substâncias de referência.....	138
III.2.2.2.2 Outros monômeros de prodelfinidinas.....	139
III.2.2.2.3 Dímeros de prodelfinidinas.....	144
III.3 Fracionamento cromatográfico da fração orgânica de <i>S. adstringens</i> (SAO).....	158
III.3.1 Estudos fitoquímicos de SAO1.....	162
III.3.2 Identificação estrutural de SAO2b.....	164
6 RESUMO DOS RESULTADOS.....	169
7 CONCLUSÃO.....	171
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	173

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é detentor da maior biodiversidade vegetal do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem valor econômico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos fármacos que reside uma de suas mais importantes potencialidades (BARREIRO & BOLZANI, 2009). Grande parte desse patrimônio natural permanece desconhecida. Assim, fica evidente a necessidade de explorar a grande diversidade de produtos naturais brasileiros, estudando química e biologicamente suas espécies, buscando continuamente identificar novas substâncias bioativas.

Plantas, fungos e organismos marinhos são importantes fontes de substâncias bioativas. Apesar das diversas estratégias disponíveis para o desenvolvimento de fármacos na atualidade, os produtos naturais representam uma das estratégias de maior sucesso na inovação farmacêutica, com diversos fármacos introduzidos na terapêutica nos últimos anos (BARREIRO & BOLZANI, 2009; NEWMAN & CRAGG, 2013).

Em 2012, Newman e Cragg estimaram que, das 1.355 novas substâncias químicas introduzidas no mercado no período entre 1981 e 2010, mais de 50% eram produtos naturais, seus derivados ou produtos sintéticos baseados em farmacóforos de produtos naturais. Essas evidências ratificam a importância de produtos naturais para o desenvolvimento de novos fármacos ao longo dos últimos anos.

Doenças infecciosas, câncer, hipertensão e processos inflamatórios foram as patologias que despertaram maior interesse da indústria farmacêutica nos últimos anos, sendo que, para cada uma dessas doenças foram aprovados, respectivamente, 228, 128, 79 e 51 novos fármacos, no período de 1981 a 2010 (NEWMAN & CRAGG, 2012).

Dentre as doenças de natureza inflamatória, a colite ulcerativa e a artrite reumatoide, objetos do presente trabalho, merecem destaque, por serem enfermidades inflamatórias crônicas de grande importância devido aos sintomas, complicações e limitações no tratamento.

A colite ulcerativa, condição inflamatória intestinal, é uma doença crônica de etiologia ainda não bem definida. Apresenta sintomas extremamente desconfortáveis para o paciente, dentre eles fortes dores abdominais e diarreia, alterando sua qualidade de vida. Seu tratamento é contínuo e sintomático, sendo assim pouco efetivo.

A artrite reumatoide, doença inflamatória crônica que acomete o espaço sinovial das articulações, é uma enfermidade altamente dolorosa e incapacitante que gera dificuldades para os pacientes se movimentarem, com consequente redução na qualidade de vida. Embora

inúmeros anti-inflamatórios possam ser usados no seu tratamento, sua efetividade é questionável, uma vez que é basicamente sintomático e a adesão, principalmente se o tratamento não for por via oral, é baixa, devido à constância do uso e efeitos colaterais.

A literatura científica registra diversos extratos vegetais e produtos naturais com atividades anti-inflamatória e antioxidante relatadas em modelos de ensaios *in vitro* e *in vivo*, além de usos tradicionais para o tratamento de doenças relacionadas. Neste contexto, propõe-se, no presente trabalho, investigar a relação entre as atividades anti-inflamatória e antioxidante de extratos, frações e produtos naturais isolados, oriundos de espécies selecionadas por critérios etnofarmacológico e quimiosistemático, com vistas à identificação de substâncias bioativas com potencial para o desenvolvimento de fármacos e/ou fitoterápicos para o tratamento de doenças inflamatórias, em especial colite ulcerativa e artrite reumatoide.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória e antioxidante de extratos vegetais, frações e substâncias isoladas, visando identificar constituintes bioativos com potencial para o tratamento da colite ulcerativa e artrite reumatoide.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a potencial atividade de extratos de espécies vegetais em modelo de produção de TNF- α em cultura de células THP-1 estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS). As seguintes espécies foram selecionadas, a partir de critério etnofarmacológico e/ou quimiossistemático: *Bowdichia virgilioides*, *Campomanesia lineatifolia*, *Cordia guazumaefolia*, *Hymenaea coubaril*, *Hymenaea stigonocarpa*, *Licania tomentosa*, *Mikania glomerata*, *Paepalanthus bromelioides*, *Stryphnodendron adstringens*, *Stryphnodendron obovatum*, *Terminalia glabrescens*, *Vernonia phosphorea* e *Vitex polygama*;
2. Avaliar, *in vitro*, a atividade antioxidante dos extratos supracitados, utilizando o modelo do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH);
3. Avaliar a atividade anti-inflamatória dos três extratos mais ativos nos ensaios descritos em “1” e “2” no acúmulo de leucócitos e na liberação de TNF- α e CXCL-1 no tecido periarticular em modelo de inflamação induzida por LPS na cavidade intra-articular de camundongos;
4. Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato mais ativo no ensaio descrito em “3” em modelos animais de colite ulcerativa e artrite reumatoide;
5. Selecionar o extrato mais ativo em “4” para fracionamento e caracterização fitoquímica;
6. Elucidar a estrutura química das substâncias isoladas a partir de dados espectroscópicos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Inflamação

A inflamação é uma resposta protetora que visa livrar o organismo de uma causa inicial de lesão celular, tais como micro-organismos invasores e dano tissular. É um evento organizado, cronologicamente e espacialmente, em que células e mediadores químicos agem para eliminar o estímulo causador do dano, culminando na restauração da homeostase. Embora seja um processo fisiológico e benéfico, pode ser potencialmente lesivo, uma vez que é inespecífico e pode promover injúrias em tecidos, com consequente desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas, como doença inflamatória intestinal, artrite reumatoide e psoríase, entre outras doenças (MEDZHITOV, 2010; MANDHANE et al., 2011; CHUNG, 2012).

A inflamação ocorre em duas fases: a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda, geralmente com início súbito, torna-se aparente durante minutos ou horas, com sintomas clássicos de calor, dor, vermelhidão e inchaço. Já a fase crônica se desenvolve durante um longo período de tempo e pode persistir por dias, semanas ou meses (LINGEN, 2001; ALESSANDRI et al., 2013).

A cascata inflamatória é iniciada com uma resposta vascular, onde ocorre aumento da permeabilidade da parede dos vasos, resultando em aumento do fluxo sanguíneo e exsudação de proteínas e fluidos do plasma para o tecido lesado, produzindo hiperemia. Numa segunda etapa, ocorre a migração de leucócitos do sangue para o tecido (COTRAN et al., 1999; LAWRENCE et al., 2002; ALESSANDRI et al., 2013).

Para que ocorram os eventos descritos acima, na fase aguda da inflamação, é necessária também a ativação de células do endotélio vascular, levando à vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade às proteínas plasmáticas. A ativação endotelial inicial, com expressão de substâncias de adesão como E-selectina, substância de adesão intercelular (ICAM-1) e substância de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), pode ser iniciada pela liberação do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), e é provável que a ativação do endotélio seja amplificada por fatores liberados por leucócitos para dentro dos tecidos (MENG et al., 1995; ALESSANDRI et al., 2013).

Durante a inflamação, mediadores químicos e inflamatórios, como a adenosina, prostaglandinas (PG) E1, E2 e F2 α , leucotrieno B4, 8R, 15S-diidroxi-eicosa-5E-9,11,13- ácido tetraenoico (8R,15S-diHETE), histamina, bradicinina, serotonina e prostaciclina são liberados no interior do tecido afetado, onde sensibilizam os nervos, resultando em aumento do

estímulo inflamatório (KONTTINEN et al., 1994; PERROT e GUILBAUD, 1996; KIDD e URBAN, 2001; ALESSANDRI et al., 2013).

A resposta celular à inflamação é iniciada com os neutrófilos, primeiros efetores recrutados na resposta inflamatória aguda. As próximas células que migram para o local da injúria são os monócitos (que nos tecidos se diferenciam em macrófagos) guiados por fatores quimiotáticos. Essas células são de grande importância porque, além de possuírem atividade fagocítica, macrófagos ativados são a principal fonte de fatores de crescimento e citocinas, que afetam profundamente as células endoteliais, epiteliais e mesenquimais no microambiente local. Mastócitos também são importantes na inflamação aguda devido à liberação de mediadores inflamatórios como histamina, citocinas, proteases complexadas com proteoglicanos sulfatados e mediadores lipídicos (DELVES & ROITT, 2000; BARSANTE et al., 2008; ALESSANDRI et al., 2013).

A apoptose dos granulócitos, seguida de seu reconhecimento e remoção por macrófagos, limita o dano tissular causado pelos leucócitos no local inflamado. Idealmente, a resposta inflamatória inicial para proteção do hospedeiro é autolimitada e progride para a completa resolução. Contudo, se houver falha na regulação, a inflamação aguda pode progredir para um quadro crônico, podendo culminar com a formação de cicatrizes e fibrose (HALLETT et al., 2008; ALESSANDRI et al., 2013).

3.2 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

O TNF- α é considerado uma das principais citocinas inflamatórias, por isso muitas pesquisas vêm sendo realizadas a fim de explorar o potencial desse mediador no tratamento de doenças inflamatórias. Entretanto, o número de fármacos desenvolvidos e aprovados para o tratamento de doenças inflamatórias mediadas por essa citocina ainda é pequeno, estando restrito a fármacos de base proteica, com custo elevado, o que restringe o amplo uso clínico, além dos efeitos adversos a eles relacionados (PAUL et al., 2006; SFIKAKIS, 2010; LAWRENCE, 2014).

O TNF- α é uma proteína homotrimérica codificada dentro do complexo de histocompatibilidade principal (MHC). Inicialmente foi identificada como uma proteína solúvel de 17 kDa, mas pesquisas posteriores demonstraram que também pode existir como uma proteína transmembrana com massa molecular de 26 kDa, em sua forma não clivada (PEREZ et al., 1990; SETHI et al., 2008).

A família de citocinas TNF em humanos inclui 19 ligantes, para os quais existem 35 receptores. TNF- α é expresso principalmente por células endoteliais e do sistema imune como

uma proteína de membrana que pode ser clivada fora da membrana por metaloproteinases. Essa citocina atua através de dois receptores, TNFR1 e TNFR2. O receptor TNFR1 é amplamente expresso e promove a resposta inflamatória. Já o receptor TNFR2 é expresso predominantemente por linfócitos e estimula sua ativação e proliferação através de vias de sinalização que envolvem o fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B), a proteína ativadora 1, e proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPKs). A ativação do domínio de morte do receptor TNFR1 também inicia a sinalização apoptótica, através da ativação de vários fatores do tipo caspase e NF- κ B, resultando na transcrição de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e substâncias antiapoptóticas. O TNF- α também inibe o desenvolvimento e a função de células T reguladoras (VALENCIA et al., 2006; FAUSTMAN & DAVIS, 2010; BITON et al., 2012; CROFT et al., 2013).

A transdução de sinal do TNF- α envolve várias vias e moléculas de sinalização. Sua ligação ao receptor TNFR1 inicia uma cascata de eventos envolvendo a ativação de uma série de proteínas quinase ativadas por mitógenos (MEKKs), que fosforilam e ativam uma proteína quinase ativadora (MEK) específica. Esta, por sua vez, ativa uma proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), por exemplo, a MAPK p38. A p38 ativada então fosforila o fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B). A ligação do TNF- α ao receptor TNF-R1 também ativa o inibidor do fator nuclear- κ B (I κ B), a quinase (IKK), associados à proteína contendo domínio DD (TRADD). A IKK ativada fosforila o I κ Ba no complexo NF- κ B - I κ Ba. Este processo libera NF- κ B ativado do complexo, que então se transloca para o núcleo e se liga de maneira específica a sequências dos genes alvo, tais como citocinas, quimiocinas e proteases (PAUL et al., 2006).

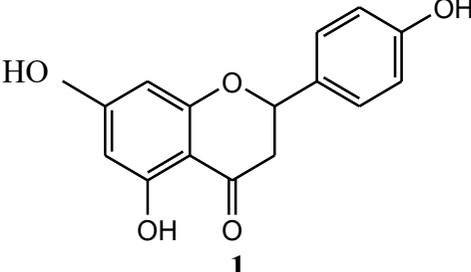
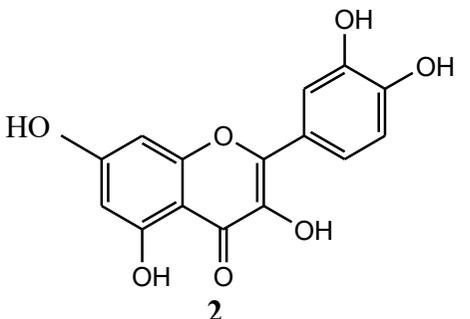
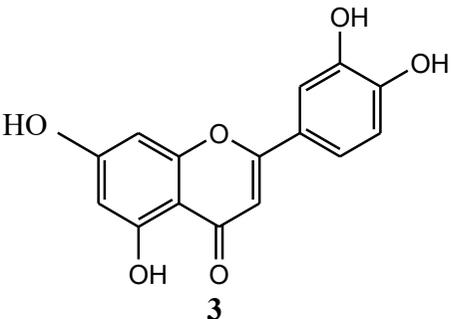
A via de sinalização e os vários mecanismos associados à regulação da expressão de TNF- α envolve várias vias e moléculas sinalizadoras. A ligação do TNF- α ao seu receptor TNFR1 provoca uma sequência de eventos que termina na ativação do NF- κ B. A inibição da ativação desse fator impede a síntese por indução de seus genes, que incluem muitas citocinas pró-inflamatórias, bem como de outras proteínas importantes relacionadas com o processo inflamatório, interferindo, assim, na manutenção da inflamação. Além disso, a inibição de NF- κ B também pode promover a morte celular em certos tipos de células sensíveis, incluindo algumas linhagens tumorais, o que sugere o potencial uso de inibidores de NF- κ B para o tratamento do câncer (PALLADINO et al., 2003).

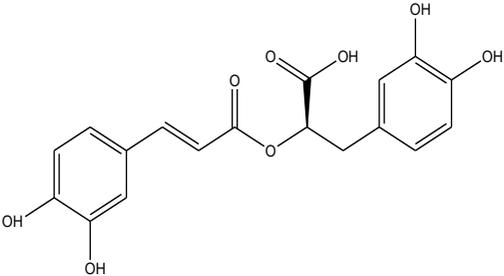
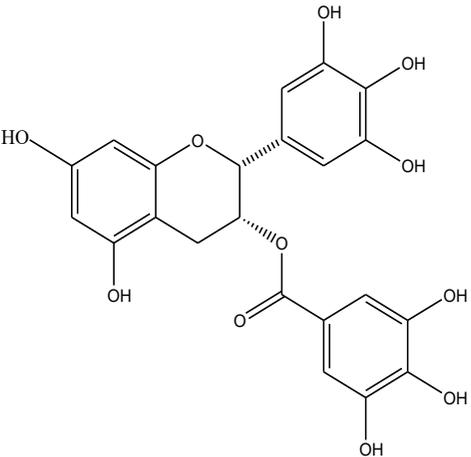
A ativação do NF- κ B em doenças como diabetes, artrite reumatoide, isquemia seguida de reperfusão, síndrome de estresse respiratório agudo, choque endotóxico, formação de tumores e resposta inflamatória sistêmica é atribuída ao TNF- α e a substâncias relacionadas à

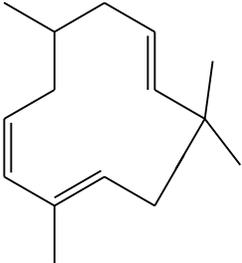
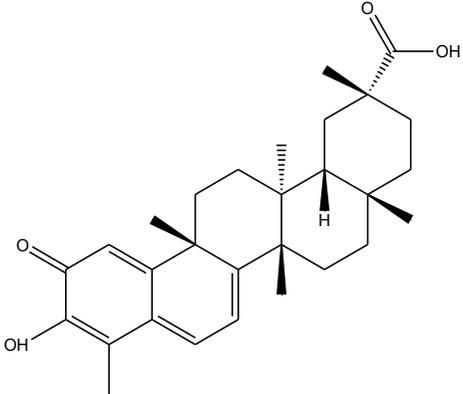
ativação desta citocina. O TNF- α induz, através da ativação do NF- κ B, a expressão de genes, como ativador plasminogênico de uroquinase, ciclooxigenase II (COX II) e fator vascular de crescimento endotelial (VEGF), que podem estar envolvidos na invasão de tecidos e formação de metástases. Além disso, a ativação do NF- κ B pode provocar a supressão da apoptose, facilitando a tumorigênese (PAUL et al., 2006; SETHI et al., 2008).

Produtos naturais de diferentes classes foram descritos na literatura como capazes de reduzir os níveis de TNF- α . Algumas dessas substâncias estão relacionadas no Quadro 1. Habtemariam (2000), em revisão de produtos naturais que afetam a produção, secreção ou liberação de TNF- α , cita a atividade de compostos fenólicos avaliados em modelos de produção de TNF- α por monócitos, como a curcumina, com CI_{50} entre 0,5 a 10 μ M; o resveratrol, com atividade nas concentrações de 50 e 100 μ M e diversos flavonoides de *Citrus*, com CI_{50} variando entre 5,0 e 30 μ M, por exemplo, a nobiletina (10 μ M) e a tangeretina (30 μ M). Outro trabalho desenvolvido por Verma e colaboradores (2012) descreve produtos naturais de diferentes classes, capazes de interferir na sinalização pró-inflamatória, com consequente diminuição na produção de citocinas, como os terpenos ácido acantoico (inibidor da liberação de TNF- α , IL-1 β e IL-6 e da via de sinalização do NF- κ B), artemisolídeo (inibidor da ativação de NF- κ B por meio da inibição de IKK β , resultando na redução da expressão de TNF- α em macrófagos estimulados por LPS), e helenalina (inibidor de genes pró-inflamatórios, sendo reconhecido inibidor de NF- κ B); a chalcona cardamonina (inibidor da liberação de TNF- α por células RAW 264.7); a cumarina libanoridina (inibidor da expressão de mediadores pró-inflamatórios, como iNOS, COX-2, TNF- α e IL-1 β); e o alcaloide buchananina (inibidor da liberação de TNF- α por células THP-1 estimuladas por LPS).

Quadro 1 – Produtos naturais já relatados na literatura com capacidade de inibição da produção de TNF- α .

Classe química	Substância (s)	Estrutura	Modelo	Resultados	Referência
Flavonoides	Naringenina (1), antocianidina, pelargonidina e cianidina		Macrófagos de camundongo estimulados por LPS	Atividade inibitória moderada na inibição do TNF- α	HERATH et al., 2003
	Quercetina (2)		Células endoteliais de cordão umbilical estimuladas com leptina	Redução significativa na produção de TNF- α nas células tratadas com quercetina (125 μ g/mL).	INDRA et al., 2013
	Luteolina (3), quercetina (2), luteolina-7-glicosídeo, genisteína, eriodictiol e hesperidina		Macrófagos estimulados por LPS	Luteolina: CI ₅₀ < 1 μ M Quercetina: CI ₅₀ 11 μ M Luteolina-7-glicosídeo: CI ₅₀ 50 μ M Genisteína: CI ₅₀ 5 μ M Eriodictiol: CI ₅₀ 50 μ M Hesperidina: CI ₅₀ 50 μ M	XANGORAI et al., 2001

Classe química	Substância (s)	Estrutura	Modelo	Resultados	Referência
Polifenóis	Ácido rosmarínico (4)	 <p style="text-align: center;">4</p>	Dano hepático induzido por LPS em camundongos D-GaIN sensibilizados	Reduziu os níveis plasmáticos de TNF- α .	OSAKABE et al., 2002
	Galato de (-)-epigalocatequina (5), geraniina e corilagina	 <p style="text-align: center;">5</p>	Células BALB/3T3 estimuladas com ácido ocaídoico	Reduziram a concentração de TNF- α (CI ₅₀ = 261 μ M, 43 μ M e 76 μ M).	OKABE et al., 2001

Classe química	Substância (s)	Estrutura	Modelo	Resultados	Referência
Sesquiterpeno	α -humuleno (6) e <i>trans</i> -cariofileno	 6	LPS em pata de ratos	Redução da migração de neutrófilos e da ativação do NF- κ B induzida por LPS	FERNANDES et al., 2007
Triterpeno	Celastrol (7)	 7	Monócitos e macrófagos humanos	Redução da produção de TNF- α e IL-1 β em monócitos e macrófagos humanos	ALLISON et al., 2001

3.3 Colite ulcerativa

A doença inflamatória intestinal é uma doença crônica, recidivante e idiopática do trato gastrointestinal, com etiologia multifatorial, cujas principais formas são a colite ulcerativa e a doença de Crohn. Essa doença ainda não possui um tratamento efetivo (SEPULVEDA et al., 2008; WILLIAMS et al., 2011; WU et al., 2011; VILELA et al., 2012).

A colite ulcerativa é definida como uma inflamação difusa no cólon, com comprometimento do reto, podendo estender de forma contínua e difusa além do cólon proximal; o processo inflamatório geralmente está localizado na mucosa e submucosa do cólon. Já a doença de Crohn pode afetar uma ou várias partes do tubo digestivo, principalmente no íleo terminal, cólon e região perianal. Em ambas, estão presentes manifestações digestivas, como anorexia, febre, perda de peso, dor abdominal recorrente, enterorragia, anemia, diarreias e lesões ou fístulas perianais, e manifestações extra-digestivas, como artrite, sinais mucocutâneos, e sintomas hepato-biliares, nefrológicos e oculares (ORTIGOSA, 2005; VILELA et al., 2012).

A lesão histopatológica característica da colite ulcerativa é a presença de abscessos nas criptas e perda da sua arquitetura, com um infiltrado inflamatório de neutrófilos, células plasmáticas e eosinófilos no tecido (ORTIGOSA, 2005; VILELA et al., 2012).

Estão descritos na literatura vários estudos relacionando o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias na mucosa intestinal afetada pela colite ulcerativa (BRYNSKOV et al., 1992; PULLMAN et al., 1992; HYAMS et al., 1993; TARGAN, 2000; MARSZALEK et al., 2011; WU et al., 2011; ALTWEGG & VINCENT, 2014). Essas citocinas, com destaque para o TNF- α , são produzidas principalmente pelas células imunes ativadas na mucosa inflamada do intestino durante o processo da doença, e ativam novas células imunes, processo esse que culmina na liberação de uma série de substâncias que agravam o processo inflamatório, como radicais livres, quimiocinas, proteinases e citocinas, aumentando o dano tissular (KAMADA et al., 2005; GUO et al., 2013).

A etiologia da colite ulcerativa ainda não é totalmente conhecida; entretanto, já é sabido que alguns fatores aumentam a predisposição ao desenvolvimento da doença, como histórico familiar, fatores ambientais, antígenos derivados tanto da microbiota intestinal quanto da dieta, exposição a microrganismos intestinais patogênicos, além do emprego de xenobióticos como tabaco e anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) (SHANAHAN, 2002; MARTINEZ-MONTIEL et al., 2014). Segundo Triantafillidis e colaboradores (2011), há um consenso geral de que as doenças inflamatórias intestinais resultem da combinação de

influências ambientais, variações genéticas, alterações na microbiota intestinal e distúrbios na resposta imune.

A inflamação característica da doença resulta da ativação inapropriada do sistema imunológico da mucosa intestinal por antígenos da luz intestinal em indivíduos geneticamente suscetíveis. O recrutamento de leucócitos para a mucosa intestinal, mediado pelo reconhecimento de substâncias de adesão específicas, ou integrinas, é um evento importante para a indução e manutenção da inflamação intestinal (LAWRANCE, 2012).

A abordagem terapêutica atual visa melhorar a qualidade de vida do paciente, induzindo e mantendo a remissão, prevenindo e tratando as complicações clínicas, corrigindo as deficiências nutricionais e prestando apoio psicossocial. O tratamento farmacoterapêutico inclui agentes anti-inflamatórios (mesalazina e corticoides), imunossupressores (azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexato, ciclosporina e tacrolimus), agentes biológicos (infliximab, adalimumab e certozumab pegol), antibióticos (metronidazol, ornidazol, claritromicina, rifaximina e ciprofloxacino) e medicamentos para alívio dos sintomas. O custo do tratamento com esses agentes terapêuticos é elevado e, em muitos casos, a evolução clínica é desfavorável (SEPULVEDA et al., 2008; TRIANTAFILLIDIS et al., 2011; WILLIAMS et al., 2011; KAWALEC et al., 2013; NG et al., 2013).

A intervenção cirúrgica é recomendada nos casos em que o paciente não responde ao tratamento medicamentoso (TRIANAFILLIDIS et al., 2011; WILLIAMS et al., 2011).

O tratamento experimental com anticorpos específicos para o TNF- α tem se mostrado promissor (LAWRANCE, 2014). O TNF- α é um mediador químico crucial da resposta imune anormal no intestino e, recentemente, terapias biológicas com alvo nessa citocina tem revolucionado o tratamento da colite ulcerativa. Em um estudo clínico de 12 semanas com 108 pacientes com doença de Crohn resistente a corticoides, os pacientes receberam uma infusão intravenosa durante duas horas, contendo o placebo ou o infliximab. Os pacientes foram avaliados após quatro semanas, observando-se uma melhora clínica em 22 dos 27 pacientes que receberam a dose de 5 mg/kg, em 14 dos 28 tratados com a dose de 10 mg/kg e em 18 dos 28 que receberam a dose de 20 mg/kg, contra apenas 4 dos 24 tratados com o placebo (TARGAN et al., 1997). Em outro estudo, 364 pacientes com colite ulcerativa receberam placebo ou infliximab por via intravenosa na semana inicial e nas semanas 2, 6, 12, 18 e 22. Observou-se melhora clínica na oitava semana em 64% e 69% dos pacientes tratados com as dose de 5 e 10 mg/kg, respectivamente, em comparação com o grupo tratado com o placebo, que apresentou melhora de 29% (SANDBORN et al., 2009).

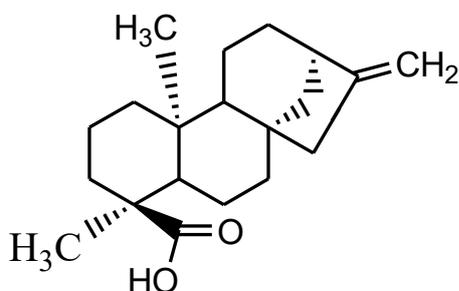
Segundo Kanai (2010), Yan et al. (2009) e Risques et al. (2008) *apud* Gerling e colaboradores (2011), no nível genômico foi levantada a hipótese de que a inflamação crônica que ocorre na colite ulcerativa resulte em aumento da instabilidade cromossômica por radicais livres de oxigênio e nitrogênio, bem como na hipermetilação de regiões pericentroméricas do DNA, desgaste dos telômeros e outros mecanismos não elucidados.

Portanto, é provável a participação de processos oxidativos nos eventos inflamatórios relacionados à colite ulcerativa, o que permite supor que agentes que combinem as ações anti-inflamatória e antioxidante possam atuar positivamente no tratamento dessa doença.

3.4 Espécies vegetais e produtos naturais com atividade contra a colite ulcerativa

Alguns produtos naturais já foram avaliados em estudos pré-clínicos e clínicos visando encontrar novos tratamentos para a colite ulcerativa.

Diterpenos apresentam potencial para o tratamento dessa doença. A administração de ácido caurenoico (**8**), na dose 100 mg/kg, por via oral (administração 15 minutos e 2 horas antes da indução da colite) e retal (administração 2 horas antes da indução da colite), em modelo de colite ulcerativa induzida por ácido acético em ratos, reduziu o infiltrado de células inflamatórias e o edema da mucosa intestinal sugerindo seu efeito anti-inflamatório e protetor da mucosa na colite ulcerativa (PAIVA et al., 2003).



8

A curcumina, componente de *Curcuma longa*, foi avaliada em um estudo clínico randomizado, multicêntrico, duplo-cego e controlado por placebo, em 89 pacientes com colite ulcerativa. Do grupo total de voluntários, 49 pacientes receberam uma dose padrão de mesalazina ou sulfasalazina e 1 g de curcumina, duas vezes ao dia, e 44 pacientes receberam placebo e mesalazina ou sulfasalazina, por 6 meses. A taxa de recidiva após 6 meses de terapia foi maior no grupo que recebeu o placebo que naqueles tratados com curcumina (respectivamente 20,51% e 4,65%) (HANAI et al., 2006).

Koetzner e colaboradores (2009) avaliaram um suplemento alimentar derivado de plantas (Ambrotose®, Mannateck, EUA), constituído por gel de *Aloe vera*, arabinogalactano, fucoidano, amido de arroz e glicosamina, em modelo de colite ulcerativa induzida por sulfato de sódio dextrana em ratos, bem como a segurança de uso em 14 dias de administração diária. O tratamento com esse suplemento por via oral na dose de 1 mg/kg reduziu significativamente os sintomas da doença e preveniu parcialmente o encurtamento do cólon, não sendo observados efeitos adversos durante o tratamento. Quando esse estudo foi realizado, existiam relatos prévios sobre os efeitos dos constituintes isoladamente em modelos de colite em animais: gel de *Aloe vera* (LANGMEAD et al., 2004a, b), arabinogalactano (ROBINSON et al., 2001), fucoidano (PATANKAR et al., 1993), amido de arroz (MOREAU et al., 2004) e glicosamina (SANTHOSH et al., 2007).

Márques e colaboradores (2010) avaliaram o efeito do extrato aquoso de cascas do caule de *Mangifera indica* em modelos de colite ulcerativa induzida por sulfato de sódio dextrana em ratos. A administração do extrato, por via oral e retal, na dose de 150 mg/kg uma vez ao dia, durante 15 dias, reduziu a inflamação, sugerindo a ação protetora do extrato.

Wu e colaboradores (2011) avaliaram o efeito protetor de um extrato rico em antocianidinas obtido de *Vaccinium ashei* em modelo de colite ulcerativa induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) em ratos. A administração oral, uma vez ao dia, do extrato nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg resultou em recuperação significativa do peso e redução da diarreia, além de reduzir a mortalidade dos animais. Quanto às citocinas pró-inflamatórias, a administração desse extrato foi capaz de reverter o aumento dos níveis de IL-12, TNF- α e IFN- γ , além de diminuir a liberação de óxido nítrico. Os autores sugeriram uma correlação entre a ação anti-inflamatória e antioxidante das antocianidinas no efeito protetor apresentado pelo extrato.

A administração do extrato aquoso de cascas de *Cinnamomum cassia* na dose de 50 μ g/g por via oral, durante 20 dias, reduziu a perda de peso e a mortalidade em modelo de colite ulcerativa experimental induzida por TNBS em camundongos, sugerindo que a inflamação foi significativamente reduzida; também houve redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas o TNF- α (KWON et al., 2011).

O extrato rico em polifenóis de *Oenothera paradoxa*, quando administrado duas vezes ao dia nas doses 5 e 10 mg/kg, por via oral ou intracolônica, reduziu os danos microscópicos e macroscópicos no cólon, além de reduzir a atividade de MPO no tecido, em camundongos com colite induzida por TNBS em camundongos. Os níveis de TNF- α e IL-1 β no tecido não foram alterados, ao contrário dos níveis de peróxido de hidrogênio, que foram reduzidos,

indicando que a atividade antioxidante do extrato parece contribuir com a atividade anti-inflamatória observada (SALAGA et al., 2014).

Dezesseis pacientes com colite ulcerativa ativa (índice de atividade clínica ≥ 5) receberam extratos de tormentil (*Polentilla erecta*) nas doses de 1200, 1800, 2400 e 3000 mg/dia, sendo o tratamento realizado durante 3 semanas para cada dose. Cada fase do tratamento foi seguida por uma fase de 3 semanas sem tratamento. Os parâmetros avaliados foram efeitos adversos, índice de atividade clínica, proteína C reativa e nível de taninos no soro dos pacientes. Seis pacientes (38%) desenvolveram desconforto abdominal médio a forte, mas não descontinuaram o uso da medicação. Durante o tratamento com 2400 mg/dia do extrato, o índice de atividade clínica foi médio, e o teor de proteína C reativa aumentou. Durante a terapia, o índice de atividade clínica diminuiu em todos os pacientes, ao passo que, durante a fase sem tratamento, esse índice foi aumentado. Taninos não foram detectados no soro, nem seus produtos de metabolização, indicando que eles não foram absorvidos sistemicamente. Os extratos de tormentil demonstraram segurança de uso na dose de 300 mg/dia (HUBER et al., 2007).

Num estudo clínico piloto, Tang e colaboradores (2011) avaliaram a eficácia e segurança do extrato hidroalcoólico de folhas de *Andrographis paniculata*, na dose de 1200 mg/dia, administrados por via oral durante 8 semanas, em pacientes com colite ulcerativa. A eficácia do tratamento com o extrato, medida através de pontuação de redução dos sintomas, número de pacientes que apresentaram remissão total ou parcial, cicatrização da mucosa, ou melhoria da inflamação mostrada na colonoscopia, foi similar à eficácia do tratamento com mesalazina. A eficácia e segurança da planta também foram avaliadas por Sandborn e colaboradores (2013), em um estudo randomizado, duplo-cego e controlado por placebo, realizado com 224 adultos com colite ulcerativa média a moderada. Os pacientes receberam 1200 ou 1800 mg do extrato padronizado em lactonas diterpênicas HMPL-004 ou o placebo diariamente por via oral, durante 8 semanas. Dentre os pacientes tratados com o extrato nas concentrações de 1200 e 1800 mg, respectivamente 45 e 60% apresentaram resposta clínica na oitava semana, comparado com 40% dos que receberam placebo, indicando que o extrato na dose de 1800 mg por dia promoveu uma melhora clínica significativa nos pacientes. Efeitos adversos ocorreram em 60 e 53% dos pacientes tratados com o extrato nas doses 1200 e 1800 mg por dia, respectivamente, e em 60% do grupo que recebeu o placebo.

3.5 Artrite reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica do espaço sinovial que acarreta danos à cavidade articular, erosão óssea e alterações na integridade da articulação (HOCHBERG & SPECTOR, 1990; BYKERK & SCHOELS, 2013; AMAYA-AMAYA et al., 2015).

É uma doença incapacitante e dolorosa que acomete as articulações causando dor, inchaço, rigidez e, em estágios mais avançados da doença, deformidades e perda da funcionalidade e mobilidade articular. Com a progressão da doença, os indivíduos portadores de AR desenvolvem incapacidade para a realização de suas atividades, tanto da vida diária como profissional, além da redução da qualidade e expectativa de vida do paciente (O'DELL, 2004). Estima-se que a AR tenha prevalência de 0,3 a 1,6% da população mundial, acometendo principalmente o sexo feminino (CHOPRA, 2012).

A etiologia da AR é desconhecida; entretanto, estudos têm sugerido a participação de fatores genéticos, ambientais e imunológicos no desenvolvimento da doença (HELIOVAARA et al., 1993; SILMAN et al., 1996; KARLSON et al., 1999). Sua etiopatogenia é complexa, envolvendo a participação de uma resposta imuno-inflamatória, com a liberação de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas (TNF- α , IL-1, IL-2 e IL-6) e eicosanoides, que contribuem para a perpetuação e progressão da sinovite (HARRIS, 1990; BRENNAN et al., 1992; AALBERS et al., 2015).

Estão descritos na literatura vários estudos relacionando a patogênese da AR com o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas o TNF- α . Essas citocinas podem ativar monócitos, macrófagos e fibroblastos sinoviais, além de atuarem no recrutamento de leucócitos para a sinóvia. Essas células ativadas produzem grande quantidade de mediadores pró-inflamatórios, dificultando a resolução do processo inflamatório e podendo culminar em inflamação crônica (SMOLEN & STEINER, 2003; MCINNES & SCHETT, 2007; ALESSANDRI et al., 2013; AALBERS et al., 2015).

De maneira geral, observa-se que ainda não existe o perfeito entendimento de uma estratégia terapêutica segura e eficaz para o tratamento da AR. O tratamento visa conscientizar o paciente sobre a doença, aliviar a dor, melhorar a função da articulação, diminuir a deficiência e prevenir ou retardar a progressão e as consequências destrutivas da doença (KILTZ et al., 2009).

Os tratamentos atuais buscam aliviar os sintomas da AR por diferentes métodos: tratamento não farmacológico (educação, exercícios físicos e mudança do estilo de vida); tratamento farmacológico com AINEs, fármacos (drogas) antirreumáticos modificadores da

doença (DARMDs) e inibidores de TNF- α ; e tratamento invasivo, como injeções intra-articulares de medicamentos e artroplastia (KILTZ et al., 2009; COSTA et al., 2015).

AINEs interferem em um pequeno segmento da cascata inflamatória, através da diminuição da geração de prostaglandinas por ciclooxigenases (COX), mas não interferem com os eventos imuno-inflamatórios nem retardam a destruição das articulações. São muito utilizados para o tratamento da AR por serem eficazes em aliviar a dor e reduzirem a inflamação. Dentre os principais efeitos adversos dessa classe de fármacos estão os sérios danos gástricos que ocorrem no uso contínuo, que muitas vezes culminam em abandono do tratamento. No caso dos fármacos que inibem seletivamente a COX-2, como o celecoxib e o etoricoxib, esses eventos gastrointestinais têm menor incidência, entretanto, o uso desse tipo de medicamento aumenta significativamente o risco de complicações cardiovasculares, o que limita o seu uso. Vale também destacar que o uso de AINEs não impede a destruição das articulações pelo processo inflamatório crônico nem a progressão da AR, apenas aliviam os sintomas da doença, portanto, é um tratamento ineficaz a longo prazo (LANGMAN et al., 1999; BRESSAN & TONUSSI, 2008; GISLASON et al., 2009; PODDUBNYI et al., 2009).

Já os DARMDs, como o metotrexato, sulfasalazina e a ciclosporina, são capazes de retardar a progressão da doença e de reduzir a degeneração das articulações, preservando sua função e, por isso, são a primeira escolha no tratamento da AR. Contudo, apresentam limitações: ação lenta, indução de remissão parcial e possibilidade de efeitos adversos significativos, que incluem ulceração oral e efeitos gastrointestinais, podendo haver, com menor frequência, anormalidades hematológicas e hepatotoxicidade (O'DELL, 2004; KHANNA et al., 2007; MCINNES; SCHETT, 2007; VAN VOLLENHOVEN et al., 2012).

O uso de fármacos que possuem como alvo as principais citocinas envolvidas no processo inflamatório da AR tem recebido destaque nos últimos anos. O uso de anticorpos específicos para o TNF- α , como o infliximab e o adalimumab, merece destaque, pois esses fármacos promovem a remissão da doença associada com a prevenção dos danos articulares, especialmente quando se inicia o tratamento no início do desenvolvimento da doença, antes que haja algum dano articular. Entretanto, apesar de mostrarem eficácia na melhoria do prognóstico da AR a longo prazo, também apresentam limitações, como o risco aumentado de infecções, baixa adesão ao tratamento devido à administração parenteral e o alto custo (LICASTRO et al., 2009; RAFFEINER et al., 2009; SURESH, 2010; AALBERS et al., 2015).

Como a AR é uma condição incapacitante que permanece sem tratamento efetivo, é relevante a busca por novas terapias, que possam ser administradas por via oral,

consequentemente, com melhor adesão ao tratamento, com menos efeitos adversos e mais baixo custo.

3.6 Espécies vegetais e produtos naturais com atividade contra a artrite reumatoide

Produtos naturais têm sido amplamente avaliados em estudos visando encontrar novos tratamentos para a AR.

O extrato metanólico das folhas de *Cassia alata* reduziu significativamente o número de monócitos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos no fluido sinovial de ratos com artrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA), na dose de 500 mg/kg por via oral (LEWIS & LEVY, 2011).

O extrato rico em polifenóis das cascas de *Cinnamomum zeylicanum*, na dose 8 mg/kg, exibiu potencial anti-artrítico, com inibição da migração de leucócitos e da síntese de prostaglandinas, em modelo de artrite induzida por CFA em ratos Wistar (VETAL et al., 2010).

O extrato metanólico das cascas de *Salix nigra* inibiu a produção de TNF- α , IL-1 e IL-6 no fluido sinovial de ratos com artrite induzida por CFA, na dose de 100 mg/kg por via oral (SHARMA et al., 2011).

Em camundongos com artrite induzida por colágeno, a fração enriquecida em proantocianidinas de *Vitis vinifera*, administrada oralmente na dose diária de 300 mg/kg durante duas semanas, reduziu os danos da doença, a resposta proliferativa das células T, a infiltração de células mono e polinucleares na articulação, a hiperplasia sinovial e a destruição articular (PARK et al., 2011).

O extrato aquoso das sementes de *Piper longum* inibiu o edema de pata em ratos com artrite induzida por CFA, nas doses 200 e 400 mg/kg (YENDE et al., 2010).

A piperina, isolada de *Piper nigrum*, inibiu a produção de citocinas pró-inflamatórias em modelos de artrite induzida por carragenina em ratos, na dose 100 mg/kg por via oral (BANG et al., 2009).

3.7 Participação de radicais livres em processos inflamatórios

Radicais livres (RL) são espécies químicas constituídas por um átomo ou associação de átomos possuindo um elétron desemparelhado na sua órbita mais externa, o que implica em alta instabilidade energética e cinética. Dessa forma, sua estabilização está relacionada à doação ou retirada de um elétron de outra molécula (HIRATA et al., 2004; PINAZO-DURÁN et al., 2014).

As membranas celulares são particularmente susceptíveis a reações de peroxidação. Peróxidos lipídicos resultam em perda irreversível da fluidez e elasticidade da membrana, podendo levar à ruptura da célula, ou causar interferência no transporte ativo ou passivo de substâncias através da membrana. RL também são capazes de oxidar e fazer ligações cruzadas com proteínas, o que pode comprometer a atividade de enzimas. Os resíduos de aminoácidos proteicos são altamente susceptíveis ao ataque oxidativo. O DNA também se mostra muito susceptível ao ataque por RL, cuja reação pode provocar a retirada de uma base ou causar quebra na dupla fita, resultando em um evento prejudicial ou até mesmo letal (WICKENS, 2001; DOWLING & SIMMONS, 2009).

Os RL têm sido associados ao desenvolvimento de diversas doenças de natureza inflamatória, dentre elas a artrite reumatoide, diabetes e colite ulcerativa (PHILLIPS et al., 2010; ALESSANDRI et al., 2013). Evidências experimentais indicam que radicais livres são capazes de ativar mediadores pró-inflamatórios, como MAPKs, além de aumentar a expressão de genes que regulam a produção de algumas citocinas. Portanto, agentes antioxidantes representam uma estratégia para diminuir os níveis de RL e potencialmente podem ser empregados como agentes terapêuticos no tratamento de processos inflamatórios (WANG et al., 2002; GROEGER et al., 2009; IMPELLIZZERI et al., 2011; LOPES et al., 2011; ALESSANDRI et al., 2013).

Um dos mecanismos da regulação de genes envolvidos na resposta inflamatória e imune é a ativação do NF- κ B. Essa via de sinalização é sugerida pelo fato de agentes oxidantes terem a capacidade de ativar o NF- κ B, ao mesmo tempo em que diferentes substâncias antioxidantes podem inibir a ativação desse fator de transcrição (KAPLAN et al., 2007, CACHOFEIRO et al., 2009). Essa ativação sensível ao processo redox parece ser dependente dos níveis intracelulares de glutatona reduzida, o maior agente antioxidante do organismo, já que a redução da glutatona evita a ativação do NF- κ B (CACHOFEIRO et al., 2009).

A produção excessiva de RL pode causar modificação oxidativa de biomoléculas, por exemplo, tripsina, colágeno, LDL, DNA e lipídeos, o que pode gerar uma resposta inflamatória. RL também podem ativar uma série de sistemas enzimáticos, incluindo proteínas quinase, proteínas fosfatase, fatores de transcrição e proteínas de choque térmico. RL também são críticos para a expressão de genes que codificam proteínas inflamatórias, por exemplo, proteinases envolvidas na destruição tissular como colagenases e gelatinases. Além disso, há evidências de que suplementação de antioxidante possa aliviar a inflamação e doenças relacionadas (SAEED et al., 2005).

3.8 Espécies vegetais selecionadas

Foram selecionadas para estudo espécies vegetais que possuem uso tradicional para o tratamento de processos inflamatórios ou diarreia, ou que possuam relatos de substâncias ou classes de substâncias que já demonstraram essas atividades. A seguir faz-se um breve relato das espécies avaliadas no presente trabalho, com ênfase em *Stryphnodendron adstringens*, que foi selecionada para estudos farmacológicos e fitoquímicos.

Bowdichia virgilioides H.B.K. (Fabaceae), árvore brasileira conhecida popularmente como sucupira-preta, é amplamente utilizada na medicina popular para o tratamento de diarreia, gota, diabetes, bronquite, hipertermia, inflamações do útero e reumatismo (BERG, 1993; POTT e POTT, 1994; SANGUINETTI, 1989 *apud* BARROS et al., 2010).

Campomanesia lineatifolia Ruiz e Pav. (Myrtaceae), árvore frutífera brasileira popularmente conhecida como guabiroba, é utilizada tradicionalmente para o tratamento de disenteria, problemas estomacais e hepáticos, diarreia, problemas do trato urinário e leucorreia. Outras espécies do gênero são utilizadas com o mesmo propósito (CORREA, 1984; CARRARA, 1997).

Cordia guazumaefolia (Desv) Roem & S. é um arbusto que ocorre em regiões tropicais, popularmente utilizada como agente antirreumático e anti-inflamatório (JOLY, 1998). Para outra espécie do gênero, *Cordia dichotoma* já foi descrita a atividade anti-inflamatória em modelo de colite ulcerativa (GANJARE et al., 2011).

Espécies do gênero *Hymenaea* L. (Fabaceae) são árvores conhecidas popularmente no Brasil como jatobá, utilizadas na medicina popular como tônico, analgésico, antisséptico, anti-inflamatório, antipirético, expectorante, laxativo e antirreumático (MENDES e CARLINI, 2007; RAMOS, 2008).

Licania tomentosa Benth (Chrysobalanaceae) é uma árvore conhecida no Brasil como oiti. Espécies do gênero são tradicionalmente utilizadas para tratar diabetes (LANCET et al., 1983). A espécie exibiu atividade analgésica e anti-inflamatória nos ensaios de inibição de contorções abdominais induzidas por ácido acético e de difusão do corante azul de evans para a cavidade intraperitoneal (CASTILHO, 2001).

Mikania glomerata Sprengel (Asteraceae) é uma trepadeira brasileira popularmente conhecida como guaco, utilizada popularmente para tratamento de asma, bronquite e como adjuvante no combate à tosse (CELEGHINI et al., 2001; AGRA et al., 2008). Da espécie foi isolado o ácido caurenóico, que exibiu atividade em modelo de colite ulcerativa (PAIVA et al., 2003).

O gênero *Paepalanthus* (Eriocaulaceae) está amplamente distribuído no Brasil. Da espécie *Paepalanthus bromelioides* Silveira, conhecida popularmente como sempre-viva, foi isolada a paepalantina, que apresentou atividade anti-inflamatória em modelo de colite ulcerativa (DI STASI et al., 2004).

O gênero *Stryphnodendron* Mart. (Fabaceae) compreende 48 espécies distribuídas nos cerrados brasileiros; são árvores de pequeno porte, conhecidas popularmente como barbatimão, cujas cascas do caule, ricas em taninos, são usadas pela população para a cicatrização de feridas e para o tratamento de leucorreia e diarreia (OCCHIONI, 1990; HASLAM, 1996; SANTOS e MELO, 2004).

Terminalia glabrescens Mart. é uma árvore brasileira (SILVA, 1984). Espécies do gênero são tradicionalmente utilizadas como antimalárica, anticancerígena, anti-inflamatória, além do tratamento de diarreia, úlceras e diabetes (CORRÊA, 1974). Para a espécie *Terminalia seriacea*, já foi descrita a atividade em modelo de colite ulcerativa (MOCHIZUKI & HASEGAWA, 2007)

Vernonia phosphorea (Vell.) Monteiro (Vernoniaceae) é uma árvore popularmente conhecida no Brasil como assa-peixe. É utilizada tradicionalmente para tratar asma, hemorroidas, diabetes, reumatismo e como diurético, expectorante e cicatrizante de feridas (CORRÊA, 1962).

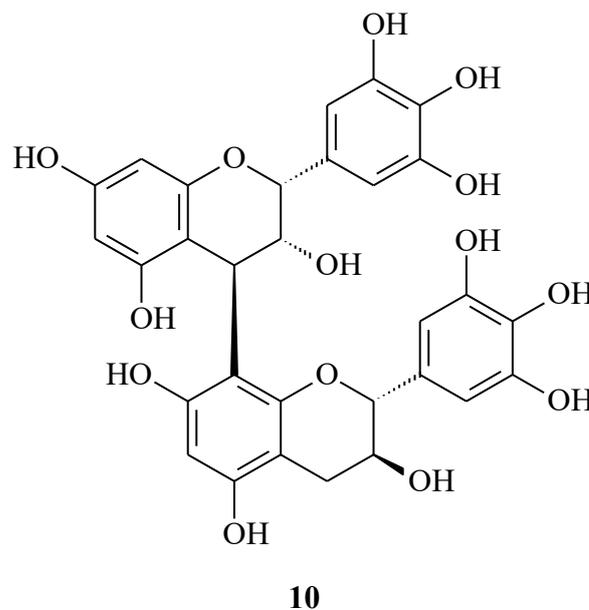
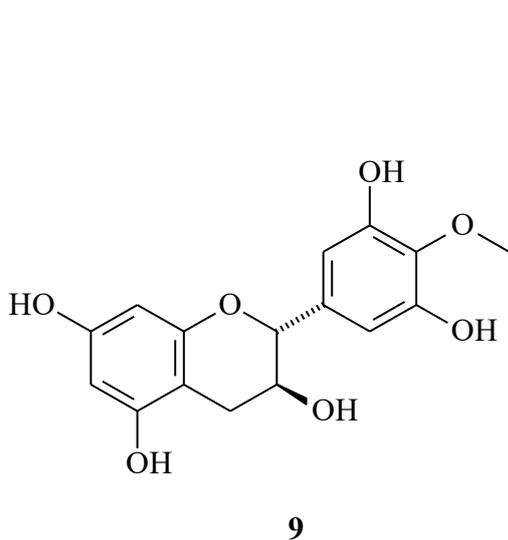
Vitex polygama Cham. (Verbenaceae), espécie popularmente conhecida como tarumã, com ampla distribuição no país, é tradicionalmente utilizada como emenagogo e diurético, além do tratamento de doenças renais (GALLO et al., 2008; MEENA et al., 2011). Para a espécie *Vitex negundo*, já foi descrita a atividade em modelo de colite ulcerativa (ZAWARE et al., 2011).

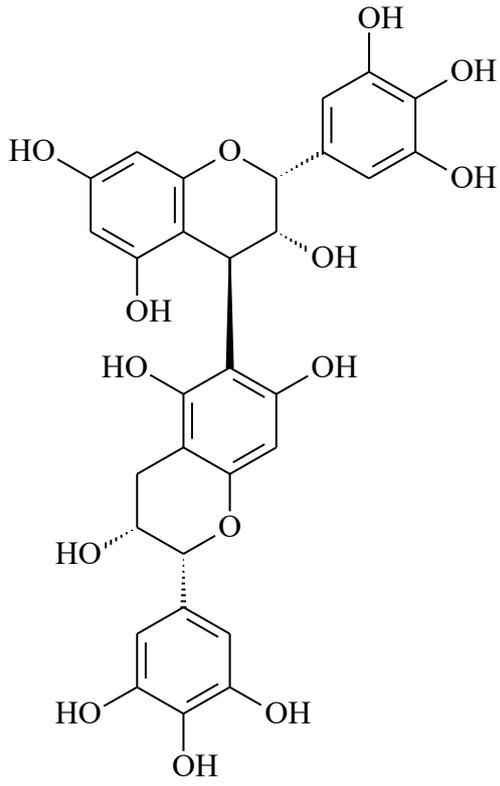
3.9 *Stryphnodendron adstringens*

A espécie *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville já teve sua ação cicatrizante comprovada (CARVALHO et al., 1991; JORGE-NETO et al., 1996; SANCHES et al., 2005), atribuída ao alto teor de taninos presentes (MELLO et al., 1996). Também já está comprovada sua atividade anti-inflamatória nos modelos de edema de pata induzido por carragenina e dextrana, pleurisia e artrite em ratos (LIMA et al., 1998), bem como atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) e Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*) (TOLEDO, 2002).

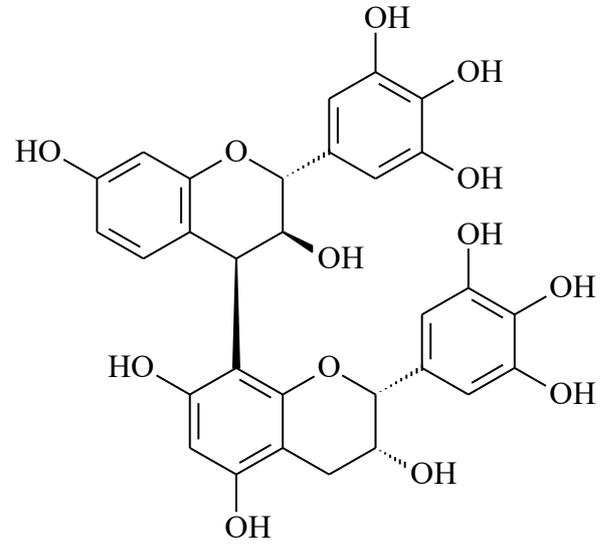
A partir de estudos fitoquímicos da casca da espécie, foram isolados os metabólitos galocatequina, epigalocatequina, 3-*O*-galato de epigalocatequina, 4'-*O*-metil-galocatequina

(9), 3-*O*-(3,5-dimetil)-galato de epigalocatequina, 3-*O*-(3-metoxi-4-hidroxi)-benzoato de epigalocatequina, epigalocatequina-(4 β -8)-galocatequina (10), epigalocatequina-(4 β -8)-epigalocatequina, epigalocatequina-(4 β -8)- 3-*O*-galato de epigalocatequina, epigalocatequina-(4 β -8)-epigalocatequina, 3-*O*-galato de epigalocatequina (4 β -8)- 3-*O*-galato de epigalocatequina, epigalocatequina-(4 β -6)-epigalocatequina (11), galocatequina-(4 α -8)-epigalocatequina, galocatequina-(4 α -8)-epigalocatequina, robinetinidol-(4 β -8)-epigalocatequina (12), robinetinidol-(4 β -8)-galocatequina, robinetinidol-(4 α -8)-epigalocatequina, robinetinidol-(4 β -8)- 3-*O*-galato de epigalocatequina, robinetinidol-(4 β -6)-galocatequina, robinetinidol-(4 β -6)-epigalocatequina, robinetinidol-(4 α -8)- 3-*O*-galato de epigalocatequina (MELLO et al., 1996a,b; 1999). Um estudo recente demonstrou que o heptâmero prodelfinidina, isolado das cascas de *S. adstringens*, não causou toxicidade em roedores, após tratamento oral agudo e crônico (COSTA et al., 2013).





11



12

4 EXPERIMENTAL

4.1 Equipamentos

- Agitador de tubos Phoenix, modelo AD 56.
- Balança analítica Mettler Toledo, modelo AB204.
- Balança analítica Mettler Toledo, modelo AT201.
- Banho-maria Fanem, modelo 120/4.
- Banho de ultrassom Thornton, modelo T14.
- Capela de fluxo laminar, Veco.
- Centrífuga Excelsa 2, Fanen.
- Centrífuga citológica Fanen, modelo 248.
- Cytospin 3, Thermoshadon
- Concentrador a vácuo Centrivap, Labconco.
- Espectrofotômetro de IV Spectrum One, Perkin-Elmer com sistema ATR (Laboratório de Química Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, UFMG).
- Espectrômetro de RMN Bruker Avance DPX-200 e Bruker Avance DRX-400, com software BRUKER TOPSPIN 2.1 e 3.1 para processamento de dados (Departamento de Química, ICEX, UFMG)
- Estufa de CO₂ Inco 2 Memmert.
- Leitora de microplacas com monocromador Tecan, modelo Infinite, com software iControl para processamento de dados.
- Microcentrífuga Cientec, modelo 14000D.
- Microscópio Olympus BX40.
- Micropipetas automáticas monocanais ajustáveis de 0,5-10 µL, 10-100 µL, 20-200 µL e 100-1000 µL, Brand.
- Potenciômetro Marconi, modelo PA200.
- Power SYBR Green PCR Master Mix 2X, Applied Biosystems (Laboratório de Biologia de Micro-organismos, ICB, UFMG).
- Sistema 7500 Fast Real Time PCR, Applied Biosystems (Laboratório de Biologia de Micro-organismos, ICB, UFMG).
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Waters, equipado com injetor automático 2695, detector de arranjos de diodos (DAD) 2996, bomba L-6200^a, integrador C-R4A e software Empower para processamento de dados.

- Sistema de cromatografia líquida de ultra performance Acquity (Waters), equipado com injetor automático 2695, detector de arranjos de diodos (DAD) 2996 (Waters) e detector de espectrometria de massas Acquity TQ (Waters) com ionização por eletrospray Z-spray (ESI), operante em modo positivo e negativo e software MassLynx (versão 4.1, Waters) para processamento de dados.
- Sistema de filtração de água Milli-Q, Milli-q plus.
- Soprador serigráfico Sternel, modelo HL 500.

4.2 Material

- Ácido acético grau P.A., Merck.
- Ácido clorídrico grau P.A., Merck.
- Ácido fórmico grau P.A., Merck.
- Ácido fosfórico grau P.A., Merck.
- Ácido gálico SQR, Sigma.
- Ácido sulfúrico grau P.A., Merck.
- Adjuvante completo de Freund (CFA), Sigma.
- Anisaldeído, Merck.
- Antibióticos: penicilina G e gentamicina, Sigma.
- Catequina SQR, Sigma.
- Coluna para CLAE LiChrospher 100, RP-18, com partículas de 5 μ m, 125 \times 4 mm d.i., Merck.
- Coluna para CLAE LiChrospher 100, RP-18, com partículas de 5 μ m, 250 \times 4 mm d.i., Merck.
- Cromatofolhas de sílica gel 60, Merck.
- 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), Sigma-Aldrich.
- Epicatequina SQR, Sigma.
- Epigallocatequina SQR, Sigma.
- Galato de epigallocatequina SQR, Sigma.
- Galocatequina SQR, Sigma.
- Kit ELISA TNF- α humano, DY210 Duo Set, R&D systems.
- Kit ELISA TNF- α camundongo, DY410 Duo Set, R&D systems.
- Kit ELISA CXCL-1 camundongo, DY453 Duo Set, R&D systems.
- Kit SuperScriptTM III Reverse Transcriptase, Invitrogen, Life technologies.

- Lipopolissacarídeo, Sigma.
- Meio de cultura RPMI, Sigma.
- Pipetas sorológicas descartáveis, estéreis, TPP.
- Placa de 96 poços para cultivo celular, Corning.
- Placa de 96 poços para imunoenensaio, Nunc.
- Quercitrina SQR, Sigma.
- Resina Amberlite XAD-2 Sigma.
- Resina Amberlite XAD-16, Sigma.
- Resina Sephadex LH-20, Sigma.
- Rutina SQR, Sigma.
- Sais e reagentes: bicarbonato de sódio, fosfato de sódio monobásico, ácido cítrico, *o*-fenilenodiamina (OPD), cloreto de sódio, tampão fosfato salino (PBS), hidróxido de sódio, PA, Sigma.
- Sílica-gel 60 (63-200 mesh), Fluka Analytica.
- Sílica gel 60G para CCD (63-200 mesh), Merck.
- Sistema de filtração esterilizante, capacidade para 250 e 500 mL, membrana de 0,22 μm , Corning.
- Solventes grau CLAE: metanol e acetonitrila, Tedia.
- Solventes grau P.A.: *n*-hexano, diclorometano, clorofórmio, acetona, acetato de etila, etanol, metanol, *n*-butanol, Quimex.
- Trizol, Ambion, Life Technologies.
- Tubo de plástico tipo *safe lock*.
- Tween 20, Sigma.
- *Vials* de vidro para HPLC com tampas e septos de silicone e politetrafluoretileno, Tedia.

4.3 Coleta das espécies vegetais

Os dados relativos à coleta e identificação das espécies vegetais estão dispostos no Tabela 1, bem como os números das exsiccatas correspondentes, depositadas no herbário do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG e no herbário da Fundação Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (CGMS) do Departamento de Biologia/CCBS da UFMS.

4.4 Preparo dos extratos vegetais

Os materiais vegetais foram secos em estufa a 40 °C, com circulação forçada de ar, e pulverizados em moinho de facas. Os materiais vegetais secos e pulverizados foram submetidos, individualmente, à extração por maceração com diferentes solventes (diclorometano, acetato de etila e etanol) com o auxílio do banho de ultrassom (5 g da droga vegetal para 50 mL de solvente, durante 20 minutos, por 3 vezes). Os extratos aquosos foram preparados por infusão (folhas) e/ou decocção (galhos e cascas), sendo utilizados 5 g do material vegetal para 50 mL de água. Os solventes foram eliminados em evaporador rotatório sob pressão reduzida, em temperatura máxima de 40 °C, ou liofilizados, no caso dos extratos aquosos, obtendo-se assim os extratos brutos secos. Os extratos de *Vernonia phosphorea* e *Paepalanthus bromelioides* utilizados nesse estudo foram obtidos do banco de extratos do Laboratório de Fitoquímica da UFMG. Essas espécies vegetais foram extraídas por maceração estática com etanol comercial. Os rendimentos de cada extrato obtido estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 1 - Dados de coleta e identificação das espécies selecionadas para estudo.

Espécie	Família	Parte anatômica	Local da coleta	Identificador	Nº da exsicata
<i>Bowdichia virgilioides</i> H.B.K	Fabaceae	Folha, caule	Belo Horizonte	Prof. João Renato Stehmann	BHCB 166999
<i>Campomanesia lineatifolia</i> Ruiz e Pav.	Myrtaceae	Folha, caule	Campus, UFMG	Prof. Marcos Sobral	BHCB 150.606
<i>Cordia guazumaefolia</i> (Desv) Roem & S.	Boraginaceae	Folhas, caule	Estação Ecológica, UFMG	Prof. João Renato Stehmann	BHCB 166998
<i>Hymenaea coubaril</i> L.	Fabaceae	Folhas	MHJB UFMG	Fávia Santos Faria	BHCB 161553
<i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex. Hayne	Fabaceae	Folhas	Campus, UFMG	Prof. João Renato Stehmann	BHCB 47.468
<i>Licania tomentosa</i> Benth	Chrysobalanaceae	Folhas	Belo Horizonte	Prof. João Renato Stehmann	BHCB 152221
<i>Mikania glomerata</i> Sprengel	Asteraceae	Folha, caule	Estação Ecológica, UFMG	Prof. João Renato Stehmann	BHCB 167001
<i>Paepalanthus bromelioides</i> Silveira	Eriocaulaceae	Folhas	Serra do Cipó	Prof. João Renato Stehmann	BHCB 24241
<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	Fabaceae	Cascas	Santa Cruz de Minas e Ritópolis, MG	Prof. João Renato Stehmann	BHCB 11231
<i>Stryphnodendron obovatum</i> Benth	Fabaceae	Cascas	Estação Ecológica, UCDB, MS	Prof. Arnildo Pott	CGMS 329997
<i>Terminalia glabrescens</i> Mart.	Combretaceae	Folhas, caule	Estação Ecológica, UFMG	Prof. João Renato Stehmann	BHCB 167015
<i>Vernonia phosphorea</i> (Vell.) Monteiro	Vernoniaceae	Folhas	Estação Ecológica, UCDB, MS	Prof. Arnildo Pott	CGMS 11970
<i>Vitex polygama</i> Cham	Vervaceae	Folhas, caule	Estação Ecológica, UFMG	Prof. João Renato Stehmann	BHCB 166996

Tabela 2 - Extratos obtidos das espécies vegetais selecionadas para estudo e rendimentos extrativos.

Planta	Parte usada	Solvente	Extrativos (% m/m)	Planta	Parte usada	Solvente	Extrativos (% m/m)
<i>Bowdichia virgilioides</i>	Folhas	DCM	8,11	<i>Bowdichia virgilioides</i>	Galhos	DCM	6,61
		EtOAc	8,02			EtOAc	24,23
		EtOH	39,70			EtOH	34,21
		H ₂ O	23,15			H ₂ O	22,86
<i>Campomanesia lineatifolia</i>	Folhas	DCM	7,70	<i>Campomanesia lineatifolia</i>	Galhos	DCM	8,84
		EtOAc	10,04			EtOAc	11,19
		EtOH	37,77			EtOH	32,70
		H ₂ O	25,40			H ₂ O	23,01
<i>Cordia guazumaefolia</i>	Folhas	DCM	14,91	<i>Cordia guazumaefolia</i>	Galhos	DCM	7,29
		EtOAc	14,89			EtOAc	7,09
		EtOH	22,14			EtOH	18,76
		H ₂ O	17,42			H ₂ O	12,57
<i>Hymenaea coubaril</i>	Folhas	EtOH	13,82	<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	Folhas	EtOH	8,81
<i>Licania tomentosa</i>	Folhas	DCM	12,35	<i>Licania tomentosa</i>	Folhas	EtOH	29,43
		EtOAc	18,77			H ₂ O	24,11
<i>Mikania glomerata</i>	Folhas	DCM	11,98	<i>Mikania glomerata</i>	Galhos	DCM	7,66
		EtOAc	12,19			EtOAc	7,89
		EtOH	16,00			EtOH	18,66
		H ₂ O	25,47			H ₂ O	22,19
<i>Paepalanthus bromelioides</i>	Folhas	EtOH	7,69	<i>Vernonia phosphorea</i>	Folhas	EtOH	31,20
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	Cascas	DCM	6,18	<i>Stryphnodendron obovatum</i>	Cascas	DCM	6,67
		EtOAc	8,58			EtOAc	9,54
		EtOH	44,80			EtOH	33,12
		H ₂ O	48,00			H ₂ O	35,80
<i>Terminalia glabrescens</i>	Folhas	DCM	11,84	<i>Terminalia glabrescens</i>	Galhos	DCM	6,89
		EtOAc	13,17			EtOAc	7,92
		EtOH	26,32			EtOH	29,09
		H ₂ O	19,56			H ₂ O	22,67
<i>Vitex polygama</i>	Folhas	DCM	9,69	<i>Vitex polygama</i>	Galhos	DCM	7,35
		EtOAc	10,08			AcOEt	6,28
		EtOH	36,36			EtOH	32,11
		H ₂ O	19,00			H ₂ O	13,15

4.5 Fracionamento dos extratos por partição entre solventes imiscíveis

Os extratos etanólicos de *C. lineatifolia*, *S. adstringens* e *T. glabrescens* foram submetidos a fracionamento por partição entre solventes imiscíveis. Uma porção de 3,0 g de cada extrato foi ressuspensa em 54 mL de água e submetida à partição com uma mistura de acetato de etila/isopropanol/*n*-butanol (42:12:6) (NASCIMENTO et al., 2013), sob agitação magnética por 30 minutos. Após a separação das fases e remoção da fase orgânica, a extração da fase aquosa com a fase orgânica do sistema de solvente (60 mL) foi repetida por duas vezes. As fases orgânica e aquosa foram concentradas até resíduo em evaporador rotatório e mantidas em dessecador até completa eliminação do solvente, resultando nas frações orgânica e aquosa (Tabela 3). Esse processo foi repetido nove vezes, totalizando as massas dispostas na Tabela 3.

Tabela 3 - Fracionamento dos extratos etanólicos por extração entre solventes imiscíveis, usando o sistema água / acetato de etila / isopropanol / *n*-butanol (54:42:12:6) (NASCIMENTO et al., 2013).

Extrato	Fração orgânica (g)	Rendimento (%)	Fração aquosa (g)	Rendimento (% em relação aos extratos etanólicos)
<i>Campomanesia lineatifolia</i>	11,902	39,7	15,011	50,0
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	12,690	42,3	13,205	44,0
<i>Terminalia glabrescens</i>	9,561	31,9	17,443	58,1

4.6 Perfis cromatográficos exploratórios dos extratos por CCD, CLAE-DAD e UPLC-MS

4.6.1 Análises das frações por CCD

Os perfis químicos das frações orgânica e aquosa de *C. lineatifolia*, *S. adstringens* e *T. glabrescens* por CCD foram obtidos utilizando sílica gel como fase estacionária, empregando-se como eluente tolueno/acetona/ácido acético (3:3:1). Como reagentes para revelação foram utilizados vanilina sulfúrica, cloreto férrico e anisaldeído sulfúrico (WAGNER & BLADT, 1996).

Foram utilizados ácido gálico, catequina e proantocianidina A2 como substâncias de referência.

4.6.2 Análises dos extratos e frações por CLAE-DAD

Os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos e das frações aquosa e orgânica de *C. lineatifolia*, *S. adstringens* e *S. obovatum* foram obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detector de arranjos de diodo (CLAE-DAD), em coluna LiChrospher 100, RP-18, (125 × 4 mm d.i., 5µm). Utilizou-se gradiente exploratório linear de acetonitrila e água contendo ácido fosfórico a 0,1% (5% a 95% de acetonitrila em 60 minutos, seguido por 5 minutos de eluição isocrática e retorno à condição inicial no tempo de 70 minutos), com fluxo de 1 mL/min e temperatura de 40 °C. A detecção foi realizada por análise de varredura, no intervalo de comprimentos de onda de 200 a 400 nm, sendo os cromatogramas extraídos em comprimento de onda de 220 nm.

As soluções dos extratos para análise foram preparadas em metanol grau HPLC (5 mg/mL) e centrifugadas por 10 minutos a 9184 x g, seguindo-se injeção de alíquotas (10 µL) dos sobrenadantes de forma automática no sistema de CLAE. Para as substâncias de referência, a concentração utilizada foi 1 mg/mL.

4.6.3 Análise por CLAE-DAD em condições otimizadas para *S. adstringens*

Os perfis cromatográficos do extrato, frações e subfrações de *S. adstringens* foram obtidos por CLAE-DAD, em coluna LiChrospher 100 RP-18 (250 × 4 mm d.i., 5µm), de acordo com método desenvolvido por Nascimento e colaboradores (2013). Utilizou-se gradiente linear de acetonitrila contendo ácido fosfórico a 0,1% e água contendo ácido fosfórico a 0,1% (5% a 40% de acetonitrila em 60 minutos, seguido por 10 minutos de eluição isocrática), com fluxo de 1 mL/min e temperatura de 40°C. A detecção foi realizada por análise de varredura, no intervalo de comprimentos de onda de 200 a 400 nm, sendo os cromatogramas extraídos em comprimento de onda de 220 nm.

As soluções dos extratos para análise foram preparadas em metanol grau HPLC/ água milli-Q (1:9) (5 mg/mL) e centrifugadas por 10 minutos a 9184 x g, seguindo-se injeção de alíquotas (10 µL) dos sobrenadantes de forma automática no sistema de CLAE. Para as substâncias de referência, a concentração utilizada foi 1 mg/mL.

4.6.4 Análise por UPLC-MS em condições otimizadas para *S. adstringens*

O perfil cromatográfico da fração aquosa de *S. adstringens* foi também obtido por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massas (UPLC-MS), com coluna LiChrospher 100 RP-18 (250 × 4 mm d.i., 5µm), utilizando o método descrito no item 4.6.3 (NASCIMENTO et al., 2013). A detecção foi realizada em comprimento de onda

de 220 nm. Os parâmetros de MS utilizados foram: modo scan positivo e negativo na faixa de relação carga / massa (m/z) de 100 a 2000 Da, temperatura de dessolvatação de 375 °C, fluxo de gás de dessolvatação de 600 L/h, fluxo de gás de cone de 60 mL/min, temperatura de 120 °C, voltagem do cone de 60V e voltagem capilar de 3000 V. O gás nebulizador foi o nitrogênio.

As soluções dos extratos para análise foram preparadas em metanol grau HPLC/ água milli-Q (1:9) (5 mg/mL), centrifugadas por 10 minutos a 9184 x g e filtradas em membrana PTFE com poros de diâmetro de 0,45 μm . Seguiu-se injeção de alíquotas (8 μL) dos sobrenadantes de forma automática no sistema de UPLC. Para as substâncias de referência, a concentração utilizada foi 1 mg/mL.

Os experimentos foram realizados pelo professor Dr. Rodrigo Maia de Pádua.

4.6.5 Análises de MS/MS por UPLC-MS

Os experimentos de espectrometria de massas acoplada (MS/MS) da fração orgânica de *S. adstringens* foram realizados em coluna BEH RP-18 (50 \times 2,1 mm d.i., 1,7 μm), com eluição em sistema gradiente de água (A) e acetonitrila, ambos contendo 0,1% de ácido fórmico, com fluxo 0,3 mL/min, iniciando com 5% de B até 95% em 10 minutos, seguindo-se 1 min de eluição isocrática (95% B) e retornando à condição inicial em 2 minutos. A detecção foi realizada em comprimento de onda de 220 nm. Os parâmetros de EM foram os seguintes: modo scan negativo na faixa de m/z 100-1500 Da, temperatura de dessolvatação de 350 °C, fluxo de gás de dessolvatação de 550 L/h, fluxo de gás de cone de 50 mL/min, temperatura de 120 °C, voltagem do cone de 60V e voltagem capilar de 3500 V. Os gases nebulizadores foram o nitrogênio e o argônio.

4.7 Avaliação da atividade sequestradora de radicais livres pelo ensaio do DPPH

4.7.1 Adaptação do método para microescala

A atividade sequestradora de radicais livres foi realizada segundo o método descrito por Farias e colaboradores (2013), sendo o método adaptado para placas de microtitulação de 96 poços. A cada poço foram adicionados 100 μL de solução metanólica da amostra em diversas concentrações (0,43 a 280,56 $\mu\text{g/mL}$) e 40 μL de solução de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) 0,3 mM em metanol. Após agitação das placas durante 1 minuto, seguida de incubação a 37 °C por 30 min, ao abrigo da luz, a absorbância foi lida em λ 516 nm. A

capacidade de eliminar o radical DPPH (% de atividade antioxidante - AAO) foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \left(\frac{A_{\text{Controle}} - A_{\text{Amostra}}}{A_{\text{Controle}}} \right) \times 100$$

Onde A_{Controle} é a absorvância da solução de DPPH sem adição da amostra; A_{Amostra} é a absorvância da amostra com o DPPH. Os percentuais de atividade antioxidante (%AAO) das amostras foram calculados e o gráfico da %AAO *versus* concentração foi construído para se obter a concentração efetiva em 50% de atividade por meio de regressão linear (KURECHI *et al.*, 1980). Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos como CE₅₀, em µg/mL. Rutina, em concentrações de 0,86 a 14,28 µg/mL, foi empregada como controle positivo, e o metanol, como controle negativo.

4.7.2 Validação do método

Tendo em vista que o método utilizado foi adaptado para placas de microtitulação, fez-se necessário realizar sua validação. A validação do método foi realizada de acordo com as recomendações da resolução RDC 899, da ANVISA (BRASIL, 2003). Os ensaios de validação foram realizados com a rutina e com um extrato padronizado de *Hancornia speciosa* Gomes, que contém rutina (PEREIRA, 2012).

As amostras foram preparadas através da dissolução de 1,0 mg de rutina em 5 mL de metanol; 1 mL dessa solução foi transferido para balão volumétrico de 10 mL, sendo aferido o volume com metanol. Para a solução de *Hancornia speciosa*, transferiu-se 1 mg do extrato seco para balão volumétrico de 50 mL, aferindo-se o volume com metanol.

A seletividade do método foi avaliada a partir da análise de varredura de solução da amostra, no ultravioleta/visível, no comprimento de onda de 200 a 600 nm, antes e após a adição da solução de DPPH, sendo então comparados os máximos de absorção. A seletividade do método foi avaliada pela presença de bandas de absorção em 516 nm, comprimento de onda utilizado para a leitura no ensaio.

A linearidade do método foi avaliada a partir da construção de duas curvas analíticas, em dois dias diferentes, utilizando seis concentrações distintas de rutina. Essas curvas foram traçadas relacionando-se as diferentes concentrações de rutina nas soluções da amostra (0,86, 1,78, 3,37, 7,14, 10,70 e 14,28 µg/mL) com as respectivas leituras de absorvâncias, conforme

a equação descrita no item 4.7.1. Mediante análise de covariância, comprovou-se a ausência de diferença estatística entre as curvas analíticas obtidas. A equação da reta de melhor ajuste para as curvas construídas nos dois dias foi calculada.

A exatidão foi determinada através do ensaio de adição de padrão, onde 90 µL de soluções de rutina, nas concentrações de 0,71, 3,55 e 7,88 µg/mL, foram adicionados a 10 µL do extrato de *H. speciosa* na concentração 1,71 µg/mL, em triplicata.

A precisão intradia foi determinada a partir da avaliação, em triplicata, de três soluções com diferentes concentrações de rutina, sendo uma alta, uma média e uma baixa em relação à curva analítica traçada na linearidade (3,57; 7,14; e 14,28 µg/mL). As médias de porcentagem de sequestro de radicais livres do DPPH e os desvios padrão relativos foram calculados. Já a precisão interdias obedeceu ao mesmo procedimento, porém essa análise foi realizada em dois dias distintos, com analistas diferentes, e o desvio padrão relativo para cada concentração foi calculado considerando as seis determinações.

Para calcular o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação inferior (LQ), foram utilizadas as equações descritas na legislação vigente para validação de métodos analíticos (BRASIL, 2003). Essas equações consideram os parâmetros das curvas analíticas e da curva média determinadas na avaliação da linearidade, e estão descritas a seguir.

$$LD = \frac{DPa \times 3,3}{IC}$$

$$LQI = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

Sendo: LD, limite de detecção; LQI, limite de quantificação inferior; DPa, desvio padrão do intercepto do eixo Y das curvas analíticas construídas contendo no mínimo cinco concentrações de rutina; IC, inclinação da curva analítica.

A robustez foi avaliada a partir da comparação da absorbância obtida na avaliação de amostras de rutina (concentrações de 3,57; 7,14; e 14,28 µg/mL) submetidas a tempos distintos de incubação (28 e 32 minutos) após a adição da solução de DPPH, e comparação com a condição nominal (tempo de incubação de 30 minutos). As análises foram realizadas em triplicata.

4.8 - Avaliação *in vitro* da atividade dos extratos vegetais sobre a produção de TNF- α

A potencial atividade anti-inflamatória dos extratos obtidos foi inicialmente avaliada *in vitro*, quanto à inibição da produção de TNF- α em cultura de células THP-1 estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS). Os ensaios foram executados no laboratório de Fitoquímica da FAFAR pela doutoranda.

4.8.1 Protocolo experimental

Células THP-1 (células de leucemia monocítica humana aguda, ATCC TIB-202) foram cultivadas em garrafas de cultivo contendo meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab). Após a contagem das células em câmara de Neubauer, foram transferidos 100 μ L de suspensão celular na densidade de 1×10^5 células para poços de uma microplaca. A placa foi incubada a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂, por aproximadamente 12 a 16 horas. Foram adicionados, então, 100 μ L de solução das amostras em meio de cultura (500, 250 e 125 μ g/mL) e 100 μ L de meio de cultura. As placas foram incubadas a 37 °C por 3 horas e, após o período de incubação, foram adicionados 10 μ L da solução de LPS (Sigma) na concentração de 1 μ g/mL. A placa foi então vedada e incubada a 37 °C por 18 horas. Após incubação, a placa de cultivo foi centrifugada (1.800 g, durante 5 minutos, a 16 °C) e o sobrenadante foi retirado para quantificação de TNF- α por ELISA, conforme protocolo descrito a seguir, e o pellet celular foi utilizado para avaliação da viabilidade celular.

4.8.2 Quantificação de TNF- α por ELISA

O kit de ELISA para determinação de TNF- α humano foi obtido da R&D Systems (DY210 DuoSet) e utilizado de acordo com o procedimento descrito pelo fabricante. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 μ L/poço de uma solução de anticorpo de captura (anticorpo de camundongo anti-TNF humano), na concentração de 4,0 μ g/mL em PBS. Essa solução permaneceu em contato com a placa durante 18 h, a 4 °C. Na sequência, as placas foram lavadas (4 vezes) com tampão de lavagem (PBS/Tween 0,1%) em um lavador de placas automático. Logo após, foram adicionados 200 μ L/poço da solução de bloqueio contendo 1% de albumina de soro bovino em PBS. O tempo de bloqueio foi de 3 horas. Em seguida, foram adicionados o padrão de TNF- α (1000 a 31,25 pg/mL) e as amostras (100 μ L do sobrenadante/poço). Após 18 horas de incubação a 4 °C, as placas foram lavadas e a elas foram adicionados 100 μ L de uma solução de anticorpo de detecção biotilado (anticorpo de cabra anti-TNF humano) na concentração de 250 ng/mL, seguida de incubação durante uma hora. Transcorrido este período e após lavagem, foi adicionada à placa uma solução contendo

estreptavidina ligada à peroxidase (R&D system). Após 20 a 30 min, a placa foi novamente lavada e então foi adicionado o tampão substrato contendo *o*-fenilenodiamina (OPD, Sigma) e peróxido de hidrogênio (Merck). A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico 1 mol/L. O produto de oxidação do OPD foi detectado por colorimetria em um leitor de placas de ELISA no comprimento de onda de 450 nm.

4.8.3 Avaliação da viabilidade celular

Após centrifugação da placa, conforme descrito no protocolo experimental, o meio de cultura foi removido da mesma e foram adicionados 28 µL de uma solução de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difeniltetrazólio] na concentração de 2 mg/mL em PBS. A placa foi incubada por 1 hora e 30 minutos a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após o período de incubação, foram adicionados 130 µL de DMSO, em cada cavidade para dissolver os cristais de formazana formados. Em seguida, a placa foi agitada, durante 15 minutos, em agitador automático a 184 g. A densidade foi medida em λ 492 nm em leitor de microplacas. Foi realizado controle de toxicidade do solvente empregado na dissolução das amostras. A viabilidade celular foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\left(\frac{A - B}{C - B} \right) \times 100$$

onde A, B e C são a leitura em λ 492 nm das cavidades nas quais estão presentes células tratadas com amostras (A), branco (B) e células tratadas com o diluente das amostras (C), respectivamente.

4.8.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste *t* de Student não-pareado. Resultados foram considerados significativamente distintos quando $p < 0,05$.

4.9 Atividade anti-inflamatória em modelos animais

4.9.1 Inflamação aguda induzida por LPS

As frações orgânica e aquosa de *C. lineatifolia*, *S. adstringens* e *T. glabrescens* foram avaliadas em modelo de inflamação aguda induzida por LPS na articulação fêmur-tibial de camundongos. Foram utilizados camundongos Swiss, fêmeas, entre 7 e 8 semanas de idade. Os animais foram fornecidos pelo biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Imunofarmacologia, ICB, UFMG, pela

doutoranda, pela doutoranda Daianne Boff e pela Dra. Elaine Patrícia Cunha Azevedo, sob a orientação dos professores Dr. Flávio Almeida Amaral e Dr. Mauro Martins Teixeira. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG conforme protocolo número 83/2015.

Os camundongos (n=6) foram tratados com as frações em suspensão aquosa contendo 0,5% de CMC nas doses 10, 100 e 1000 mg/kg, por gavagem. Após 60 minutos, os animais foram anestesiados com solução de ketamina e xilasina em PBS (1:0,5:3). Após a anestesia, a região da articulação fêmur-tibial foi depilada e injetou-se na cavidade articular do joelho 10 µL de solução de LPS preparada em PBS (10 µg/mL), correspondendo a 100 ng de LPS por cavidade articular. Os animais do grupo controle receberam 10 µL de PBS. A resposta inflamatória foi avaliada 12 horas após o estímulo.

4.9.2 Modelo de Artrite Induzida por Antígeno - AIA

A fração orgânica (SAO), a fração enriquecida em polifenóis (SAO2) e a 4'-*O*-metilgalocatequina (SAO1) obtidos de *S. adstringens*, foram avaliadas em modelo *in vivo* de AIA. Foram utilizados camundongos C57 machos, com 8 semanas de idade. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UFMG. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Imunofarmacologia, ICB, UFMG, pela doutoranda e pelo doutorando Thiago Henrique Caldeira de Oliveira, sob orientação dos professores Dr. Flávio Almeida Amaral e Dr. Mauro Martins Teixeira. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG conforme protocolo número 83/2015.

Os camundongos (n=6) foram imunizados através de injeção intradérmica de uma emulsão contendo 100 µL de volumes iguais de PBS e adjuvante completo de Freund (CFA), na qual foram dissolvidos 500 µg de albumina bovina metilada (mBSA). No 14º dia após a imunização com mBSA/CFA, os animais foram tratados com as frações em suspensão aquosa contendo 0,5% de CMC, nas doses 10, 50 e 100 mg/kg (SAO e SAO2) ou 5, 10 e 20 mg/kg (SAO1), por gavagem. Após 60 minutos, os animais foram anestesiados com solução de ketamina e xilasina em PBS (1:0,5:3). Após a anestesia, os animais foram desafiados com mBSA (10 µg/cavidade) através de injeção intra-articular na articulação fêmur-tibial. Os animais do grupo controle não receberam nenhum estímulo inflamatório. A resposta inflamatória foi avaliada 24 horas após o estímulo.

4.9.3 Contagem total e diferencial de leucócitos

Para a avaliação do acúmulo de células, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, e a cavidade articular (fêmur-tibial) foi exposta. Foi realizada uma dupla lavagem dessa cavidade utilizando 5 µL de albumina de soro bovino (BSA) a 3% de cada vez. Ao lavado (10 µL) foi adicionado um volume de 90 µL de solução de BSA a 3%, sendo o volume final 100 µL. A uma alíquota de 20 µL desse lavado articular adicionou-se 20µL de líquido de Turck e procedeu-se, então, à contagem total de células em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio ótico e contador manual. O número total de células foi utilizado para o cálculo do percentual de neutrófilos e células mononucleares em lâminas preparadas por citocentrifugação.

Para a contagem diferencial de células, foram preparadas lâminas por citocentrifugação dos 80 µL restantes do lavado articular (Cytospin 3). As lâminas foram coradas pela técnica da Hematoxilina & Eosina (HE). As células foram examinadas em microscópio ótico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 1.000×) usando os critérios morfológicos padrões para diferenciar os tipos celulares. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos $\times 10^4$ /cavidade articular.

4.9.4 Processamento do tecido do joelho

O tecido periarticular do joelho estimulado foi retirado com o auxílio de um bisturi para realização do ensaio de ELISA e determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO). O tecido foi pesado e em seguida adicionou-se a solução para extração de citocinas – PBS contendo antiproteases (0,1 mM PMSF, 0,1 nM benzetonium clorídrico, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% Tween 20, sendo o volume dessa solução ajustado de acordo com a massa do tecido (1mL da solução para cada 100 mg de tecido). O material foi homogeneizado e centrifugado (9184 g, 10 minutos, 4 °C). O sobrenadante foi retirado para o ensaio de ELISA e o pellet para o ensaio de MPO.

4.9.5 Determinação de TNF- α e CXCL-1 por ELISA

Os kits de ELISA de camundongo para determinação de TNF- α e do ligante 1 da quimiocina C-X-C (CXCL-1) foram obtidos da R&D Systems (DuoSet) e utilizados de acordo com os procedimentos previamente descritos pelo fabricante. A concentração de TNF- α foi avaliada no sobrenadante do tecido periarticular diluído 1:3 em PBS:BSA a 1%. O protocolo experimental está descrito no item 4.9.2.

4.9.6 Avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO)

Para avaliar o acúmulo de neutrófilos no tecido periarticular do joelho, foi utilizado o método de quantificação da atividade de MPO descrito por Coelho et al. (2008). Em resumo, o componente residual (pellet) foi ressuspensionado em tampão 1 (pH 4,7) (NaCl 0,1M; NaPO₄ 0,02 M; NaEDTA 0,015M), submetido à homogeneização e centrifugação (9184 g, 10 minutos). O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspensionado em 1,5 mL de solução gelada de NaCl a 0,2% e 1,5 mL de solução gelada de NaCl a 1,6% contendo 5% de glicose para cada 100 mg de tecido. Realizou-se nova centrifugação a 9184 g por 10 minutos. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em tampão 2 (pH 5,4) (NaPO₄ 0,05 M; brometo de hexadeciltrimetilamônio-HETAB 0,5% m/v) e re-homogeneizado por 30 segundos. As amostras foram congeladas e descongeladas seguidamente (3 vezes) em nitrogênio líquido, submetidas novamente a centrifugação (9184 g, 15 minutos) e o sobrenadante foi coletado para o ensaio de MPO. As amostras do tecido periarticular foram diluídas três vezes antes do ensaio.

Em seguida, as amostras foram adicionadas à placa (25 µL/poço). Adicionou-se, então, tetrametilbenzidina (TMB; 25 µL/poço) 1,6 mM e incubou-se à 37°C por 5 minutos. Em seguida adicionou-se peróxido de hidrogênio a 0,002% (100 µL/poço) e a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 1 M (50 µL/poço). A atividade da MPO das amostras foi determinada por colorimetria em leitor de ELISA, em λ 450 nm. Os resultados foram expressos como número total de neutrófilos (Unidades Relativas) a partir da comparação da absorbância obtida do sobrenadante do tecido com neutrófilos do pulmão de camundongos processados da mesma maneira.

4.9.7 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média (EPM) de seis animais por grupo. Os dados foram avaliados por meio de análise de variância simples (ANOVA), seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK), que realiza a comparação de todos os grupos entre si. Diferenças entre os grupos avaliados foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4.10 Investigação da liberação de TNF- α *in vivo*

Para a investigação da liberação de TNF- α *in vivo*, inicialmente, foram realizados experimentos com a redução do tempo entre a injeção de LPS no joelho e a eutanásia dos animais, de 12h para 6h.

Em seguida, um procedimento similar foi realizado para tentar detectar o papel da produção/liberação de TNF- α no efeito anti-inflamatório exibido por *S. adstringens*. Os animais (n=6) receberam o tratamento (SAO 100 mg/kg ou o veículo, solução aquosa de CMC 0,5% p/v). A inflamação da cavidade articular foi induzida como descrito acima (item 4.9.1). A quantificação de TNF- α por ELISA (item 4.9.5) foi realizada diretamente no lavado do joelho (alíquota de 25 μ L), e o tecido periarticular foi processado para análise por PCR. Os experimentos de PCR foram realizados no Laboratório de Biologia de Micro-organismos, ICB, UFMG, pela doutoranda e pela doutoranda Ana Carolina Fialho Dias, sob a orientação da professora Dra. Danielle da Glória de Souza.

O ensaio de PCR quantitativa foi realizado conforme descrito por Livak & Schmittgen (2001). O RNA foi isolado do tecido periarticular usando o reagente Trizol, conforme protocolo descrito pelo fabricante. O RNA total foi ressuscitado em água tratada com dietilpírocarbonato (DEPC) e estocado a -70 °C. O preparo do cDNA foi realizado usando 1 μ g de RNA e o kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase, da Invitrogen, Life technologies, de acordo com as recomendações do fabricante. Para a realização de PCR quantitativa foi utilizado 1 μ L do cDNA (diluído 1:10), primers específicos para os genes de interesse e o reagente Power SYBR Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems). A reação e a detecção da amplificação foram realizadas no Sistema 7500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystems). A expressão relativa dos genes analisados foi determinada através do método $\Delta\Delta$ Ct, e os dados para cada amostra foram normalizados para o gene constitutivo gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e expresso como alteração da fita comparado com o controle, como descrito por Livak & Schmittgen (2001). Os seguintes pares de primers foram usados: para GAPDH 5'- ACG GCC GCA TCT TCT TGT GCA -3'(sense) e 5'- CGG CCA AAT CCG TTC ACA CCG A -3'(anti-sense); para IL-1 β 5'- CTA CAG GCT CCG AGA TGA ACA AC -3'(sense) e 5'- TCC ATT GAG GTG GAG AGC TTT C -3'(anti-sense).

4.11 Avaliação da atividade anti-inflamatória em modelo *in vivo* de colite ulcerativa

A fração enriquecida em polifenóis obtida de *S. adstringens*, SAO2, foi selecionada para avaliação *in vivo* da atividade anti-inflamatória em modelo de colite ulcerativa induzida por TNBS em camundongos. Foram utilizados camundongos Balb/C, fêmeas, entre 7 e 8 semanas de idade. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UFMG. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Imunofarmacologia, ICB, UFMG, pela doutoranda e pela doutoranda Ana Leticia Malheiros da Silveira, sob a orientação do

professor Dr. Mauro Martins Teixeira. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG conforme protocolo número 83/2015.

A indução da colite ulcerativa foi realizada pelo método descrito por Wirtz et al. (2007). Os animais (n=6) foram submetidos a jejum por 12h e anestesiados com isofurano. Em seguida, foram administrados, através de injeção intracolônica, 100 uL de uma solução de 0,5 mg de 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em etanol:PBS 1:1. A injeção foi lenta e os animais foram mantidos de cabeça para baixo por no mínimo 2 minutos após a instilação da solução. Os animais do grupo controle receberam a injeção intracolônica de PBS, através do mesmo procedimento.

Os tratamentos (SAO2, 50 mg/kg, prednisolona, 4 mg/kg, ou o veículo, solução aquosa de CMC a 0,5%) foram administrados por gavagem 1h antes e 12, 24, 36, 48 e 60 h depois da indução da doença, e, após 72h da instilação da solução de TNBS, foram eutanasiados.

4.11.1 Avaliação da graduação clínica

O escore clínico foi determinado de acordo com o método descrito por Wu et al. (2011), com modificações. Durante os dias de tratamento, os animais foram avaliados diariamente quanto à perda de peso e a consistência das fezes. As fezes foram pontuadas com notas de 1 a 4, conforme descrição a seguir: normais (0), semi-sólidas (1), pastosas (2), cremosas (3) ou líquidas (4).

4.11.2 Avaliação do cólon

O cólon dos animais foi retirado, pesado e medido. Foi realizada a análise macroscópica e parte do cólon foi processada conforme descrito acima (item 4.9.4) e submetida aos ensaios para determinação da atividade de MPO (item 4.9.6), e de peroxidase eosinofílica (EPO).

A análise macroscópica do cólon foi realizada de acordo com o método proposto por Hoffmann et al. (2001), com adaptações. Foi realizada uma pontuação do aspecto do cólon, de 0 a 3, considerando a presença de eritema, edema e úlceras, proximais e distais. A pontuação atribuída foi a seguinte:

- 0: sem evidências de inflamação, ausência de hiperemia e edema;
- 1: presença apenas de eritema;
- 2: presença de eritema e edema;

- 3: presença de eritema, edema e úlceras.

4.11.3 Avaliação da atividade de peroxidase eosinofílica (EPO)

Para avaliar a extensão da infiltração de eosinófilos no cólon, foi utilizado o método de quantificação da atividade de EPO, como descrito por Vieira et al. (2009).

Brevemente, o componente residual (pellet) foi ressuspendido em tampão 1 (pH 4,7) (NaCl 0,1M; NaPO₄ 0,02 M; NaEDTA 0,015M), submetido à homogeneização e centrifugação (9184 g, 10 minutos). O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspendido em 1,5 mL de NaCl 0,2% gelado e 1,5 mL de NaCl 1,6% com glicose 5% gelada para cada 100 mg de tecido. Realizou-se nova centrifugação a 9184 g por 10 minutos. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em tampão 2 (pH 5,4) (NaPO₄ 0,05 M; brometo de hexadeciltrimetilamônio-HETAB 0,5% p/v) e re-homogeneizado por 30 segundos. As amostras foram congeladas e descongeladas seguidamente (3 vezes) em nitrogênio líquido, submetidas novamente a centrifugação (9184 g, 15 minutos) e o sobrenadante foi coletado para o ensaio de EPO. As amostras do tecido periarticular foram diluídas três vezes antes do ensaio.

Em seguida, as amostras foram adicionadas à placa (25 µL/poço). Adicionou-se, então, *o*-fenilenediamina (25 µL/poço) 1,5 mM e Tris-HCl 0,075 mM (25 µL/poço, pH 8,0) incubou-se a 37°C por 5 minutos. Em seguida adicionou-se peróxido de hidrogênio a 0,002% (100 µL/poço) e a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 1 M (50 µL/poço). A atividade da EPO das amostras foi determinada por colorimetria em leitor de ELISA, em λ 492 nm.

4.12 Estudo fitoquímico de *Stryphnodendron adstringens*

A fração orgânica proveniente da partição líquido-líquido de *S. adstringens* (SAO) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica-gel. Para tanto, preparou-se uma suspensão de 100 g de sílica-gel em 150 mL de acetato de etila, a qual foi transferida para uma coluna de vidro (60 × 2,6 cm d.i). Porções de 2 g de SAO foram solubilizadas em 10 mL de acetato de etila, seguindo-se a incorporação em 5 g de sílica-gel com auxílio de grau e pistilo até a completa evaporação do solvente. Essa mistura foi incorporada à coluna de sílica-gel. Procedeu-se à eluição com os solventes descritos na Tabela 4, recolhendo-se frações de 100 mL. Foram obtidas dez frações, que foram reunidas segundo semelhanças de seus perfis cromatográficos por CCD e CLAE-DAD em sete grupos. O fracionamento foi realizado com quatro porções de 2 g de SAO, resultando nas massas descritas na Tabela 4.

Tabela 4 – Fracionamento da fração orgânica do extrato etanólico de *S. adstringens* (SAO) em coluna de sílica-gel.

Fração	Eluente	Massa (mg)	Rendimento (%)
SAO1	Acetato de etila	86	1,1
SAO2	Acetato de etila	594	7,4
SAO3	Acetato de etila	216	2,7
SAO4	Acetato de etila:metanol 1:1	5126	64,1
SAO5	Acetato de etila:metanol 1:1	144	1,8
SAO6	Metanol	128	1,6
SAO7	Metanol:água 1:1	580	7,3

A subfração SAO2, proveniente de fracionamento da fração orgânica de *S. adstringens* em sílica-gel, foi recromatografada em coluna de sílica gel. Para tanto, preparou-se uma suspensão de 10 g de sílica gel em 150 mL de hexano, a qual foi transferida para uma coluna de vidro (24 × 2,6 cm d.i). Uma porção (200 mg) de SAO2 foi solubilizada em 5 mL de hexano, seguindo-se a incorporação em 1 g de sílica-gel com o auxílio de um gral com pistilo até a completa evaporação do solvente. Essa mistura foi incorporada à coluna de sílica-gel. Procedeu-se a eluição com solventes de polaridade crescentes, recolhendo-se frações de 100 mL. Foram obtidas seis frações, que foram reunidas em quatro grupos, após as análises por CCD e CLAE-DAD (Tabela 5).

Tabela 5 – Refracionamento da subfração SAO-2 em coluna de sílica gel.

Fração	Eluente	Massa (mg)	Rendimento (%)
SAO2a	Hexano/acetato de etila 75:25	7	3,5
SAO2b	Hexano/acetato de etila 65:35	11	5,5
SAO2c	Hexano/acetato de etila 50:50	34	17
SAO2d	Hexano/acetato de etila 30:70	47	23,5
SAO2e	Acetato de etila	31	15,5
SAO2f	Acetato de etila/methanol 50:50	18	9

4.13 Elucidação estrutural de SAO2b

A fração SAO2b foi caracterizada pelas técnicas de espectroscopia na região do ultravioleta (CLAE-DAD), espectroscopia na região do infravermelho, espectrometria de massas (CLUE-EM) e espectrometria de RMN.

4.13.1 Caracterização por IV

Os espectros no infravermelho foram obtidos em aparelho Spectrum One, Perkin-Elmer com sistema ATR (Laboratório de Química Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, UFMG), pela Me. Raquel Geralda Isidório.

4.13.2 Caracterização por UPLC-MS

A caracterização da fração SAO2b por UPLC-MS foi realizada conforme descrito no item 4.6.4.

4.13.3 Caracterização por RMN

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos em aparelhos Bruker Avance DPX-200 e Bruker Avance DRX-400 do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução – LAREMAR, do Departamento de Química, ICEX, UFMG, pela Me. Raquel Geralda Isidório. Como referência interna foi utilizado o CD_3OD , solvente da amostra. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm. Para processar os espectros utilizaram-se os programas BRUKER TOPSPIN 2.1 e 3.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão serão apresentados na forma de capítulos, exibidos adiante.

No primeiro capítulo, serão abordados os experimentos *in vitro*.

Em sequência, o segundo capítulo abordará os experimentos *in vivo*.

Finalmente, o terceiro capítulo abordará os estudos fitoquímicos

CAPÍTULO I

Avaliação da atividade Antioxidante e de inibição da liberação de TNF- α *in vitro*

I.1 Avaliação dos extratos e frações na liberação de TNF- α *in vitro*

Foram avaliados dezenove extratos etanólicos brutos, oriundos de diferentes partes anatômicas de treze espécies vegetais, quanto à inibição da produção de TNF- α por células THP-1 estimuladas com LPS. Os extratos foram inicialmente ensaiados na concentração de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sendo também avaliados na cultura celular não estimulada com LPS, com o intuito de determinar possíveis características pró-inflamatórias. Na triagem realizada, foram considerados ativos os extratos que apresentaram inibição superior a 40% da produção de TNF- α por células THP-1 estimuladas com LPS, de maneira concentração-dependente.

Paralelamente, a viabilidade celular desses extratos foi avaliada pelo método do MTT, a fim de descartar extratos citotóxicos, que promoveriam inibição da produção de TNF- α por morte celular.

Neste caso, foram considerados não tóxicos os extratos que apresentaram viabilidade celular superior a 90%. O método colorimétrico do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] é baseado na redução do composto por desidrogenases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Formam-se cristais de coloração púrpura, que são solubilizados e posteriormente analisados por espectofotometria no UV/visível. Assim, quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT e menor o valor de absorbância espectofotométrica (MOSMANN, 1983).

Dentre as amostras avaliadas, os extratos etanólicos de folhas e galhos de *Cordia guazumaefolia* e de galhos de *Mikania glomerata* apresentaram baixa viabilidade celular, em decorrência de toxicidade para as células. Portanto, esses extratos foram descartados do estudo.

Os resultados de inibição da produção de TNF- α para os extratos etanólicos avaliados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Inibição da produção de TNF- α induzida por extratos etanólicos de plantas brasileiras.

Espécie vegetal	Parte anatômica	Produção de TNF-α* (pg/mL \pm dp)	Inibição da produção de TNF-α* (% \pm d.p.)
Célula + DMSO	-	11,72 a 42,06	Controle
Célula + LPS	-	1523,96 a 3694,08	Controle
Dexametasona	-	147,5 \pm 5,3	86,7 \pm 1,1
<i>Bowdichia virgilioides</i>	Folhas	111,53 \pm 2,2	- 6,9 \pm 4,7
	Galhos	1113,06 \pm 17,0	- 21,1 \pm 6,4
<i>Campomanesia lineatifolia</i>	Folhas	61,50 \pm 0,7	41,1 \pm 3,1
	Galhos	685,78 \pm 2,7	- 78,2 \pm 5,1
<i>Cordia guazumaefolia</i>	Folhas	ND	ND
	Galhos	ND	ND
<i>Hymenaea coubaril</i>	Folhas	52,24 \pm 8,4	98,6 \pm 1,5
<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	Folhas	55,73 \pm 6,7	98,5 \pm 0,6
<i>Licania tomentosa</i>	Folhas	127,29 \pm 3,2	- 21,9 \pm 4,6
<i>Mikania glomerata</i>	Folhas	806,43 \pm 21,1	12,3 \pm 12,3
	Galhos	ND	ND
<i>Paepalanthus bromelioides</i>	Folhas	524,94 \pm 11,4	- 36,4 \pm 15,9
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	Cascas	58,82 \pm 2,0	42,1 \pm 3,1
<i>Stryphnodendron obovatum</i>	Cascas	397,78 \pm 11,9	54,2 \pm 3,0
<i>Terminalia glabrescens</i>	Folhas	60,34 \pm 3,2	42,2 \pm 5,3
	Galhos	405,30 \pm 9,3	- 5,3 \pm 11,3
<i>Vernonia phosphorea</i>	Folhas	140,08 \pm 5,6	96,2 \pm 1,1
<i>Vitex polygama</i>	Folhas	520,68 \pm 13,0	- 35,3 \pm 6,3
	Galhos	1440,96 \pm 20,2	- 56,7 \pm 6,6

*Extratos ensaiados na concentração de 250 μ g/mL.

ND: não determinado (viabilidade celular <90%)

I.1.1 – Extratos que inibiram a produção de TNF- α

Na triagem inicial realizada, os extratos etanólicos de folhas de *Campomanesia lineatifolia*, *Hymenaea coubaril*, *Hymenaea stigonocarpa*, *Terminalia glabrescens* e *Vernonia phosphorea* e de cascas de *Stryphnodendron adstringens* e *Stryphnodendron obovatum*

inibiram a produção de TNF- α de maneira significativa (>40% de inibição). Assim, esses extratos foram avaliados no ensaio em concentrações distintas, a fim de investigar se a inibição é concentração-dependente (Figura 1). Os valores de porcentagem de inibição são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Inibição da produção de TNF- α induzida por extratos etanólicos de plantas brasileiras em três concentrações.

Espécie vegetal	Parte anatômica	Inibição de TNF- α (% \pm d.p.)		
		250 μ g/mL	125 μ g/mL	62,5 μ g/mL
<i>Campomanesia lineatifolia</i>	Folhas	41,1 \pm 3,1	4,9 \pm 0,3	-15,6 \pm 0,6
<i>Hymenaea coubaril</i>	Folhas	98,6 \pm 1,5	28,6 \pm 9,7	98,6 \pm 23,7
<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	Folhas	98,5 \pm 0,6	35,5 \pm 6,0	-11,9 \pm 0,9
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	Cascas	42,1 \pm 3,1	19,3 \pm 0,5	-9,4 \pm 0,8
<i>Stryphnodendron obovatum</i>	Cascas	54,2 \pm 3,0	31,6 \pm 1,8	4,4 \pm 0,1
<i>Terminalia glabrescens</i>	Folhas	42,2 \pm 5,3	26,5 \pm 3,0	-0,9 \pm 0,1
<i>Vernonia phosphorea</i>	Folhas	96,2 \pm 1,1	13,8 \pm 0,7	-23,6 \pm 0,4

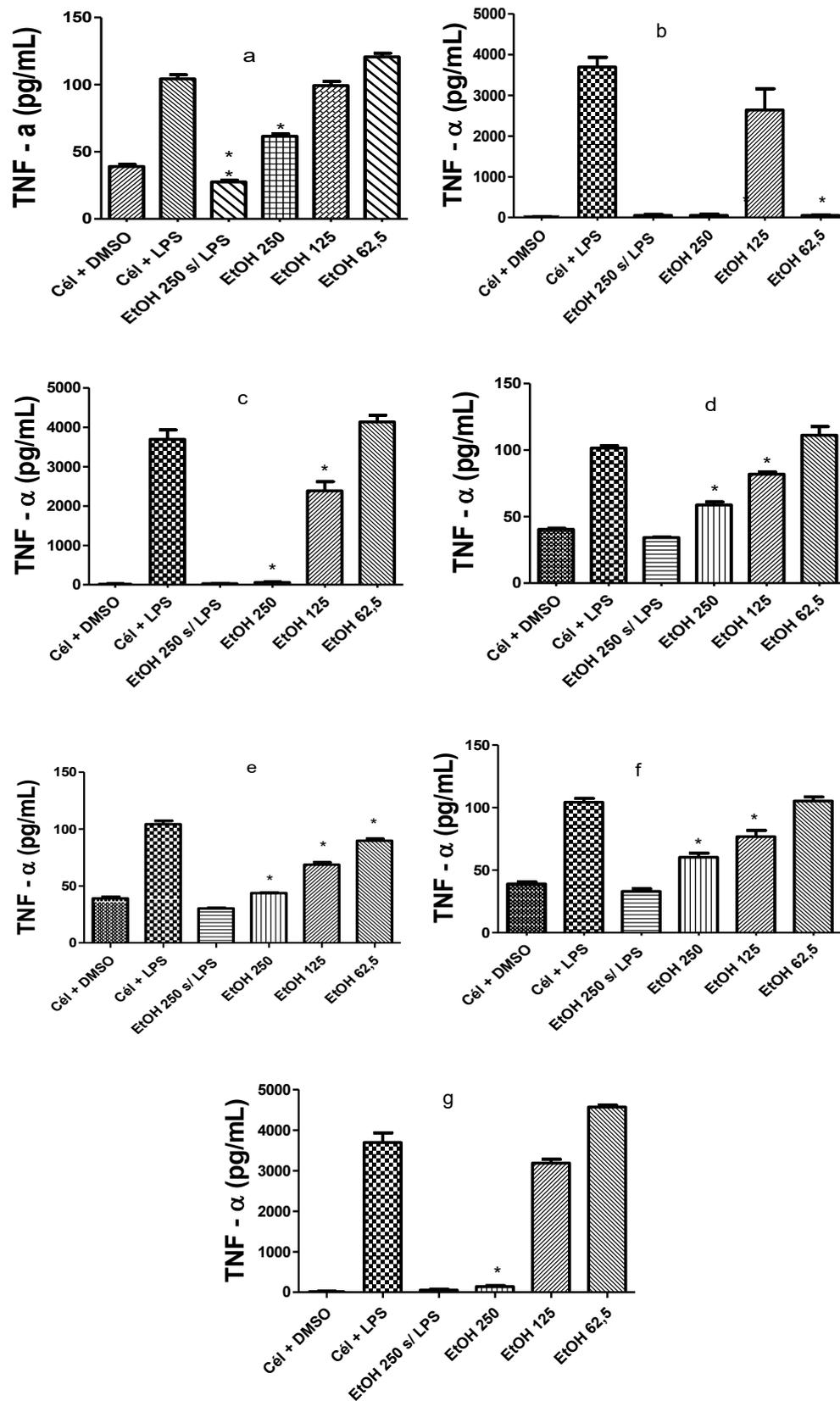


Figura 1 – Atividade de extratos etanólicos vegetais sobre a produção de TNF- α em células THP-1 estimuladas por LPS, avaliados nas concentrações 62,5, 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$ (a) *C. lineatifolia* (folhas), (b) *H. coubaril*, (c) *H. stigonocarpa*, (d) *S. adstringens*, (e) *S. obovatum*, (f) *T. glabrescens* (folhas), (g) *V. phosphorea*. As médias foram analisadas por ANOVA ONE WAY, seguida de comparações múltiplas de Newman-Keuls ($p < 0,05$), comparadas ao controle célula + LPS. * $p < 0,05$ em comparação com as células tratadas com LPS.

As espécies vegetais ativas, *C. lineatifolia*, *H. coubaril*, *H. stigonocarpa*, *S. adstringens*, *S. obovatum*, *T. glabrescens* e *V. phosphorea*, foram selecionadas para estudo por possuírem relatos de uso etnofarmacológico para o tratamento de doenças de natureza inflamatória.

Existem poucos relatos na literatura de triagens de espécies vegetais para a inibição da produção de TNF- α . Wangchuk e colaboradores (2013) avaliaram o efeito de extratos de sete espécies utilizadas na medicina tradicional do Butão sobre a produção de TNF- α em células THP-1 estimuladas por LPS: *Aconitum laciniatum*, *Ajania nubigena*, *Codonopsis bhutanica*, *Corydalis crispera*, *Corydalis dubia*, *Meconopsis simplicifolia* e *Pleurospermum amabile*. Foram avaliados extratos em hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, ensaiados na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Os autores observaram que a inibição máxima de TNF- α para os extratos metanólicos das espécies *A. laciniatum*, *A. nubigena*, *C. dubia* e *M. simplicifolia* foi de 6, 36, 62 e 8%, respectivamente, e que as espécies *C. bhutanica*, *C. crispera* e *P. amabile* aumentaram a produção de TNF- α em 17,2 e 8%, respectivamente.

Segundo os critérios estabelecidos no presente trabalho, que considerou ativas as espécies que apresentaram inibição da produção de TNF- α maior que 40%, apenas uma das sete espécies avaliadas por Wangchuk e colaboradores (2013) foi ativa, porcentagem muito inferior à obtida no presente trabalho, no qual foram consideradas ativas sete, dentre treze espécies avaliadas. Esses resultados sugerem que o critério etnofarmacológico utilizado na escolha das espécies vegetais para estudo foi eficiente para a seleção de espécies com atividade anti-inflamatória.

Entretanto, é importante ressaltar que as concentrações ensaiadas no presente trabalho foram superiores às avaliadas por Wangchuk et al. (2013), o que poderia explicar as menores taxas de inibição encontradas. Cabe destacar, no entanto, que as espécies aqui avaliadas não apresentaram citotoxicidade na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$, concentração superior àquela usada no trabalho citado. Além disso, os ensaios no presente trabalho foram realizados com três concentrações distintas, o que permitiu identificar um efeito inibitório concentração-dependente para quatro das sete espécies identificadas como ativas na triagem inicial.

A comparação dos resultados obtidos com outros trabalhos já relatados é complexa, uma vez que as concentrações avaliadas variam muito, além das grandes diferenças na composição química dos extratos avaliados em cada estudo. Extratos metanólicos das folhas de *Byrsonima crassa*, *Mouriri pusa* e *Davilla elliptica* e das cascas de *Rhamnidium elaeocarpum* foram avaliados quanto à capacidade da inibição da produção de TNF- α em macrófagos de camundongo estimulados por LPS, sendo que apenas o extrato de *R.*

elaecarpum (2 mg/mL) inibiu em 48,86% a produção da citocina (NISHIJIMA, 2010). No estudo citado, nota-se que a porcentagem de inibição foi semelhante à obtida no presente trabalho para as plantas mais promissoras, *C. lineatifolia*, *S. adstringens*, *S. obovatum* e *T. glabrescens*, mas a concentração avaliada foi oito vezes maior. Já o extrato hexânico de raízes de *Zosima absinthifolia* inibiu em 90% a produção de TNF- α em células THP-1 estimuladas por LPS, quando avaliado na concentração de 50 μ g/mL (BAHADIR et al., 2011), ou seja, a concentração utilizada foi cinco vezes menor e a atividade foi o dobro das espécies consideradas mais promissoras nesse estudo.

Dentre os extratos ativos, aqueles de *C. lineatifolia* (folhas) e *T. glabrescens* (folhas), *S. adstringens* e *S. obovatum* inibiram a produção de TNF- α pelas células THP-1 estimuladas por LPS de modo concentração-dependente. Esses extratos foram selecionados para avaliação em modelo de inflamação aguda (item II.1).

Para a espécie *C. lineatifolia*, não há relatos de uso tradicional para o tratamento de doenças inflamatórias; essa espécie foi selecionada para esse estudo devido ao uso tradicional para tratar diarreia (CORREA, 1984; CARRARA, 1997). Também não foram encontrados estudos relacionados à atividade anti-inflamatória da espécie. Por outro lado, outra espécie do gênero, *Campomanesia velutina*, foi avaliada quanto à inibição da produção de TNF- α em macrófagos estimulados com LPS/IFN e em modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos. O extrato etanólico, quando avaliado nas concentrações de 20, 40, 80, 160 e 320 μ g/mL, não inibiu a produção de TNF- α , mas reduziu a formação do edema de pata, nas doses de 100 e 300 mg/kg (MICHEL et al., 2013).

Espécies do gênero *Stryphndendron* têm uso popular relatado para a cicatrização de feridas e para o tratamento de leucorreia e diarreia (SANTOS e MELO, 2004). Não foram encontrados relatos de uso tradicional para o tratamento de inflamação. *S. adstringens* já teve sua atividade anti-inflamatória comprovada em modelos de edema de pata induzido por carragenina e dextrana, pleurisia e artrite em ratos (LIMA et al., 1998). Entretanto, não há relatos da atuação dessas espécies sobre a produção de TNF- α .

Para a espécie *T. glabrescens*, não há relatos de uso popular como anti-inflamatório, nem estudos de sua atividade inflamatória em modelos *in vivo*, mas para a espécie *Terminalia chebula*, já foi descrita a atividade anti-artrítica, com redução da inflamação e dos níveis séricos de TNF- α (NAIR et al., 2010; SEO et al., 2012). Um estudo recente de nosso grupo de pesquisa demonstrou que o extrato etanólico de folhas da espécie, nas concentrações de 62,5, 125 e 250 μ g/mL, inibiu a liberação de TNF- α por células THP-1 estimuladas por LPS (GUSMANN et al., 2015).

Cabe também ressaltar que extratos etanólicos das folhas de *C. lineatifolia* e *T. glabrescens*, promoveram a diminuição da liberação de TNF- α por células THP-1 estimuladas por LPS; entretanto, os extratos etanólicos dos galhos dessas plantas não demonstraram essa atividade. Provavelmente, a composição química é distinta em diferentes partes anatômicas das espécies.

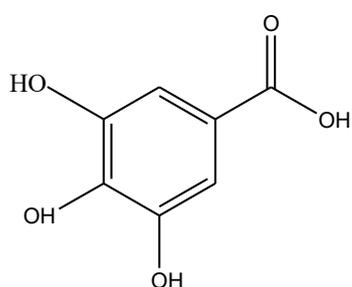
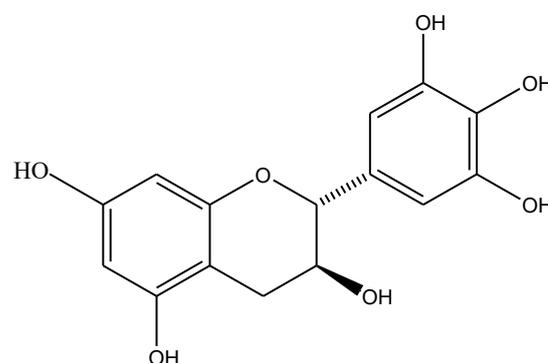
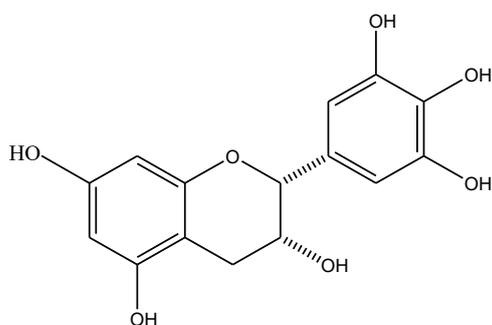
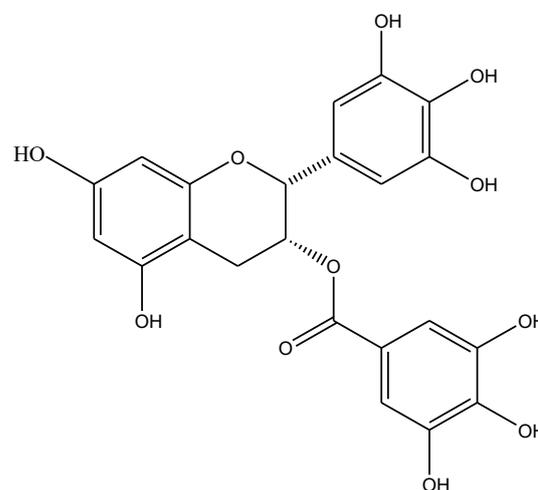
Os extratos etanólicos de folhas de *H. coubaril*, *H. stigonocarpa* e *V. phosphorea* também inibiram significativamente a produção de TNF- α ; entretanto, *H. coubaril* e *V. phosphorea* não apresentaram comportamento concentração-dependente. O efeito anti-inflamatório de *H. stigonocarpa* em modelo de colite ulcerativa foi recentemente relatado (ORSI et al., 2014). Por isso, essas espécies não foram selecionadas para estudos posteriores no presente trabalho.

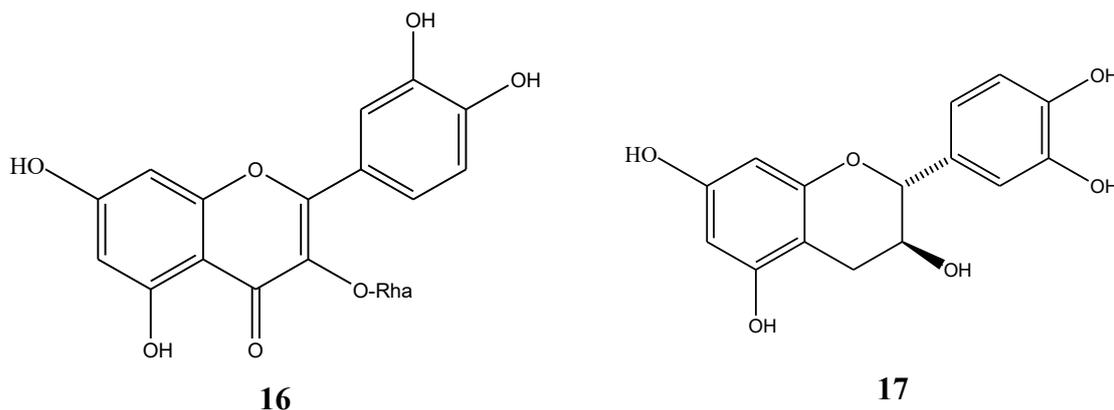
V. phosphorea é popularmente utilizada para tratar asma, hemorroidas, diabetes, reumatismo e como diurético, expectorante e cicatrizante de feridas (CORRÊA, 1962), não havendo relatos de usos tradicionais para o tratamento de inflamação. Para a espécie, não há relatos de atividade anti-inflamatória, em modelos *in vitro* ou *in vivo*; entretanto, outras espécies do gênero apresentaram resultados promissores. A aplicação tópica do extrato etanólico de *Vernonia scorpioides* (1 mg por orelha) reduziu o edema em modelo agudo de edema de orelha induzido por acetato de tetradecanoilforbol (inibição de 80 \pm 5%, DI₅₀ 0,24 mg/orelha) e por ácido araquidônico (inibição de 65 \pm 5%, DI₅₀ 0,68 mg/orelha), além da redução na atividade de mieloperoxidase (MPO) induzida pelo acetato de tetradecanoilforbol em 77 \pm 8%. No modelo crônico de edema de orelha induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton, também houve redução no edema (31 \pm 2%) e na atividade de MPO (25 \pm 10%) (RAUH et al., 2011).

Espécies do gênero *Hymenaea* são tradicionalmente utilizadas como anti-inflamatório (MENDES e CARLINI, 2007). Para a espécie *H. stigonocarpa* já foi relatado o efeito protetor do extrato metanólico das cascas (100, 200 e 400 μ g/mL) e da polpa dos frutos (10% da dieta) no dano induzido por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) sobre a mucosa do cólon. Observou-se diminuição da extensão da lesão e da diarreia, além de inibição da atividade da mieloperoxidase e fosfatase alcalina, bem como redução do teor de malondialdeído e neutralização da depleção de glutathiona colônica induzida pelo processo inflamatório (ORSI et al., 2014). Não foram encontrados estudos de atividade anti-inflamatória, *in vitro* ou *in vivo*, para as folhas de *H. stigonocarpa*, nem para a espécie *H. coubaril*.

Para as espécies ativas no ensaio *in vitro* de inibição da produção de TNF- α , *C. lineatifolia*, *S. adstringens* e *T. glabrescens*, foi feita uma revisão na literatura sobre a

composição química das mesmas, bem como foram realizadas análises cromatográficas de CLAE-DAD visando identificar constituintes químicos (item III.1.2). Verificou-se a presença de compostos fenólicos, como ácido gálico (**13**), galocatequina (**14**), epigalocatequina (**15**) e galato de epigalocatequina (**5**) em frações de *S. adstringens* e *S. obovatum*, e de quercitrina (**16**) em *C. lineatifolia* e catequina (**17**) em *C. lineatifolia* e *T. glabrescens*. Análises cromatográficas também indicaram a ocorrência de substâncias polifenólicas não identificadas, com espectros no UV compatíveis com proantocianidinas já relatadas para as espécies (KAMYIA et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2013), além de *T. glabrescens* (item III.1.2).

**13****14****15****5**



A atividade anti-inflamatória de proantocianidinas e de outros compostos polifenólicos está amplamente descrita na literatura, incluindo seu efeito inibitório sobre citocinas pró-inflamatórias. Wu e colaboradores (2009) relataram a redução na produção de TNF- α por células THP-1 cultivadas com alta concentração de glicose e tratadas com flavonoides na concentração de 20 μ M. Catequina, galato de epigallocatequina, luteolina, quercetina e rutina reduziram a produção de TNF- α em 35, 67, 70, 55 e 70%, respectivamente, em comparação com as células não tratadas. Outro estudo demonstrou que o extrato aquoso de *Pistacia vera* L., bem como suas frações enriquecidas em proantocianidinas, inibiram a produção de TNF- α por macrófagos murinos RAW 264.7 de maneira concentração-dependente (GENTILE et al., 2011).

O ácido gálico é um ácido fenólico, poli-hidroxilado, amplamente encontrado em plantas de diversas famílias. É um precursor na via biossintética de obtenção de outros metabólitos, como os taninos hidrolisáveis. Estudos têm apontado diversas atividades biológicas para essa substância, dentre elas a atividade antioxidante e anti-inflamatória (KUPPAN et al., 2010; LO et al., 2011; KIM et al., 2011). Assim, é factível supor a participação do ácido gálico na inibição da produção de TNF- α *in vitro* e na atividade anti-inflamatória do extrato de *S. adstringens*, que contém essa substância.

Segundo Wang e colaboradores (2014), o galato de epigallocatequina (50 μ g/mL) inibiu a produção de TNF- α por células THP-1 estimuladas por LPS e pelo complexo anti- β 2GPI/ β 2GPI. Essa substância também demonstrou, *in vivo*, capacidade de eliminar radicais livres (RICE-EVAN et al., 1996; NAKAGAWA et al., 2002). Outro estudo demonstrou que suplementação com 0,1% de galato de epigallocatequina foi capaz de reduzir a expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, dentre elas TNF- α e IL-1, em leucócitos periféricos de ratos (UCHIYAMA et al., 2013).

Portanto, a atividade anti-inflamatória *in vitro* desempenhada pelas espécies avaliadas nesse estudo parece ser atribuída a compostos polifenólicos, como ácido gálico e

epigallocatequina, no caso de *S. adstringens*, e quercitrina e outros flavonoides, no caso de *C. lineatifolia* e *T. glabrescens*.

I.1.2 Extratos que não inibiram a produção de TNF- α

Apesar de não comprometer a viabilidade celular, os extratos etanólicos das folhas e galhos de *B. virgilioides* e *V. polygama*, dos galhos de *C. lineatifolia* e *T. glabrescens*, e das folhas de *L. tomentosa*, *M. glomerata* e *P. bromelioides* não inibiram significativamente a produção de TNF- α pelas células THP-1 (Tabela 6). Portanto, estes extratos não foram selecionados para estudos posteriores.

As espécies *M. glomerata* e *P. bromelioides* não são tradicionalmente utilizadas para tratar processos inflamatórios, nem possuem relatos de estudos de atividade anti-inflamatória, *in vitro* ou *in vivo*. Ambas foram selecionadas para triagem com base em critério quimiossistemático, uma vez que metabólitos descritos em sua composição química apresentaram atividade em modelos de colite ulcerativa. Assim, o ácido caurenico, isolado de *M. glomerata* (VENEZIANI, 1997), reduziu o infiltrado de células inflamatórias e o edema da mucosa intestinal em modelo de colite ulcerativa induzida por ácido acético quando administrado em ratos na dose 100 mg/kg, por via oral e retal (PAIVA et al., 2003). Já paepalantina, isolada de *P. bromelioides*, (VILEGAS et al., 1990; VILEGAS et al., 1998; COELHO et al., 2000), atenuou o dano do cólon quando avaliada nas doses de 5 e 10 mg/kg em modelo de colite ulcerativa induzida por TNBS em ratos (DI STASI et al., 2004).

V. polygama não apresenta uso popular como anti-inflamatório. Para essa espécie, não foram encontrados relatos de estudos de atividade anti-inflamatória, em modelos *in vitro* ou *in vivo*. No presente trabalho, os extratos etanólicos das folhas e do caule da espécie exibiram características pró-inflamatórias, com aumento da produção de TNF- α . *V. polygama* foi selecionada para triagem porque outra espécie do gênero *Vitex*, *V. negundo*, foi ativa em modelo de colite ulcerativa (ZAWARE et al., 2011).

Cascas e sementes de *B. virgilioides* são utilizadas tradicionalmente para o tratamento de diarreia e inflamações do útero (BERG, 1993; POTT e POTT, 1994; SANGUINETTI, 1989 *apud* BARROS et al., 2010). O extrato etanólico das cascas do caule, administrado nas doses de 100 e 1000 mg/kg por via oral, reduziu o edema de pata induzido por carragenina, suprimiu a migração de leucócitos em modelo de pleurisia induzida por carragenina em ratos, e inibiu o aumento da permeabilidade vascular induzida pela administração de ácido acético intraperitoneal (BARROS et al., 2010). Em outro estudo, extratos aquosos de cascas e folhas

da espécie reduziram o edema de pata e a migração de neutrófilos para a cavidade intraperitoneal, quando administrados nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg (THOMAZZI et al., 2010). Não foram encontrados relatos de ensaios da espécie sobre a produção de TNF- α . No presente estudo, os extratos de folhas e cascas não reduziram a produção da citocina, sendo que, em algumas doses, ocorreu aumento da produção, sugerindo características pró-inflamatórias desses extratos (Tabela 6).

A espécie *L. tomentosa*, e outras espécies do gênero, não têm uso tradicional para o tratamento de processos inflamatórios, nem há relatos de estudos sobre a atividade da espécie sobre a produção de TNF- α . Entretanto, já foi descrito, para o decocto das folhas, atividade analgésica e anti-inflamatória nos ensaios de inibição de contorções abdominais induzidas por ácido acético e difusão do corante azul de Evans para a cavidade intraperitoneal (CASTILHO, 2001).

Sete dentre os dezenove extratos avaliados aumentaram a produção de TNF- α pelas células THP-1 estimuladas por LPS; entretanto, quando avaliados na maior concentração, 250 $\mu\text{g/mL}$, esses extratos não exerceram esse efeito nas células não estimuladas por LPS (grupo controle). Por isso, não é possível afirmar que tais extratos exerçam atividade pró-inflamatória sobre as células THP-1. É provável que o aumento na concentração de TNF- α seja resultante de uma ação sinérgica entre componentes desses extratos e o LPS.

I.1.3 Atividade anti-TNF- α de extratos de polaridades variadas das plantas ativas

Os extratos etanólicos de folhas de *C. lineatifolia* e *T. glabrescens* e de cascas de *S. adstringens* e *S. obovatum* inibiram significativamente a produção de TNF- α por células THP-1 estimuladas por LPS, de forma concentração-dependente (item I.1.1). A fim de identificar a faixa de polaridade dos constituintes bioativos, foram preparados extratos em diclorometano, acetato de etila e água dos materiais vegetais, os quais foram avaliados no modelo de inibição da produção de TNF- α .

Todas as células tratadas com os extratos avaliados apresentaram viabilidade celular superior a 90% no ensaio do MTT, sugerindo que não houve toxicidade significativa frente às células THP-1 (dados não mostrados).

Os extratos em diclorometano, acetato de etila e água de folhas de *C. lineatifolia* não apresentaram atividade anti-TNF- α nas concentrações avaliadas (Figura 2), ao contrário do extrato etanólico, ativo na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 1). Portanto, o extrato etanólico foi selecionado para avaliação *in vivo* (item II.1).

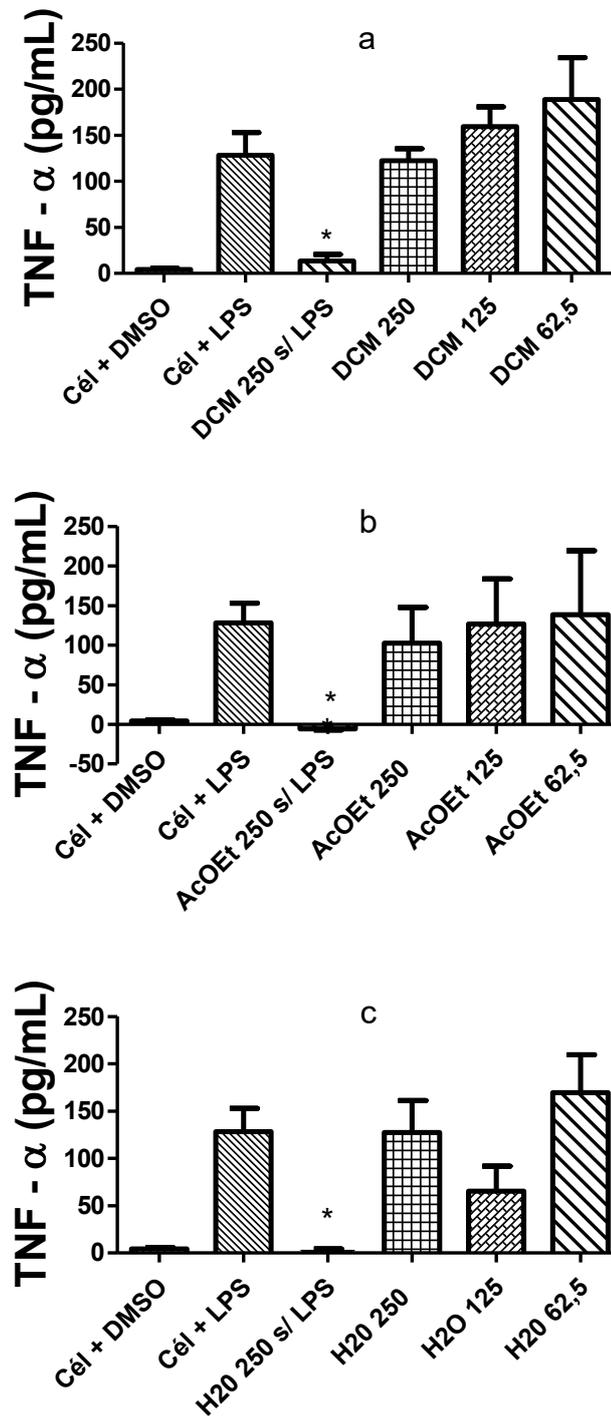


Figura 2 - Atividade de extratos de *C. lineatifolia* (folhas) sobre a produção de TNF- α em células THP-1 estimuladas por LPS, avaliados nas concentrações 62,5, 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$. Extratos em diclorometano (DCM) (a), em acetato de etila (AcOEt) (b) e aquoso (H_2O) (c). As médias foram analisadas por ANOVA ONE WAY, seguida de comparações múltiplas de Newman-Keuls ($p < 0,05$), comparadas ao controle célula + LPS.

O extrato em diclorometano de cascas de *S. adstringens* não inibiu significativamente a produção de TNF- α *in vitro* (Figura 3). Já o extrato em acetato de etila foi ativo na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$, mas não apresentou comportamento concentração-dependente. Por sua vez, o extrato aquoso inibiu significativamente a produção da citocina nas concentrações de 250 e 125 $\mu\text{g/mL}$ ($95,4 \pm 4,6$ e $83,1 \pm 12,7\%$, respectivamente; Figura 3).

Os rendimentos em extrativos dos extratos etanólico e aquoso de cascas de *S. adstringens* não foram muito diferentes (item 4.4), nem a inibição da produção de TNF- α induzidas por eles (Figuras 1 e 3). Assim, o critério adotado para selecionar o extrato para os ensaios *in vivo* foi a complexidade química. O cromatograma em CLAE-DAD obtido para o extrato etanólico apresentou menor complexidade, portanto, este extrato foi selecionado para estudo.

Observou-se, para as cascas de *S. adstringens*, que a atividade inibitória de TNF- α se concentra nos extratos de maior polaridade. Isso sugere que a atividade da espécie está relacionada às substâncias de maior polaridade, visto que o extrato em diclorometano foi inativo.

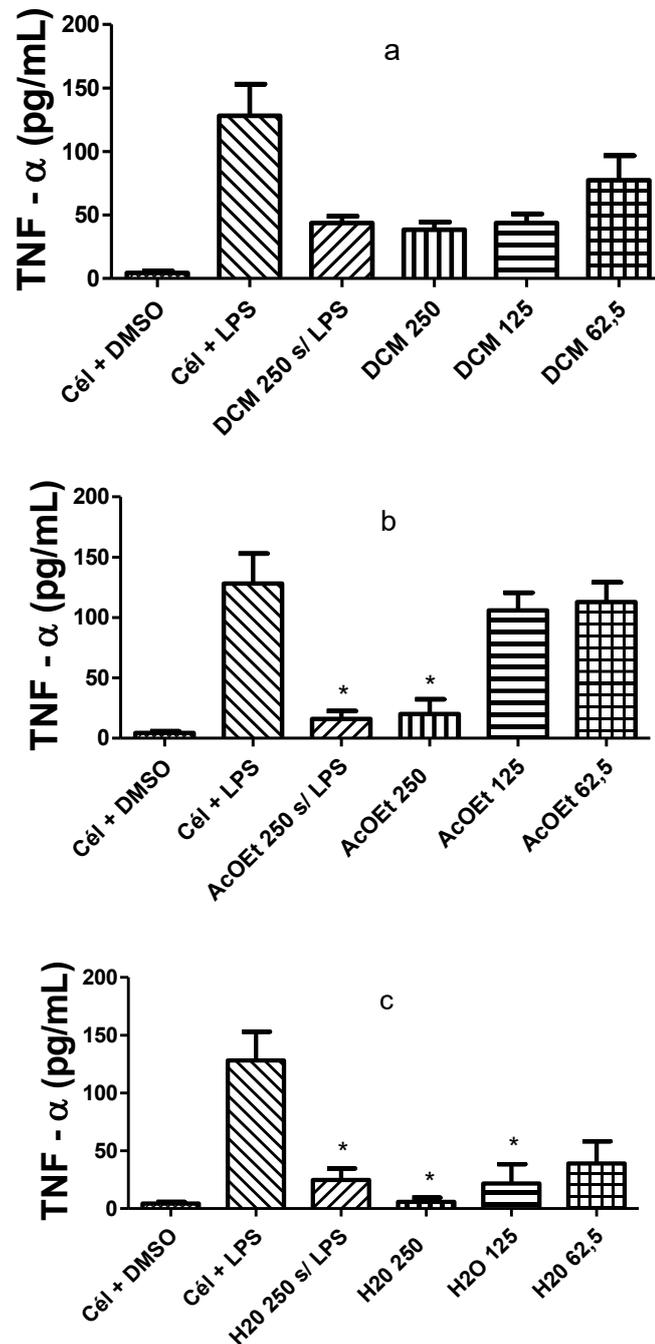


Figura 4 - Atividade de extratos de *S. adstringens* sobre a produção de TNF- α em células THP-1 estimuladas por LPS, avaliados nas concentrações 62,5, 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$. Extratos em diclorometano (DCM) (a), acetato de etila (AcOEt) (b) e aquoso (H_2O) (c). As médias foram analisadas por ANOVA ONE WAY, seguida de comparações múltiplas de Newman-Keuls ($p < 0,05$), comparadas ao controle célula + LPS.

Os extratos em diclorometano e acetato de etila de cascas de *S. obovatum* aumentaram significativamente a produção de TNF- α pelas células THP-1 estimuladas por LPS (Figura 4), ao contrário do extrato aquoso, ativo na maior concentração avaliada ($30,49 \pm 4,9\%$ na concentração 250 $\mu\text{g/mL}$).

Análises cromatográficas por CLAE-DAD indicaram similaridade na composição química dos extratos de *S. adstringens* e *S. obovatum* (dados não apresentados). Assim, considerando a baixa disponibilidade de massa de *S. obovatum*, a espécie *S. adstringens* foi selecionada para avaliação *in vivo*.

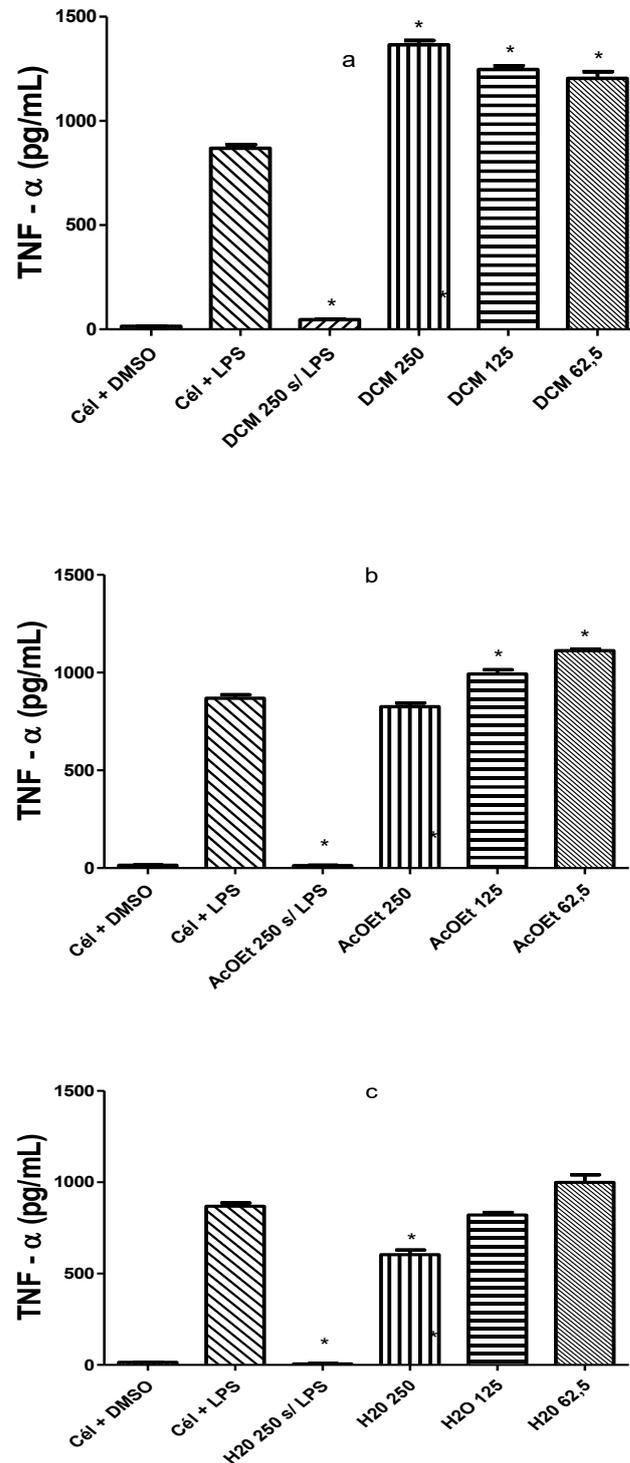


Figura 4 - Atividade de extratos de *S. obovatum* sobre a produção de TNF- α em células THP-1 estimuladas por LPS, avaliados nas concentrações 62,5, 125 e 250 μ g/mL. Extratos em diclorometano (DCM) (a), acetato de etila (AcOEt) (b) e água (H₂O) (c). As médias foram analisadas por ANOVA ONE WAY, seguida de comparações múltiplas de Newman-Keuls ($p < 0,05$), comparadas ao controle célula + LPS.

Os extratos em diclorometano e acetato de etila de folhas de *T. glabrescens* não inibiram a produção de TNF- α no modelo *in vitro* utilizado (Figura 5). Porém, observou-se inibição significativa para o extrato aquoso nas concentrações de 250 e 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($92,9 \pm 2,5\%$ e $57,2 \pm 11,4\%$, respectivamente).

Os rendimentos em extrativos dos extratos etanólico e aquoso de folhas de *T. glabrescens* foram próximos (item 4.4). Tendo em vista a menor complexidade química do extrato etanólico observada em análises por HPLC-DAD, este foi selecionado para estudos posteriores de avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo*.

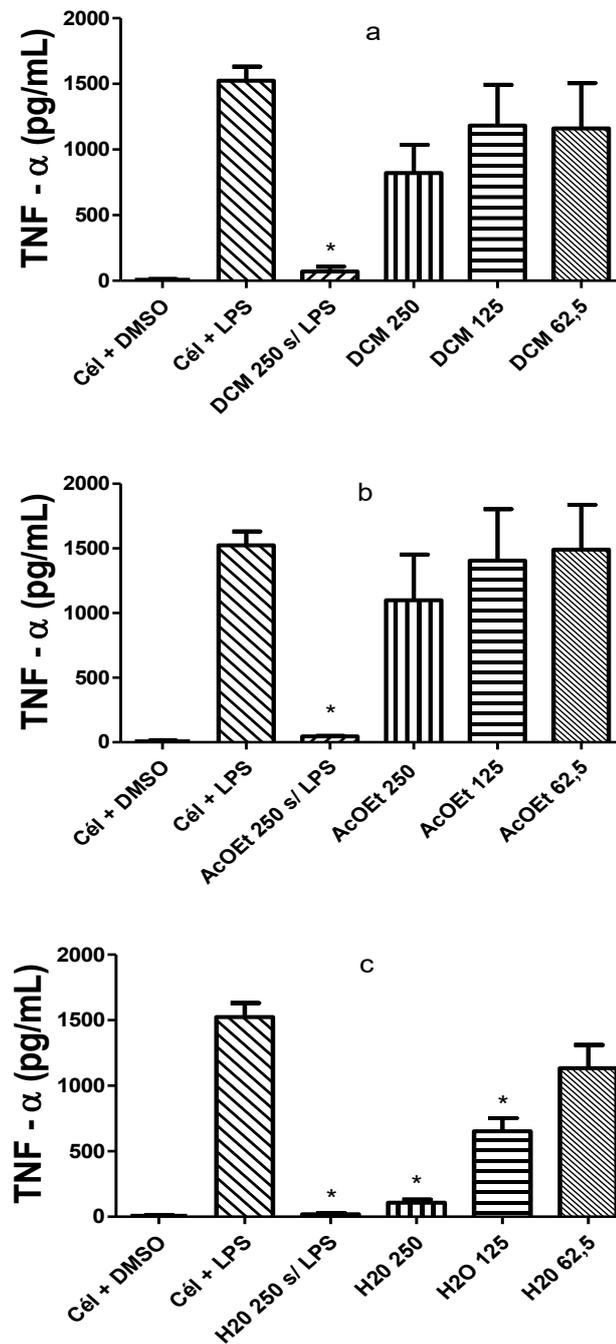


Figura 5 - Atividade de extratos de *T. glabrescens* (folhas) sobre a produção de TNF- α em células THP-1 estimuladas por LPS, avaliados nas concentrações 62,5, 125 e 250 μ g/mL. Extratos em diclorometano (a), acetato de etila (b) e aquoso (c). As médias foram analisadas por ANOVA ONE WAY, seguida de comparações múltiplas de Newman-Keuls ($p < 0,05$), comparadas ao controle célula + LPS.

No presente trabalho, foram avaliados extratos de diferentes polaridades das quatro espécies mais ativas na triagem inicial de inibição de TNF- α , observando-se uma maior atividade para os extratos etanólico e aquoso.

Já no estudo relatado por Wangchuk e colaboradores (2013), no qual foi avaliada a atividade inibitória de produção de TNF- α em células THP-1 estimuladas por LPS, induzida por extratos em hexano, diclorometano, clorofórmio e metanol de sete plantas medicinais do Butão, os extratos de baixa polaridade (diclorometânico e clorofórmico) mostraram-se mais ativos em cinco das sete plantas avaliadas. Por outro lado, alguns autores relataram atividade inibitória de TNF- α para extratos polares. Extratos metanólicos de folhas de *Byrsonima crassa*, *Mouriri pusa* e *Davilla elliptica* e de cascas de *Rhamnidium elaeocarpum* foram avaliados para inibição da produção de TNF- α em macrófagos de camundongo estimulados por LPS, sendo que apenas o extrato de *R. elaeocarpum* (2 mg/mL) inibiu a produção da citocina em 48,86% (NISHIJIMA, 2010). Extratos etanólicos de folhas de *Caryocar brasiliense*, *Casearia sylvestris*, *Coccoloba cereifera* e *Terminalia glabrescens* inibiram a produção de TNF- α por células THP-1 estimuladas por LPS, nas concentrações 62,5, 125 e 250 μ g/mL (GUSMAN et al., 2015).

Na sequência do trabalho, os extratos etanólicos de *C. lineatifolia*, *S. adstringens* e *T. glabrescens* foram avaliados em modelo de inflamação induzida por LPS na cavidade fêmur-tibial de camundongos (item II.1).

I.2 Ensaio do DPPH

A atividade sequestrante de radicais livres das espécies vegetais selecionadas para estudo foi avaliada através do ensaio do DPPH. O método baseia-se no contato da amostra, em solução, com os radicais livres gerados pelo DPPH, que possuem coloração roxa. De acordo com o potencial da amostra em sequestrar esses radicais livres da solução, a coloração roxa da mesma diminui até se esgotar, originando uma solução levemente amarelada, quando ocorre 100% de sequestro dos radicais. Dessa forma, é possível determinar qual concentração da amostra é capaz de sequestrar 50% dos radicais livres gerados pelo DPPH – sua CE₅₀.

Os radicais livres estão envolvidos em uma série de fenômenos oxidativos, além de sua participação em outros processos fisiológicos, como a inflamação (SAEED et al., 2005), por isso, a capacidade de uma amostra de sequestrar radicais livres é um indicativo de uma potencial atividade antioxidante e anti-inflamatória.

No presente trabalho, um método para determinar a atividade sequestrante de radicais livres do DPPH (FARIAS et al., 2013) foi adaptado para a microescala. As vantagens do

método em microescala são a redução do tempo de execução e o menor consumo de reagentes e amostras. Também é relevante que, nesse tipo de método, a geração de resíduos é consideravelmente menor, diminuindo assim o impacto ambiental (ALMEIDA et al., 2011).

Os parâmetros avaliados para validação do método desenvolvido foram linearidade, seletividade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação. A rutina, flavonoide isolado de várias espécies vegetais e que possui reconhecida atividade antioxidante, e um extrato padronizado de *Hancornia speciosa*, que contém rutina em sua composição (PEREIRA, 2012), foram utilizados para validação do método.

Para a rutina, foi obtida a CE_{50} de 7,76 $\mu\text{g/mL}$, e para o extrato de *H. tomentosa*, 6,58 $\mu\text{g/mL}$.

I.2.1 Seletividade

Foram registrados espectros no UV-Vis para a solução metanólica de rutina no intervalo de comprimentos de onda de 200 a 600 nm, com e sem a adição da solução de DPPH, para avaliar a seletividade do método. A leitura do ensaio foi feita em 516 nm. A comparação dos espectros de varredura da rutina obtidos antes e após a adição de DPPH indica que não há absorção significativa da amostra no comprimento de onda empregado para leitura, comprovando a seletividade do método (Figura 6).

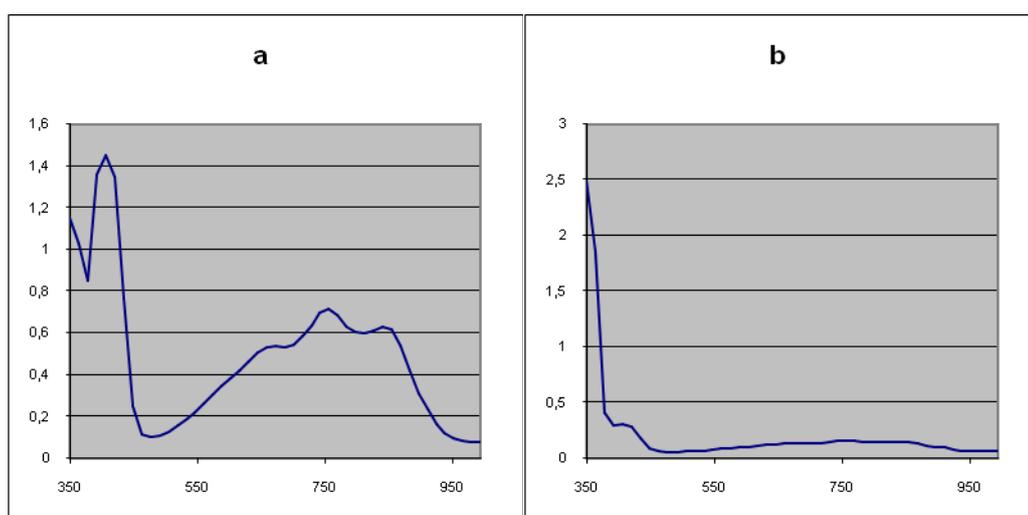


Figura 6 – Espectros de varredura no UV-Vis obtidos para o ensaio de seletividade do método de sequestro de radicais livres do DPPH, para a solução de rutina antes (a) e após (b) a adição da solução de DPPH.

1.2.2 Linearidade

A equação da reta de melhor ajuste para as curvas construídas nos dois dias foi calculada. As curvas analíticas foram construídas utilizando-se seis concentrações da rutina, em triplicata. Foram obtidas três curvas analíticas em dias distintos, que não apresentaram diferenças estatísticas quando submetidas à análise de covariância. A curva média dos três dias apresentou um coeficiente de determinação (r^2) de 0,993. Uma vez que o limite preconizado pela RDC 899 é acima de 0,99, o método foi considerado linear. A Tabela 8 apresenta os parâmetros estatísticos obtidos para a curva analítica.

Tabela 8 – Dados da regressão linear para as curvas analíticas da rutina, em três dias consecutivos de análise do método de sequestro de radicais livres do DPPH.

Parâmetros estatísticos	Rutina
Coefficiente de determinação (r^2)	0,993
Inclinação (a) \pm dp _a	5,714 \pm 0,230
Intercepto (b) \pm dp _b	-0,520 \pm 1,862
IC ^a 95% do intercepto	5,071 a 6,359
DPR (%)	0,94

DP: desvio padrão.

IC: intervalo de confiança.

A curva foi construída plotando-se a concentração de rutina na solução *versus* a atividade antioxidante, obtida a partir das absorbâncias observadas, usando a fórmula descrita no item 4.7.1 (Figura 7).

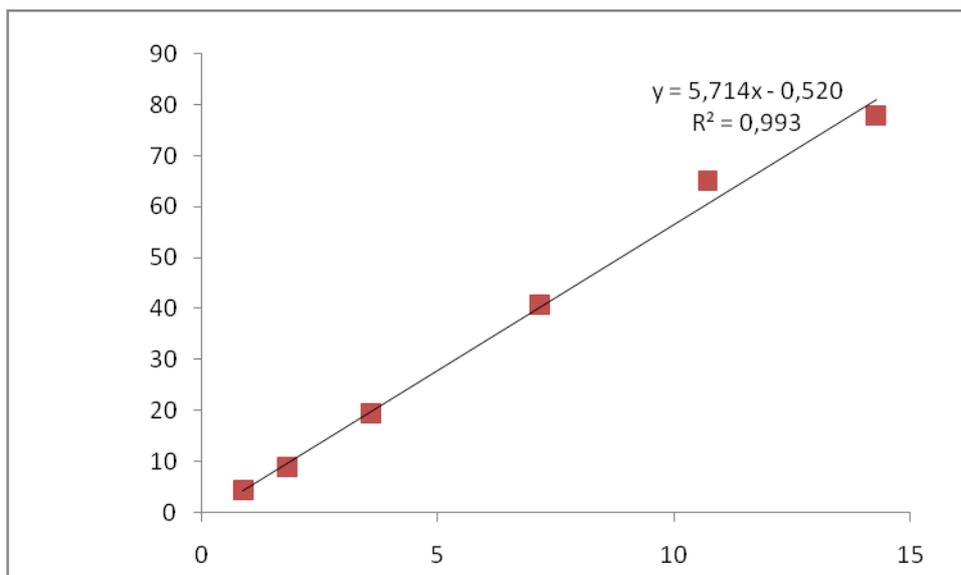


Figura 8 – Curva analítica média obtida na avaliação da linearidade do método de sequestro de radicais livres do DPPH, em comprimento de onda 516 nm, para a rotina.

1.2.3 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada em ensaio de adição de padrão, utilizando-se o extrato de *Hancornia speciosa*. Rutina foi adicionada em três níveis de concentração distintos da curva analítica: 0,71, 3,55 e 7,88 µg/mL. A atividade antioxidante (AAO) teórica foi calculada para cada uma das concentrações adicionadas através de regressão linear.

Os desvios obtidos da AAO experimental em relação à AAO teórica são apresentados na Tabela 9. Esses valores comprovam a exatidão do método de acordo com a legislação vigente para validação de métodos analíticos, com recuperação de 95 a 105% (BRASIL, 2003).

Tabela 9 - Resultados da avaliação da exatidão do método de sequestro de radicais livres do DPPH.

Concentração de extrato (µg/mL)	Concentração de rutina adicionada (µg/mL)	AAO teórica	AAO experimental	Recuperação (%)
1,71	0,71	6,08	6,07±0,24	99,83
1,71	3,55	31,38	31,72±1,32	101,08
1,71	7,88	69,96	70,73±2,20	101,10

I.2.4 Limite de detecção e limite de quantificação

O desvio padrão do intercepto e a inclinação da curva analítica média foram utilizados para o cálculo do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ) do método. O LD e o LQ obtidos para a rotina foram, respectivamente, 0,16 e 0,55 $\mu\text{g/mL}$.

I.2.5 Precisão

A precisão intradia foi avaliada através de três determinações em três diferentes concentrações de rutina, sendo uma concentração baixa, uma média e uma alta em relação à curva analítica. A CE_{50} da rutina foi de 7,76 $\mu\text{g/mL}$, então, foram empregadas as concentrações de 3,57; 7,14 e 14,28 $\mu\text{g/mL}$. Os valores de absorvância obtidos foram utilizados para o cálculo da porcentagem de sequestro de radicais livres pela amostra, em cada concentração, e seu respectivo desvio padrão relativo.

Já a precisão interdias foi avaliada a partir de três determinações das mesmas concentrações supracitadas, em dois dias diferentes e com analistas diferentes. Nesse caso, a porcentagem de sequestro de radicais livres pela amostra em cada concentração e seu respectivo desvio padrão relativo foram determinados com seis replicatas (três em cada dia), para cada concentração.

Os resultados obtidos nos ensaios de precisão estão exibidos na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultados da avaliação da precisão do método de sequestro de radicais livres do DPPH.

Precisão	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Média (% de atividade antioxidante)	DPR (%)
Intradia	3,57	29,80	3,63
	7,14	65,02	0,19
	14,28	92,51	0,94
Interdias	3,57	29,91	2,87
	7,14	67,49	1,20
	14,28	92,74	0,53

Os valores encontrados para os desvios padrão relativos, todos inferiores a 5%, indicam que o método possui precisão intradia e interdia adequadas, segundo os critérios da legislação vigente para a validação de métodos analíticos (BRASIL, 2003).

I.2.6 Robustez

O intervalo de tempo estabelecido no método para a reação da amostra com os radicais livres presentes em solução foi de 30 minutos (FARIAS et al., 2013). Para avaliar a robustez do método, foram realizadas leituras de três soluções de concentrações distintas (alta, média e baixa), em dois tempos distintos (28 e 32 minutos), mantendo-se inalteradas as demais condições do teste. Os resultados obtidos foram então comparados com a condição nominal do teste (tempo de 30 minutos). Os resultados obtidos nos ensaios de robustez estão exibidos na Tabela 11.

Tabela 11: Resultados da avaliação da robustez do método de sequestro de radicais livres do DPPH.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	28 minutos (% AAO)	30 minutos (% AAO)	32 minutos (% AAO)	Média (% AAO)	DPR (%)
3,57	30,80 \pm 1,58	30,51 \pm 1,75	29,71 \pm 2,36	30,34 \pm 0,57	1,86
7,14	62,91 \pm 0,64	62,78 \pm 0,78	62,58 \pm 1,07	62,76 \pm 0,17	0,26
14,28	92,75 \pm 0,40	92,66 \pm 0,54	92,69 \pm 0,54	92,70 \pm 0,05	0,05

Foram obtidos desvios-padrão relativos inferiores a 5% para as absorbâncias das amostras com diferentes tempos de reação, para cada concentração, comprovando a robustez do método.

Os resultados obtidos nos ensaios de validação analítica do método de sequestro de radicais livres do DPPH demonstram que o método desenvolvido é seletivo, linear, preciso, exato e robusto, além de apresentar um baixo limite de quantificação inferior, de extrema importância, uma vez que possibilita quantificar amostras com pequenas quantidades de analito. Assim, procedeu-se a avaliação dos extratos por esse método.

I.2.7 Avaliação do potencial sequestrante de radicais livres dos extratos

Os extratos etanólico, aquoso, em diclorometano e em acetato de etila das treze espécies vegetais selecionadas para estudo foram avaliados no ensaio do DPPH. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 12, como valores de CE_{50} .

Tabela 12 – Atividade antioxidante das espécies vegetais determinada no ensaio de sequestro de radicais livres utilizando o DPPH.

Espécie vegetal	Órgão vegetal	Solvente	CE ₅₀ ± d.p. (µg/mL)	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Solvente	CE ₅₀ ± d.p. (µg/mL)		
<i>Bowdichia virgilioides</i>	Folhas	DCM	117,9±2,28	<i>Bowdichia virgilioides</i>	Galhos	DCM	61,37±0,51		
		EtOAc	74,11±2,11			EtOAc	12,09±0,19		
		EtOH	5,67±0,11*			EtOH	4,47±0,15*		
		H ₂ O	3,98±0,17*			H ₂ O	9,11±0,19*		
<i>Campomanesia lineatifolia</i>	Folhas	DCM	28,83±0,38	<i>Campomanesia lineatifolia</i>	Galhos	DCM	77,87±1,72		
		EtOAc	15,01±0,18			EtOAc	24,20±1,11		
		EtOH	7,26±1,96*			EtOH	9,16±0,03*		
		H ₂ O	8,91±0,26*			H ₂ O	12,09±0,56		
<i>Cordia guazumaefolia</i>	Folhas	DCM	190,38±8,21	<i>Cordia guazumaefolia</i>	Galhos	DCM	229,98±2,34		
		EtOAc	173,31±3,98			EtOAc	130,33±4,10		
		EtOH	64,95±1,26			EtOH	28,97±1,34		
		H ₂ O	59,11±0,91			H ₂ O	38,42±1,04		
<i>Hymenaea coubaril</i>	Folhas	EtOH	27,10±0,52	<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	Folhas	EtOH	22,11±0,59		
<i>Licania tomentosa</i>	Folhas	DCM	129,42±4,61	<i>Mikania glomerata</i>	Galhos	DCM	>280		
		EtOAc	70,65±1,67			EtOAc	>280		
		EtOH	19,16±0,53			EtOH	>280		
		H ₂ O	14,54±0,57			H ₂ O	41,34±0,66		
<i>Mikania glomerata</i>	Folhas	DCM	>280	<i>Vernonia phosphorea</i>	Folhas	EtOH	8,14±0,16*		
		EtOAc	>280			<i>Stryphnodendron obovatum</i>	Cascas	DCM	36,80±0,85
		EtOH	68,15±3,16					EtOAc	5,50±0,03*
		H ₂ O	38,98±0,66					EtOH	3,04±0,10*
<i>Paepalanthus bromelioides</i>	Folhas	EtOH	57,72±2,83	<i>Terminalia glabrescens</i>	Galhos			H ₂ O	6,80±0,02*
		<i>Stryphnodendron adstringens</i>	Cascas			DCM	77,76±2,88	DCM	92,86±0,60
						EtOAc	3,27±0,15*	EtOAc	6,73±0,23*
						EtOH	3,89±0,02*	EtOH	4,95±0,18*
H ₂ O	7,12±0,37*			H ₂ O	7,50±0,14*				
<i>Terminalia glabrescens</i>	Folhas	DCM	140,26±3,77	<i>Vitex polygama</i>	Galhos	DCM	248,37±10,43		
		EtOAc	13,04±0,20			AcOEt	79,26±1,48		
		EtOH	3,62±0,04*			EtOH	19,77±0,69		
		H ₂ O	7,66±0,33*			H ₂ O	16,16±0,60		
<i>Vitex polygama</i>	Folhas	DCM	246,28±11,84	Rutina			8,58±0,23*		
		EtOAc	100,75±1,10						
		EtOH	9,77±0,15*						
		H ₂ O	8,72±0,13*						

No presente trabalho, foram consideradas ativas as espécies com CE_{50} menor ou igual a 10 $\mu\text{g/mL}$. A rotina foi utilizada como controle positivo do ensaio, pois essa substância possui reconhecida atividade antioxidante. A partir do critério estabelecido, foram considerados ativos 21 dos 76 extratos testados, dentre eles, os extratos etanólicos de folhas de *C. lineatifolia* e *T. glabrescens*, e de cascas de *S. adstringens*.

Em relação à polaridade, os extratos etanólicos e aquosos mostraram-se os mais ativos e, em alguns casos, também os extratos em acetato de etila. Isso provavelmente deve-se ao maior teor de polifenóis nos extratos aquoso e etanólico. Compostos dessa classe apresentam significativa atividade antioxidante por sequestro de radicais livres, devido à extensa conjugação eletrônica de sua estrutura molecular, auxiliando na estabilização molecular mesmo quando ela possuiu uma carga ou elétron desemparelhado (SAEED et al., 2005; KAPLAN et al., 2007; YAN et al., 2013).

Segundo Korbeck e colaboradores (2013), espécies reativas de oxigênio exercem um papel importante em processos inflamatórios e na transdução de sinais de algumas citocinas inflamatórias, como $IL-1\beta$ e $TNF-\alpha$. Uma vez que já é conhecida a participação dessas espécies em processos inflamatórios (por exemplo, atuando como mensageiros celulares, ativando sistemas enzimáticos, provocando a modificação oxidativa de biomoléculas ou a expressão de genes que codificam proteínas inflamatórias), esse pode ser um mecanismo adicional de atividade anti-inflamatória de espécies que possuam essa ação (SAEED et al., 2005; KAPLAN et al., 2007; CACHOFEIRO et al., 2009; SARAVANAN et al., 2013; ALESSANDRI et al., 2013).

Nos resultados obtidos, os extratos vegetais que foram ativos no modelo de inibição da produção de $TNF-\alpha$ pelas células THP-1 estimuladas por LPS (etanólico de folhas de *C. lineatifolia*, etanólico, aquoso e em acetato de etila de *S. adstringens*, etanólico e aquoso de *S. obovatum* e etanólico e aquoso de *T. glabrescens*) também foram ativos no modelo de sequestro de radicais livres do DPPH, de acordo com os critérios estabelecidos – CE_{50} inferior a 10 $\mu\text{g/mL}$ e inibição da produção de $TNF-\alpha$ superior a 40%, na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ (vide Tabelas 6 e 12).

A associação entre a atividade antioxidante e a inibição de $TNF-\alpha$ foi relada por outros autores. Lv e colaboradores (2013) avaliaram a atividade antioxidante e anti-inflamatória dos extratos etanólico e aquoso de *Ficus pandurata*. Segundo os autores, o extrato etanólico exibiu atividade sequestrante de radicais livres do DPPH, com CE_{50} de 118,4 $\mu\text{g/mL}$, além de reduzir o edema de pata induzido por cristais de urato monossódico em ratos e a produção de $TNF-\alpha$ e PGE2.

Para o extrato aquoso de cascas *Terminalia paniculata*, também foi descrito o efeito de sequestro de radicais livres simultâneo à capacidade de inibir a produção de TNF- α (TALWAR et al., 2013).

Em um estudo recente realizado em nosso grupo de pesquisa, Gusman e colaboradores (2015) relataram alta atividade antioxidante dos extratos etanólicos de três das 12 espécies vegetais avaliadas, *Paepalanthus bromelioides*, *Coccoloba cereifera* e *Caryocar brasiliensis*, sendo que os dois últimos extratos também foram eficientes em reduzir a produção de TNF- α por células THP-1 estimuladas por LPS.

Nos trabalhos supracitados, investigações fitoquímicas indicaram a ocorrência de polifenóis nos extratos avaliados, indicando que substâncias dessa classe devem contribuir para as atividades anti-inflamatória e antioxidante apresentadas pelas espécies.

CAPÍTULO II

Avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo*

II.1 Inflamação aguda induzida pela injeção intra-articular de LPS

A partir dos resultados obtidos nos experimentos *in vitro* de inibição de produção de TNF- α e de sequestro de radicais livres do DPPH, nos perfis químicos e na massa disponível, os extratos de *C. lineatifolia*, *S. adstringens* e *T. glabrescens* foram selecionados para avaliação *in vivo*, em modelo de inflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS) na articulação fêmur-tibial de camundongos.

O modelo de inflamação aguda induzida por LPS fornece informações relevantes para a avaliação de substâncias com potencial de atividade anti-artrite, já que é realizado na cavidade articular, local atingido nos pacientes com artrite reumatoide, e o mecanismo no qual a inflamação é induzida é bem estabelecido. O LPS é um dos principais constituintes da membrana celular da maioria das bactérias Gram negativas e é utilizado em diferentes modelos experimentais para induzir inflamação, dor, febre e sepse.

O LPS injetado na cavidade articular se liga aos receptores *toll-like* 4 (TLR4), promovendo aumento na transcrição de NF- κ B e, por consequência, aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (PALSSON-McDERMOTT & O'NEIL, 2004). Dessa forma, se as substâncias testadas forem capazes de inibir ou reduzir o processo inflamatório, é possível que o mecanismo de ação envolvido esteja relacionado ao bloqueio da via do NF- κ B, ou o bloqueio direto da citocina, sendo necessários ensaios moleculares para a determinação correta do mecanismo. De qualquer forma, uma atividade anti-inflamatória significativa das substâncias testadas estaria relacionada ao TNF- α . Por isso, esse modelo é adequado para avaliar potenciais inibidores dessa citocina.

Os três extratos etanólicos brutos mais promissores no ensaio *in vitro* de inibição da produção de TNF- α – *C. lineatifolia*, *S. adstringens* e *T. glabrescens* – foram submetidos à extração líquido-líquido, originando as frações orgânicas (CLO, SAO e TGO, respectivamente) e aquosas (CLA, SAA e TGA, respectivamente). O efeito dessas frações no modelo de inflamação aguda induzida por LPS foi avaliado a partir da contagem do número de células totais e diferenciais no infiltrado celular da cavidade articular e pela determinação dos níveis de MPO, CXCL1 e TNF- α no tecido periarticular do joelho.

O tratamento dos animais com a fração aquosa de *S. adstringens* (SAA) reduziu significativamente o acúmulo de leucócitos totais e de neutrófilos para a cavidade articular de maneira dose-dependente (Figura 8). Entretanto, não houve redução significativa da produção de CXCL-1 nem da atividade de MPO.

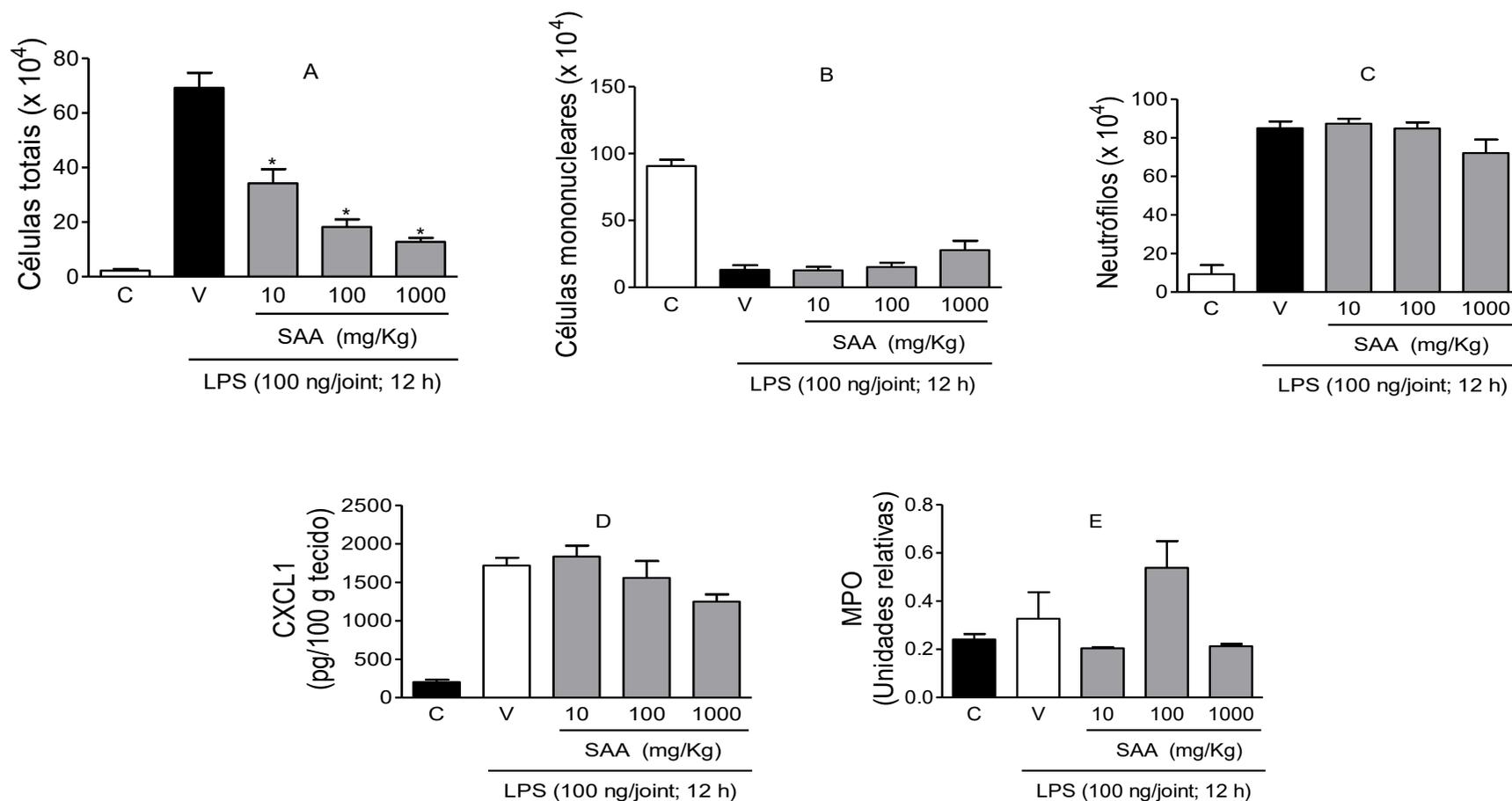


Figura 8 – Efeito induzido em animais tratados por gavagem com veículo ou com a fração aquosa de *S. adstringens* (SAA) no acúmulo de leucócitos totais (A), mononucleares (B) e neutrófilos (C) para a cavidade articular e na produção de CXCL1 (D) e MPO (E), após a administração de LPS (100 ng/cavidade). C: controle negativo (PBS); V: controle positivo (LPS). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (n=6 animais por grupo). (*): diferença significativa em relação ao veículo ($p < 0,05$, ANOVA com pós-teste de Student-Newman-Keuls).

O tratamento dos animais com a fração orgânica de *S. adstringens* (SAO) reduziu significativamente a migração de leucócitos totais e de neutrófilos para a cavidade articular de maneira dose-dependente (Figura 9). De maneira semelhante à SAA, também não se observou redução nos níveis de CXCL-1 e na atividade da MPO. Tendo em vista a redução significativa da migração celular promovida por SAO, essa fração foi selecionada para estudos adicionais.

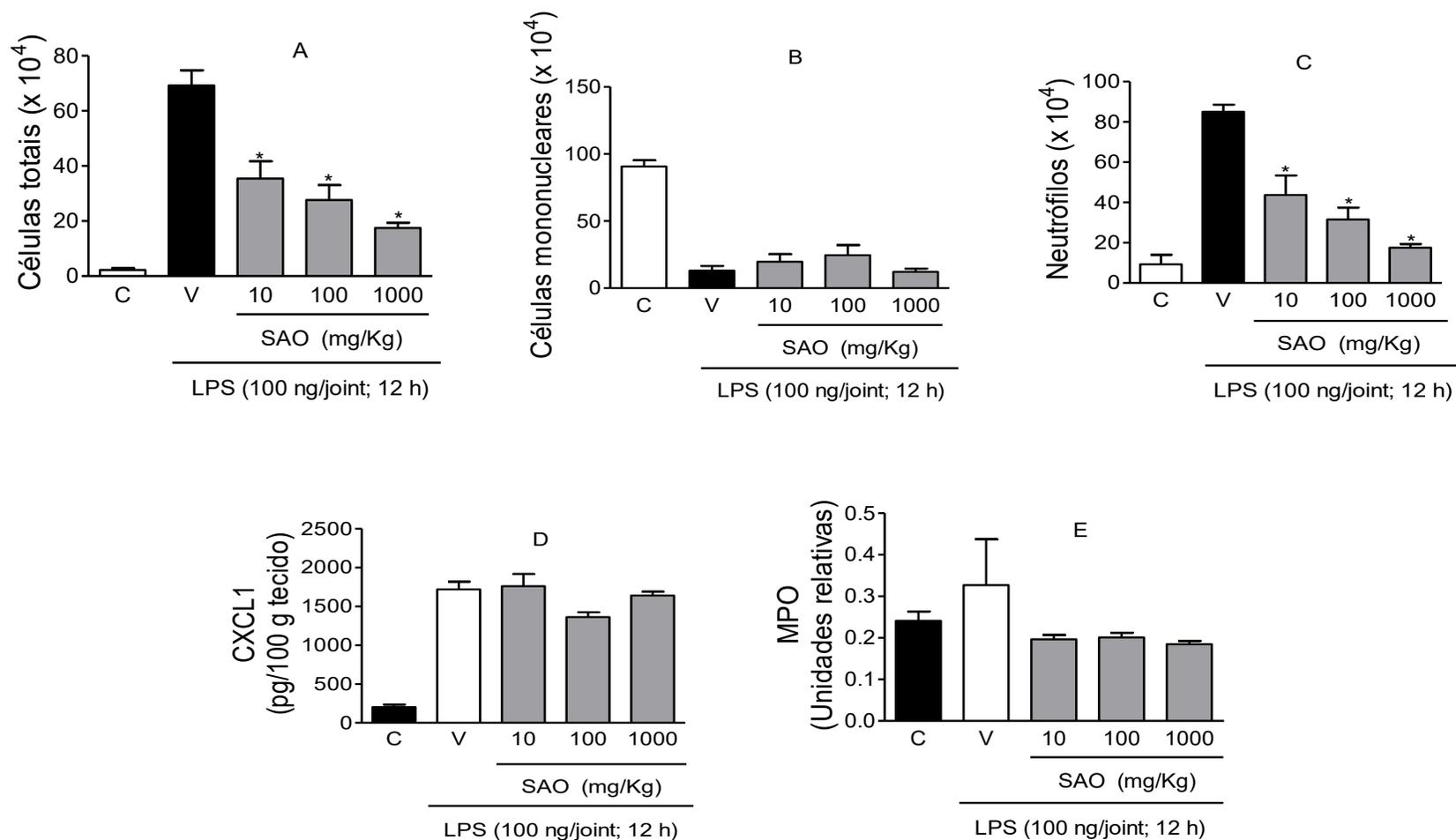


Figura 9 – Efeito induzido em animais tratados por gavagem com veículo ou com a fração orgânica de *S. adstringens* (SAO) no acúmulo de leucócitos totais (A), mononucleares (B) e neutrófilos (C) para a cavidade articular e na produção de CXCL1 (D) e MPO (E), após a administração de LPS (100 ng/cavidade). C: controle negativo (PBS); V: controle positivo (LPS). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (n=6 animais por grupo). (*): diferença significativa em relação ao veículo ($p < 0,05$, ANOVA com pós-teste de Student-Newman-Keuls).

A administração oral da fração aquosa de *C. lineatifolia*, nas doses 100 e 1000 mg/kg, reduziu o acúmulo de leucócitos para a cavidade articular de camundongos estimulados com LPS; porém, este efeito não foi dose-dependente (Figura 10). Na dose 100 mg/kg, a administração da fração inibiu também a migração de neutrófilos, o que não foi observado para a dose 1000 mg/kg. Esses resultados indicam uma potencial atividade anti-inflamatória para a fração aquosa; entretanto, como ela só foi ativa nas doses mais altas, 100 e 1000 mg/Kg, não foi selecionada para estudos posteriores. A fração também aumentou a migração de neutrófilos, nem a atividade da MPO e a concentração de CXCL1 no tecido periarticular.

Por sua vez, o tratamento dos animais com a fração orgânica de *C. lineatifolia* (CLO) não reduziu significativamente a migração de leucócitos para a cavidade articular, nem a migração de neutrófilos, nem a atividade da MPO e a concentração de CXCL1 no tecido periarticular (Figura 11).

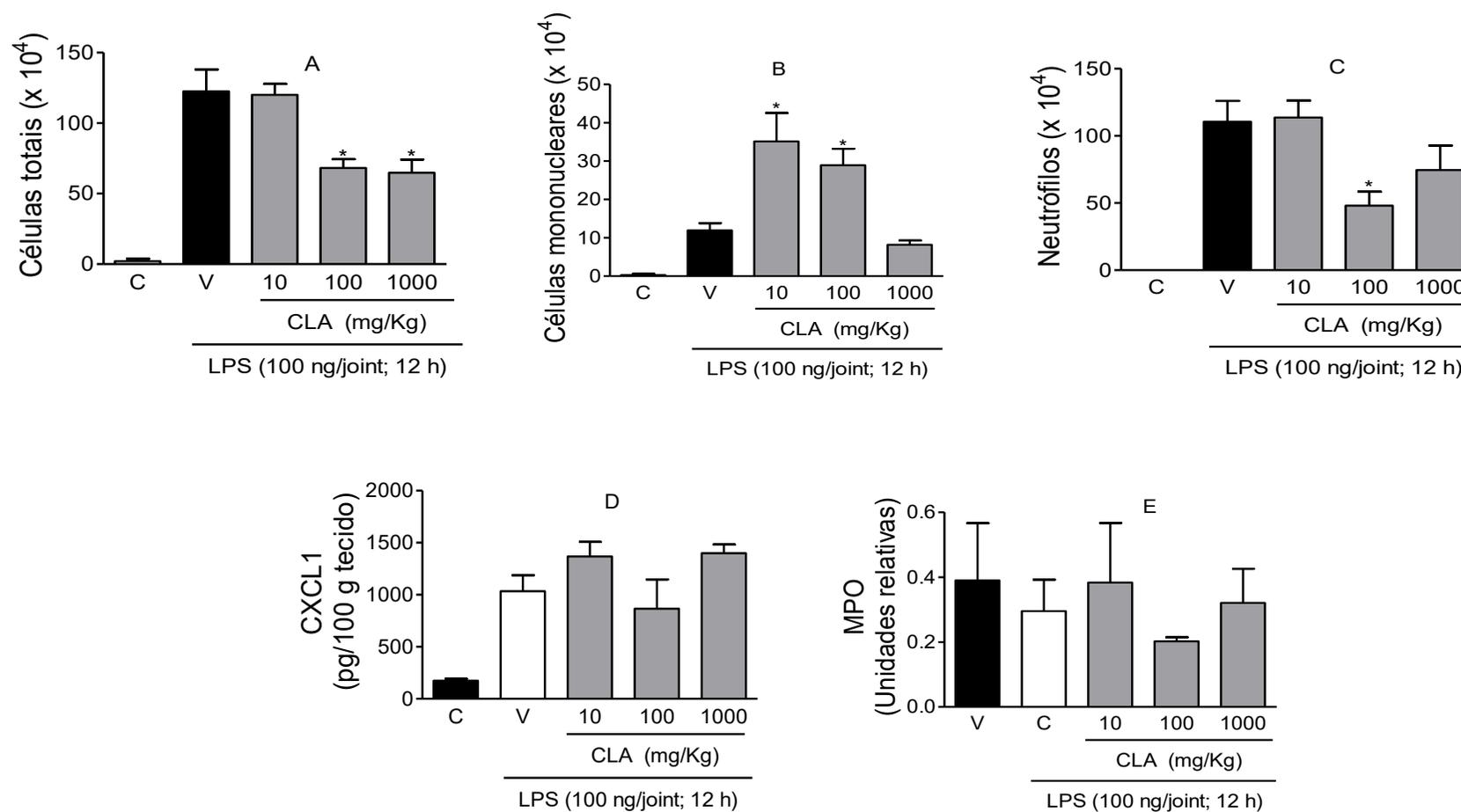


Figura 10 – Efeito induzido em animais tratados por gavagem com veículo ou com a fração aquosa de *C. lineatifolia* (CLA) no acúmulo de leucócitos totais (A), mononucleares (B) e neutrófilos (C) para a cavidade articular e na produção de CXCL1 (D) e MPO (E), após a administração de LPS (100 ng/cavidade). C: controle negativo (PBS); V: controle positivo (LPS). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (n=6 animais por grupo). (*): diferença significativa em relação a V ($p < 0,05$, ANOVA com pós-teste de Student-Newman-Keuls).

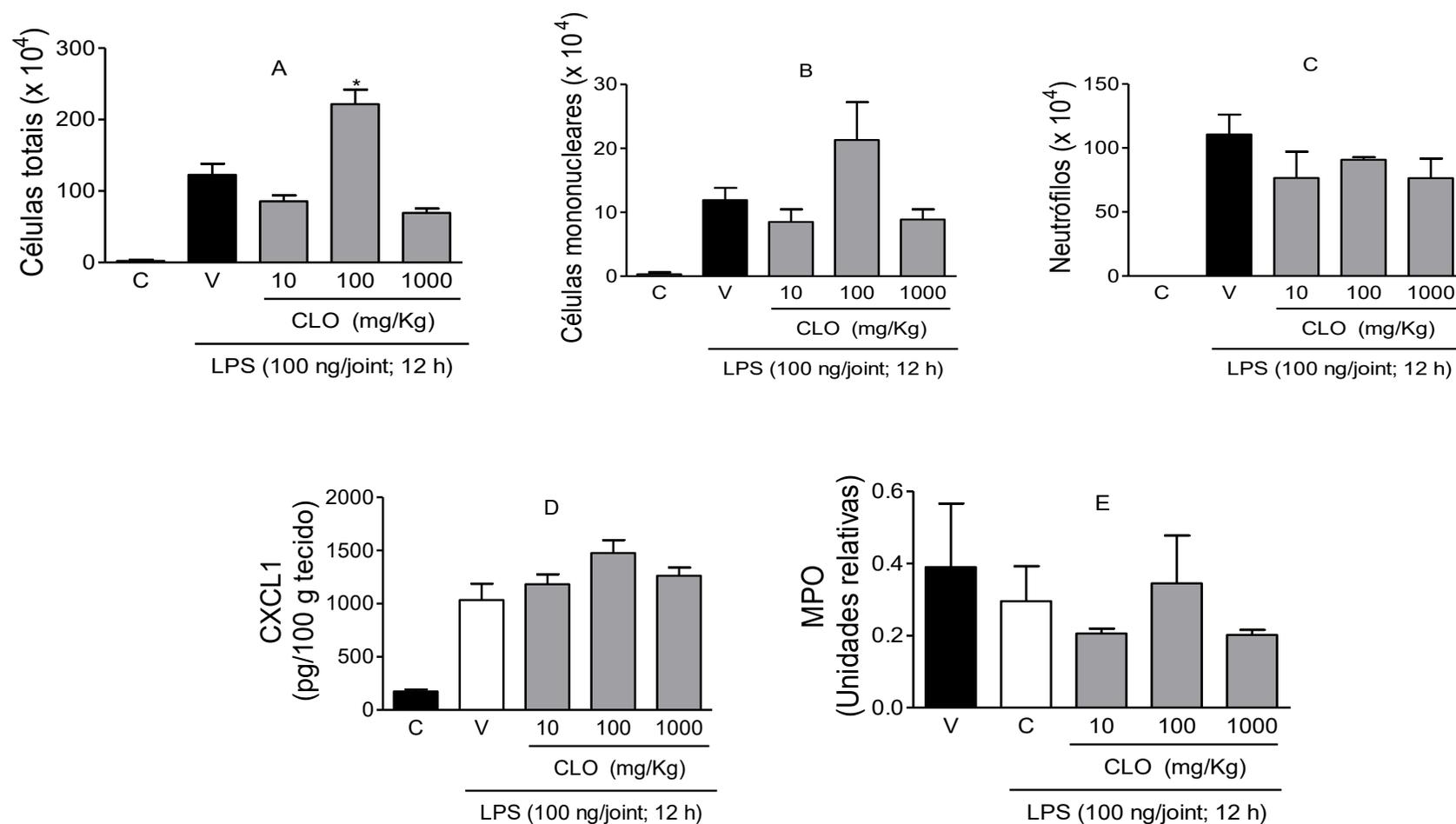


Figura 11 – Efeito induzido em animais tratados por gavagem com veículo ou com a fração orgânica de *C. lineatifolia* (CLO) no acúmulo de leucócitos totais (A), mononucleares (B) e neutrófilos (C) para a cavidade articular e na produção de CXCL1 (D) e MPO (E), após a administração de LPS (100 ng/cavidade). C: controle negativo (PBS); V: controle positivo (LPS). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (n=6 animais por grupo). (*): diferença significativa em relação a V ($p < 0,05$, ANOVA com pós-teste de Student-Newman-Keuls).

O tratamento dos camundongos com a fração aquosa de *T. glabrescens* (TGA) não reduziu significativamente a migração de leucócitos totais, nem alterou a migração de neutrófilos e monócitos para a cavidade articular de maneira dose-dependente, nem alterou significativamente os níveis de CXCL1 e a atividade de MPO nas doses testadas (Figura 12). Ao contrário, a migração de leucócitos mostrou que essa fração pode exercer ação pró-inflamatória, por exemplo, por exibir sinergismo com o LPS. De maneira semelhante, a fração orgânica de *T. glabrescens* (TGO) aumentou os parâmetros inflamatórios avaliados, em nenhuma das doses testadas (Figura 13).

É importante destacar que as frações aquosa e orgânica de *S. adstringens* foram avaliadas em uma faixa ampla de doses (10 a 1000 mg/kg), sendo observada redução da migração de leucócitos para a cavidade articular de camundongos em todas as doses avaliadas, e o efeito foi caracterizado como dose-dependente. Destaca-se também que a inibição da migração de leucócitos por SAO e SAA, administrados oralmente na dose de 100 mg/kg, foi de $33\pm 11\%$ e $26\pm 9\%$, respectivamente, similar à inibição exibida pelo controle positivo dexametasona ($33\pm 6\%$), administrado por via subcutânea (4 mg/kg).

Não há relatos na literatura sobre o efeito de *S. adstringens* em modelo agudo de artrite induzida por LPS na cavidade intra-articular do joelho de camundongos.

Quanto aos ensaios de quantificação de mediadores inflamatórios no tecido periarticular, as frações não reduziram os níveis de CXCL1 e a atividade de MPO. A concentração de TNF- α no tecido periarticular não pode ser quantificada, pois no período empregado para coleta do tecido para análise (12 horas após a administração da amostra) não foi possível detectar essa citocina. O extrato que originou essas frações também apresentou significativa atividade de sequestro de radicais livres (item I.2.7). Uma vez que já foi relatado que radicais livres podem contribuir com o processo inflamatório, por exemplo, atuando como mediadores inflamatórios, o combate a esses radicais deve também contribuir para a atividade anti-inflamatória exercida pelas frações.

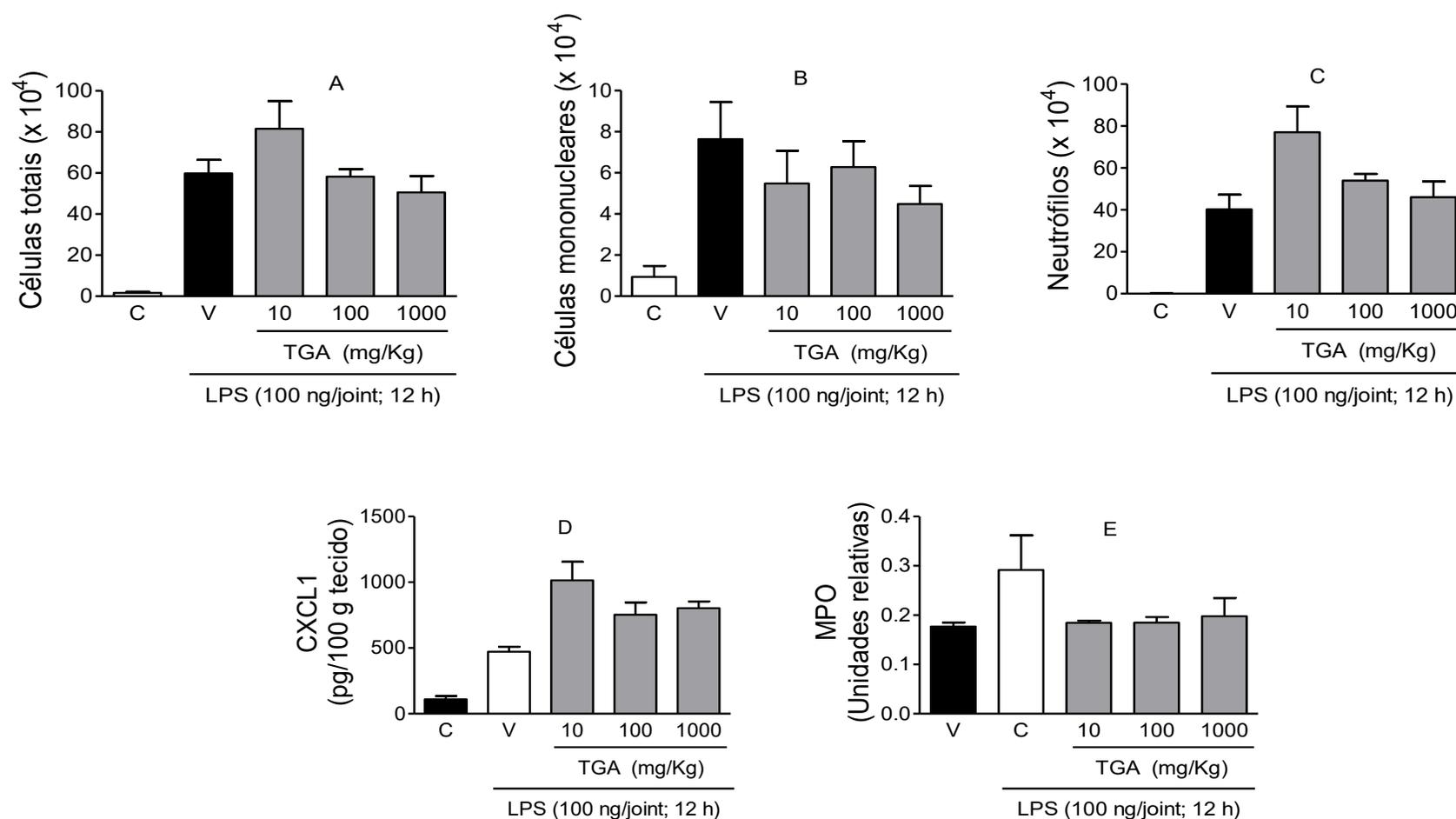


Figura 12 – Efeito induzido em animais tratados por gavagem com veículo ou com a fração aquosa de *T. glabrescens* (TGA) no acúmulo de leucócitos totais (A), mononucleares (B) e neutrófilos (C) para a cavidade articular e na produção de CXCL1 (D) e MPO (E) após a administração de LPS (100 ng/cavidade). C: controle negativo (PBS); V: controle positivo (LPS). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (n=6 animais por grupo). (*): diferença significativa em relação a V ($p < 0,05$, ANOVA com pós-teste de Student-Newman-Keuls).

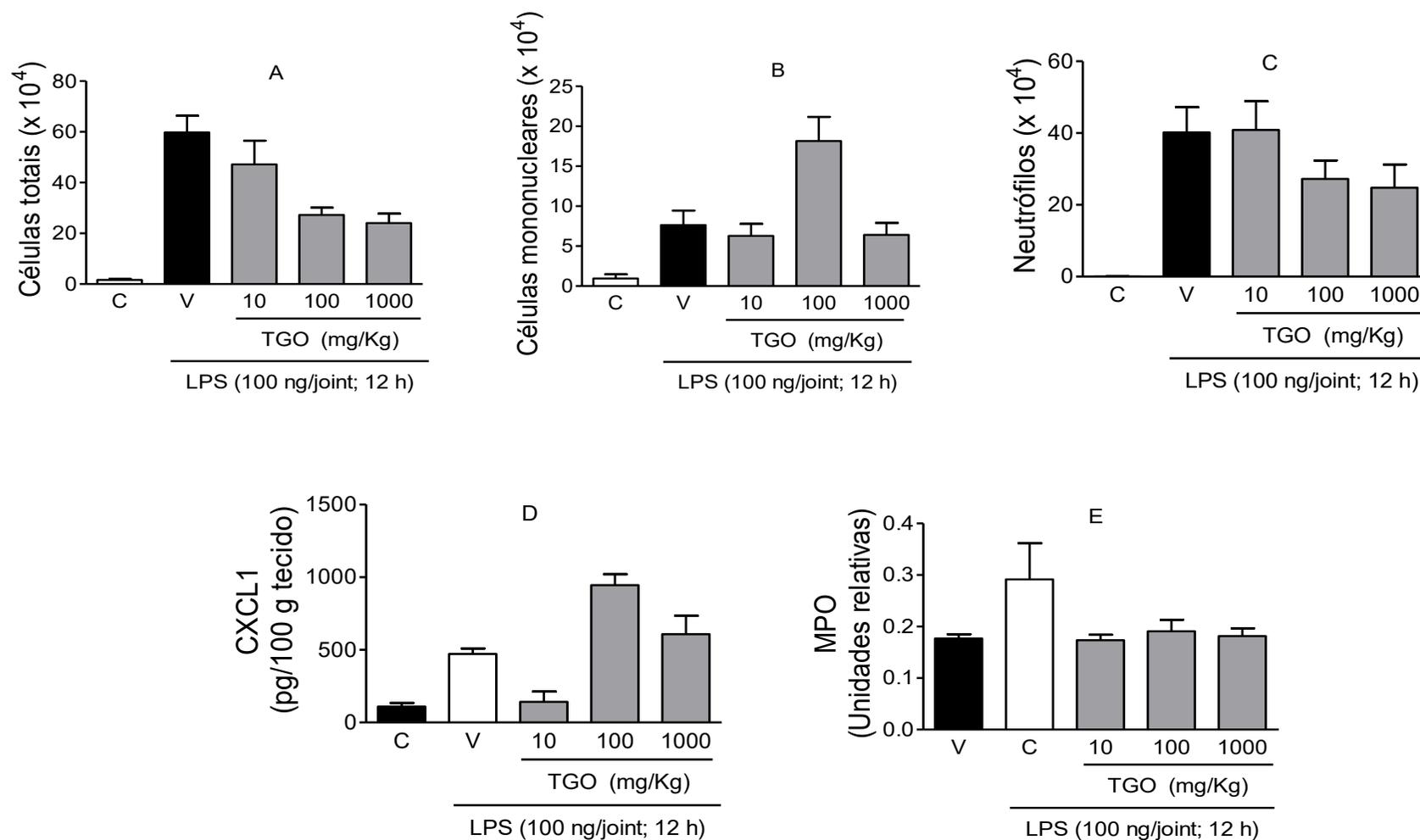


Figura 13 – Efeito induzido em animais tratados por gavagem com veículo ou com a fração orgânica de *T. glabrescens* (TGO) no acúmulo de leucócitos totais (A), células mononucleares (B) e neutrófilos (C) para a cavidade articular e na produção de CXCL1 (D) e MPO (E) após a administração de LPS (100 ng/cavidade). C: controle negativo (PBS); V: controle positivo (LPS). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (n=6 animais por grupo). (*): diferença significativa em relação a V ($p < 0,05$, ANOVA com pós-teste de Student-Newman-Keuls).

O ensaio de inflamação induzida na articulação do joelho por LPS é um modelo de inflamação aguda. Conhecer a produção dos mediadores durante o processo inflamatório do ensaio é importante para obter evidências sobre o mecanismo de ação das amostras ensaiadas. Nesse trabalho, tanto a fração orgânica quanto a aquosa derivadas do extrato etanólico do barbatimão reduziram a migração de leucócitos para o sítio inflamatório, sugerindo potencial anti-inflamatório das frações orgânica e aquosa. Além disso, essas frações também inibiram significativamente a migração de neutrófilos.

Os neutrófilos são os primeiros efetores recrutados na resposta inflamatória aguda e por isso são as células mais abundantes durante o processo inflamatório. Monócitos, que se diferenciam em macrófagos nos tecidos, são as células que migram a seguir para o local da injúria, guiados por fatores quimiotáticos (DELVES; ROITT, 2000).

Após migração para o tecido danificado, os neutrófilos liberam mediadores que promovem a amplificação da resposta inflamatória (HEIT et al., 2002). Portanto, a inibição do influxo de neutrófilos implica na atenuação da inflamação nos tecidos (COELHO et al., 2008). Assim, a redução da migração desse tipo celular para a cavidade articular, provocada pela fração orgânica de *S. adstringens*, indica seu potencial anti-inflamatório.

A extensão da migração de neutrófilos também pode ser avaliada através do ensaio de atividade de MPO (BARSANTE et al., 2007; SACHS et al., 2011), hemoproteína presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos, que é secretada no meio extracelular e fagolisossomal. Está envolvida, dentre outras funções, no sistema enzimático microbicida dessas células (ZUURBIER et al., 1992; PODREZ et al., 2000). Esta enzima está presente em quantidade considerável nos neutrófilos, alcançando cerca de 5% da massa seca dessas células, e desempenha papel importante na produção de espécies oxidativas por neutrófilos. Assim, no presente estudo, além da avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade articular, foi avaliada a migração desse tipo celular para o tecido periarticular através da análise da atividade dessa enzima. As frações orgânica e aquosa de *S. adstringens* reduziram a atividade de MPO, mas, devido ao grande valor de desvio padrão observado nos dados obtidos para o grupo tratado com o veículo, essa redução não foi estatisticamente significativa.

A concentração de CXCL1 também está relacionada com a migração de neutrófilos para o tecido periarticular, já que CXCL1 é uma quimiocina pertencente à classe das quimiocinas CXC, descritas como as principais envolvidas no recrutamento de neutrófilos para o tecido inflamado (ROLLINS, 1997). O tratamento com SAO e SAA reduziu a migração de neutrófilos para a articulação do joelho, entretanto, nem o teor de CXCL-1 nem a atividade de MPO foram significativamente afetados no tecido periarticular. Então, a redução

do recrutamento de neutrófilos induzida por essas frações provavelmente não resulta da inibição de CXCL-1 e sim de outro mecanismo.

O recrutamento de neutrófilos pode ser afetado por outros mecanismos além da inibição da produção de CXCL-1, incluindo a inibição da produção de outras quimiocinas e citocinas, ou o efeito na quimiotaxia de neutrófilos. O recrutamento pode também ser afetado por substâncias que interfiram com os receptores de quimiocinas ou com a ligação entre quimiocinas e os glicosaminoglicanos, dificultando assim o rolamento dos neutrófilos. Diminuição na expressão ou bloqueio das moléculas de adesão encontradas em neutrófilos também são possíveis mecanismos de diminuição do recrutamento dessas células (ALESSANDRI et al., 2013; MITROULIS et al., 2015; SCHNOOR, 2015; ZABEL et al., 2015).

Radicais livres também podem afetar o recrutamento de leucócitos. Por exemplo, o H_2O_2 , que pode ser gerado em algumas reações oxidativas que acontecem no meio intracelular, pode estar envolvido com a quimioatração de neutrófilos, além de modificar o rolamento de leucócitos (KRUIDENIER & VERSPAGET, 2002). Assim, é possível que uma substância capaz de sequestrar radicais livres reduza o recrutamento de leucócitos, sem afetar a produção de citocinas e quimiocinas.

Quando comparados os resultados obtidos *in vivo* para as frações aquosa e orgânica, observam-se respostas semelhantes, indicando que constituintes presentes em ambas as frações contribuem para a atividade anti-TNF- α do extrato (descrita no item I.1.1). As frações SAO e SAA também apresentaram comportamento semelhante no ensaio *in vivo* (Figura 9), provavelmente decorrente da presença de substâncias com características similares em ambas, os polifenóis, como taninos condensados, substâncias que possuem atividade anti-inflamatória já bem descrita (CHEN et al., 1996; BAGCHI et al., 1998; FINE, 2000; NAIR et al., 2006; MIN et al., 2007; BISCHOFF, 2008; INDRA et al., 2013; RATHI et al., 2013).

Tendo em vista os resultados obtidos no modelo de inflamação aguda induzida por LPS, a fração orgânica de *S. adstringens* (SAO) foi submetida a fracionamento cromatográfico (item III.3), resultando no isolamento da substância SAO1, identificada como 4'-*O*-metilgalocatequina, e de uma fração enriquecida em polifenóis, denominada SAO2. Essas amostras foram selecionadas para avaliação, *in vivo*, no mesmo modelo.

Assim, o tratamento dos animais com a fração SAO2 reduziu significativamente a migração de leucócitos para a cavidade articular de maneira dose-dependente em todas as doses testadas. Também se observou significativa redução da migração de neutrófilos, na maior dose ensaiada (Figura 14). Por outro lado, SAO2 não reduziu significativamente a

concentração de CXCL-1 nem a atividade de MPO no tecido periarticular, resultado semelhante ao obtido para as frações orgânica e aquosa de *S. adstringens*.

Por sua vez, o tratamento dos animais com a substância isolada SAO1 (4'-*O*-metilgalocatequina) reduziu significativamente a migração de leucócitos para a cavidade articular de maneira dose-dependente. Também houve significativa redução da migração de neutrófilos, na maior dose ensaiada (Figura 15). Não se observou redução na concentração de CXCL-1, em nenhuma das doses ensaiadas.

A ocorrência de 4'-*O*-metilgalocatequina em *S. adstringens* foi anteriormente relatada por Mello e colaboradores (1996a). De acordo com a Farmacopeia Brasileira V Ed. (Monografia do Barbatimão, Farmacopeia Brasileira, 2010), esta substância é um dos marcadores químicos da espécie. Algumas atividades biológicas já foram descritas para essa substância. Em um estudo das propriedades cicatrizantes, investigada através da influência na migração de fibroblastos e na proliferação em direção à ferida, a 4'-*O*-metil-galocatequina aumentou o número de células nas concentrações 1 e 10 μM , enquanto a concentração 20 μM levou a uma redução, em modelo de ensaio de raspagem em fibroblastos de camundongos Swiss 3T3 (SCHMIDT et al., 2010). Lai e colaboradores (2013) demonstraram que a 4'-*O*-metil-galocatequina, isolada de *Flemingia macrophylla*, exibiu fraca atividade estrogênica, com concentração ativa mínima (MAC) 312,50 μM , em modelo de avaliação de ligação ao receptor de estrogênio utilizando o ensaio de planta transgênica, e não foi ativa, na concentração 10 μM , em modelo de transcrição de um elemento responsivo ao estrogênio, em células humanas de câncer no seio MCF-7 ER-positivo. Ainda nesse estudo, em experimento para avaliar o potencial anti-inflamatório, a substância foi incapaz de reduzir o ânion superóxido e a liberação de elastase em neutrófilos humanos estimulados com formil-metionil-leucil-fenilalanina e citochalasin B, quando avaliada na concentração 10 μM . Ainda nesse trabalho, a substância foi inativa frente a diferentes linhagens de células tumorais, avaliada na concentração 20 $\mu\text{g/mL}$.

Os dados descritos no presente trabalho demonstram uma atividade ainda não relatada para a 4'-*O*-metil-galocatequina, atividade anti-inflamatória. Essa atividade parece estar relacionada à interferência dessa substância no acúmulo de leucócitos para o tecido inflamado, sendo que essa capacidade não está relacionada à produção de CXCL-1 nem à atividade de MPO.

Conforme mencionado anteriormente, a concentração de TNF- α no tecido periarticular não pôde ser quantificada nos experimentos com o modelo de inflamação induzida por LPS, pois no período empregado para coleta do tecido para análise (12 horas após a injeção intra-

articular de LPS no joelho) não houve diferenças significativas entre os grupos, o que sugere que a concentração da citocina nas amostras estava abaixo do limite de quantificação do método. O tempo de 12 horas foi estabelecido com base no pico da migração celular para o tecido inflamado (CAMPANA, 2015). Como as plantas foram selecionadas com base nos resultados do ensaio *in vitro* de produção de TNF- α por células THP-1 estimuladas por LPS, esperava-se que o teor dessa citocina fosse um possível mecanismo de atividade anti-inflamatória exibida pelas frações de *S. adstringens*. Assim, foram realizadas novas tentativas de quantificação de TNF- α no tecido periarticular. Esses experimentos foram realizados através da administração oral das amostras (SAO, 100 mg/kg; SAO1, 10 mg/kg) e do controle positivo (dexametasona por via subcutânea, 4 mg/kg), uma hora antes da injeção de LPS, em comparação com o controle estimulado por LPS e o controle não-estimulado. Nessa condição, também não se observou diferença significativa entre os grupos.

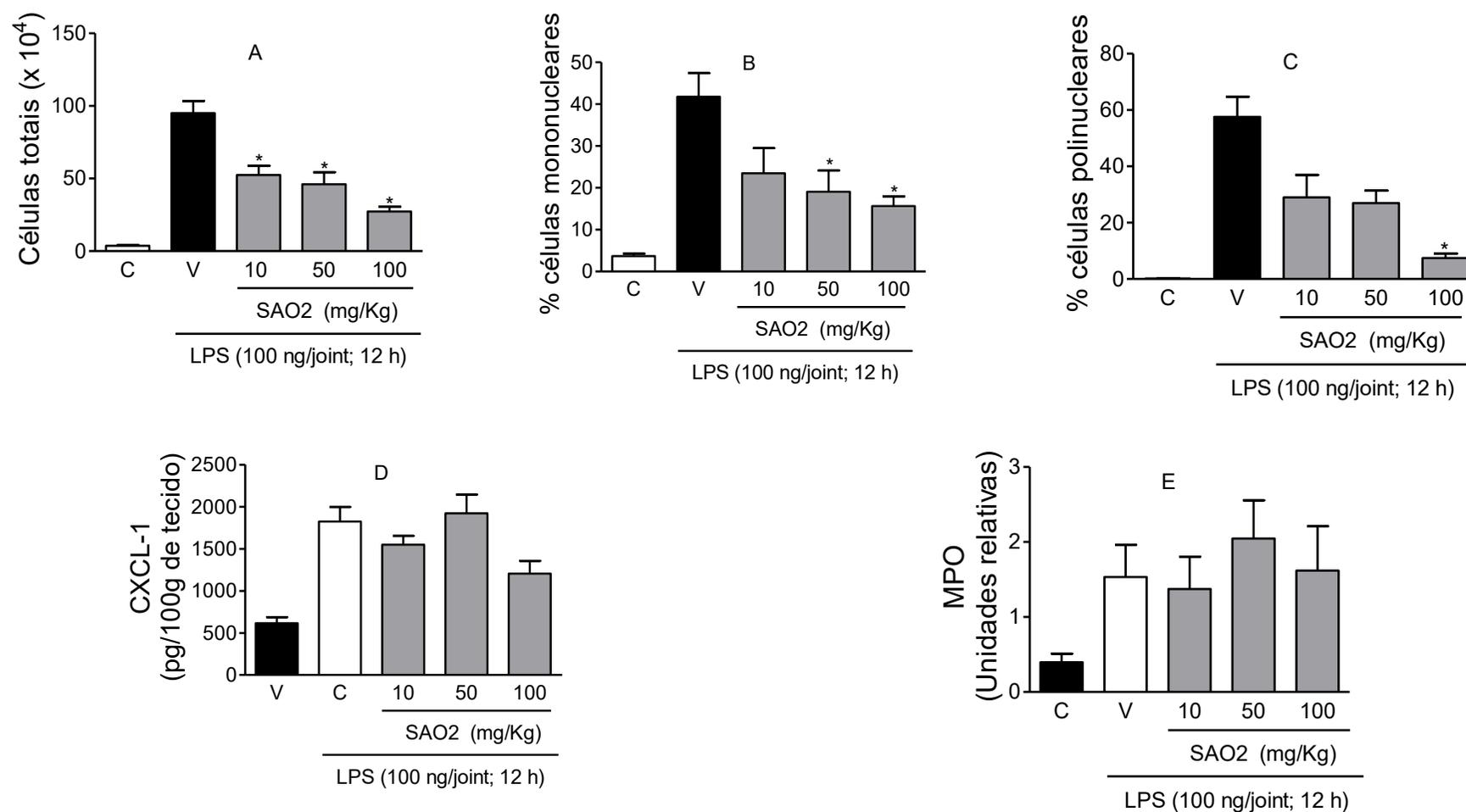


Figura 14 – Efeito induzido em animais tratados por gavagem com veículo ou com a fração enriquecida em polifenóis de *S. adstringens* (SAO2) no acúmulo de leucócitos totais (A), mononucleares (B) e neutrófilos (C) para a cavidade articular, na produção de CXCL1 (D) e na atividade de MPO (E), após a administração de LPS (100 ng/cavidade). C: controle negativo (PBS); V: controle positivo (LPS). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (n=6 animais por grupo). (*): diferença significativa em relação a V ($p < 0,05$, ANOVA com pós-teste de Student-Newman-Keuls).

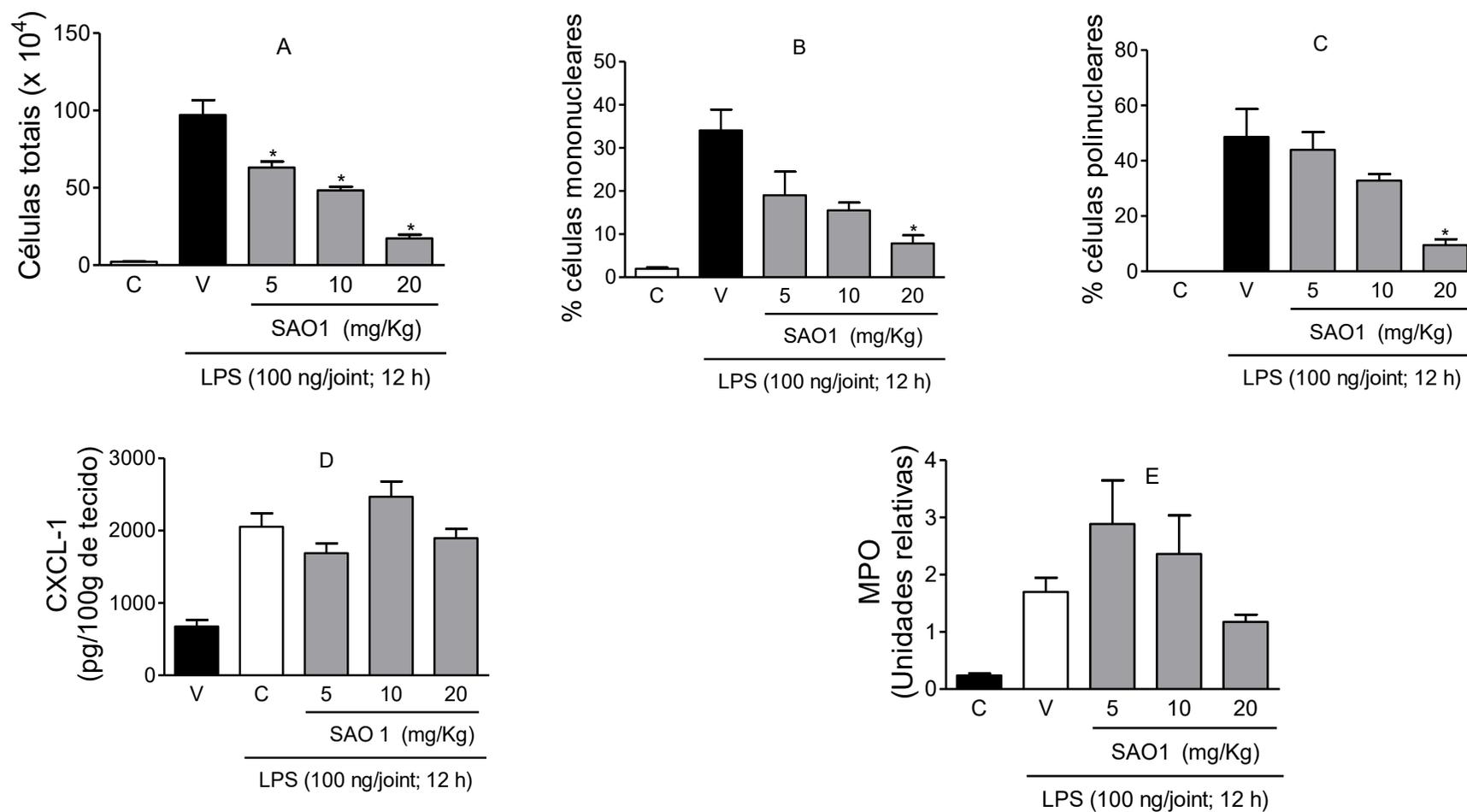


Figura 15 – Efeito induzido em animais tratados por gavagem com veículo ou com 4'-*O*-metil-galocatequina isolada de *S. adstringens* (SAO1) no acúmulo de leucócitos totais (A), mononucleares (B) e neutrófilos (C) para a cavidade articular, na produção de CXCL1 (D) e na atividade de MPO (E), após a administração de LPS (100 ng/cavidade). C: controle negativo (PBS); V: controle positivo (LPS). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (n=6 animais por grupo). (*): diferença significativa em relação a V ($p < 0,05$, ANOVA com pós-teste de Student-Newman-Keuls).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória relacionada ao recrutamento de células inflamatórias para o tecido estimulado, e é liberada logo no início do processo inflamatório. Um estudo demonstrou que o nível máximo de TNF- α pode ser detectado no fluido sinovial duas horas após a injeção de LPS (MATSUKAWA et al., 1997). Com base nesse dado da literatura, foram feitos novos experimentos, com a coleta no material uma e três horas após a injeção de LPS. Nesses experimentos, a quantificação de TNF- α por ELISA foi realizada diretamente no lavado do joelho, enquanto o tecido periarticular foi processado e analisado por PCR. Ainda assim, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. É possível que outros mecanismos sejam responsáveis pela atividade anti-inflamatória da espécie.

Os gráficos dos três experimentos descritos acima estão exibidos na Figura 16. Não houve diferença significativa entre nenhum dos grupos avaliados, nem mesmo entre os controles estimulado e não-estimulado por LPS.

Foram encontrados poucos relatos na literatura de ensaios realizados com o modelo de injeção intra-articular de LPS. Diversos experimentos utilizando LPS como estímulo inflamatório estão descritos, entretanto, na maioria deles, a via de indução foi intraperitoneal, o que produz uma resposta inflamatória sistêmica e não local, como é o caso da injeção intra-articular.

O extrato em acetona de *Clematis chinensis*, na dose de 100 mg/kg administrado por via oral 0, 2, 4 e 6 dias após a injeção intra-articular de LPS no joelho de coelhos reduziu o status inflamatório local e sistêmico, avaliado por imagem F-FDG PET e análise por SUV, bem como foi observada diminuição da concentração sérica de PGE2 (HSIEH et al., 2011).

Já o extrato aquoso de galhos e raízes de *Vitis thunbergii* reduziu os mesmos parâmetros descritos no estudo anterior, porém em dose maior, 500 mg/kg, administrado oralmente 0, 2, 4 e 6 dias após a injeção intra-articular de LPS no joelho de coelhos (TSAI et al., 2014).

É interessante destacar que esses extratos foram avaliados em dose única. Por outro lado, no presente trabalho, todas as frações testadas foram avaliadas em ampla faixa de concentração (10, 100 e 1000 mg/kg para SAO e SAA, 10, 50 e 100 mg/kg para SAO2 e 5, 10 e 20 mg/kg para SAO1), exibindo atividade em todas essas concentrações, com comportamento dose-dependente. Além disso, nos estudos acima citados, não foi descrita a quantificação de citocinas.

A quantificação de TNF- α foi pouco relatada no modelo de injeção intra-articular de LPS.

Num estudo desenvolvido em camundongos transgênicos para IL-32 α , Nakayama e colaboradores (2012) dosaram por PCR os níveis de TNF- α na sinóvia, duas semanas após a injeção intra-articular de LPS no joelho. Os autores descreveram níveis aumentados de TNF- α nos animais transgênicos, em comparação com animais não transgênicos. Esses resultados já eram esperados, uma vez que a IL-32 α é uma citocina pró-inflamatória conhecida por aumentar os níveis de outras citocinas, como o TNF- α (SHYOYA et al., 2007). Além disso, essa quantificação foi realizada diretamente na sinóvia, que é o tecido que recobre a cavidade articular e, por ser o tecido adjacente ao local que recebeu o estímulo inflamatório, tende a possuir uma concentração de TNF- α superior ao tecido periarticular, que foi o alvo da investigação de TNF- α no presente estudo. Quanto maior a porção de tecido periarticular coletado, maior a distância do estímulo inflamatório e, conseqüentemente, menor a concentração da citocina.

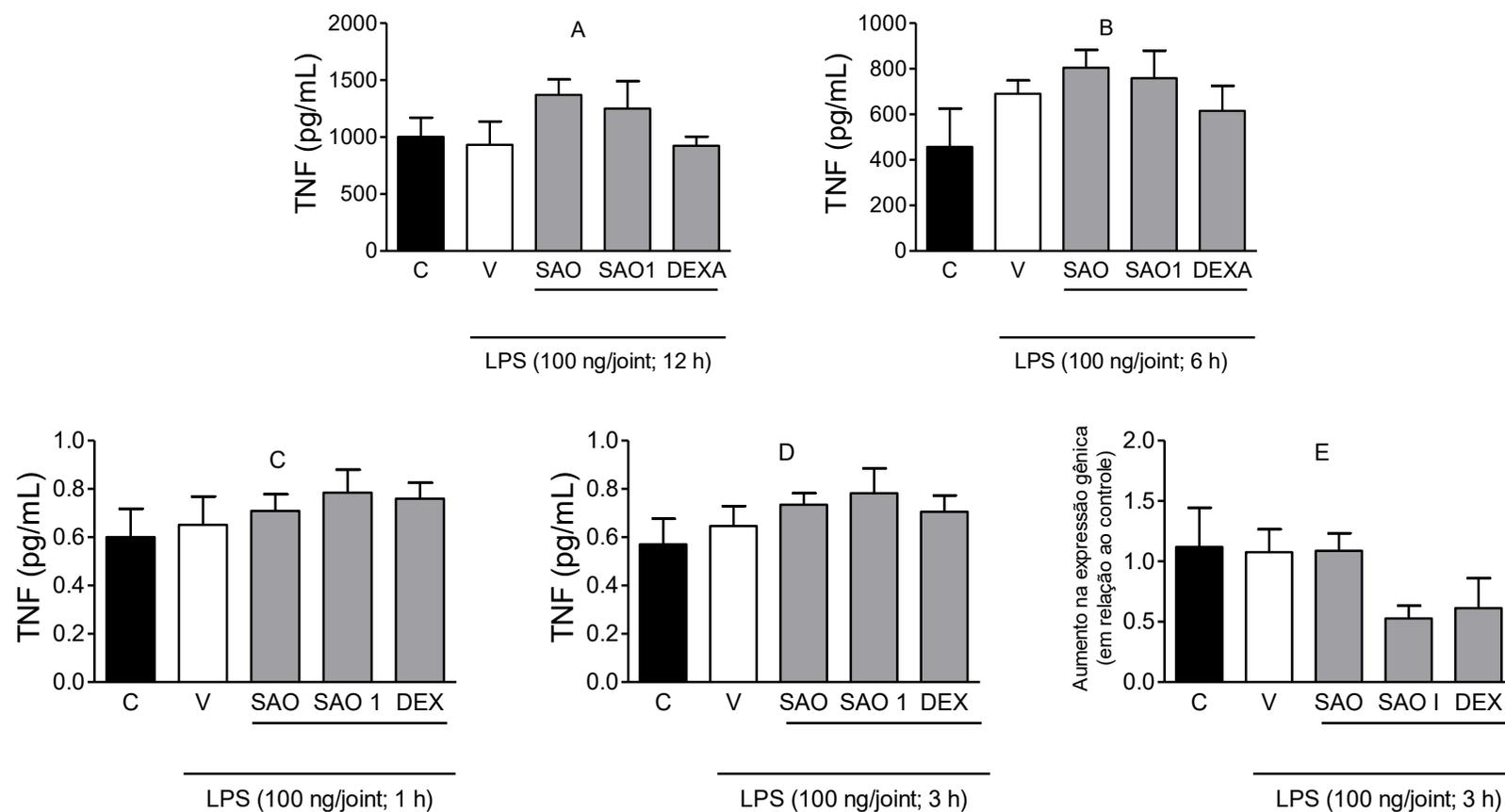


Figura 16 – Efeito induzido em animais tratados por gavagem com veículo ou com a fração orgânica (SAO) ou 4'-*O*-metil-galocatequina (SAO1) de *S. adstringens* na liberação de TNF- α no tecido periarticular com eutanásia (A) 12h (B) 6h (C) 1h (D) 3h da injeção intra-articular de LPS determinado por ELISA ou (E) por PCR (3h) após a administração de LPS (100 ng/cavidade). C: controle negativo (PBS); V: controle positivo (LPS). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (n=6 animais por grupo). (*): diferença significativa em relação a V ($p < 0,05$, ANOVA com pós-teste de Student-Newman-Keuls).

Em outro estudo, os níveis de TNF- α foram quantificados no fluido sinovial e em neutrófilos de ratos após injeção intra-articular de LPS no joelho, 2 e 3 h após o estímulo, por citometria de fluxo (AHMAD et al., 2013). Nesse trabalho, a administração oral do extrato etanólico das folhas de *Euphorbia hirta* diminuiu os níveis de TNF- α nos neutrófilos e no fluido sinovial nas doses 100 e 200 mg/kg; porém, nas doses 25 e 50 mg/kg, o extrato não exibiu atividade (AHMAD et al., 2013). O volume de fluido sinovial e o teor de TNF- α são maiores em ratos que em camundongos. Essas diferenças poderiam explicar as dificuldades encontradas no presente trabalho em detectar a citocina, apesar das diversas tentativas em diferentes tempos e métodos analíticos variados. Ressalta-se que as frações avaliadas no presente trabalho exibiram atividade anti-inflamatória mesmo nas doses mais baixas, 10 mg/kg para SAO, SAA e SAO2, e 5 mg/kg para SAO1.

II.2 Atividade anti-inflamatória em modelo de Artrite Induzida por Antígeno - AIA

Com base nos resultados obtidos nos experimentos *in vivo* em modelo de inflamação induzida por injeção intra-articular de LPS no joelho de camundongos, a fração orgânica SAO e as subfrações SAO1 e SAO2 de *S. adstringens* foram selecionados para avaliação em modelo de artrite induzida por antígeno (AIA) em camundongos.

O efeito dessas frações no modelo de inflamação aguda induzida por LPS foi avaliado a partir da determinação do número de células totais e diferenciais no infiltrado celular da cavidade articular.

Os animais foram tratados com a fração orgânica de *S. adstringens* (SAO), nas doses de 10, 100 e 100 mg/kg. Observou-se redução significativa da migração de leucócitos e de neutrófilos para a cavidade articular em todas as doses avaliadas, de maneira dose-dependente (Figura 17).

Na sequência, a fração enriquecida em polifenóis (SAO2) foi avaliada nas doses de 10, 50 e 100 mg/kg. O tratamento dos animais reduziu significativamente a migração de leucócitos e de neutrófilos para a cavidade articular de maneira dose-dependente (Figura 17).

Já o tratamento dos animais com a 4'-*O*-metil-galocatequina (SAO1) nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg reduziu significativamente a migração de leucócitos para a cavidade articular apenas na maior dose administrada (Figura 17).

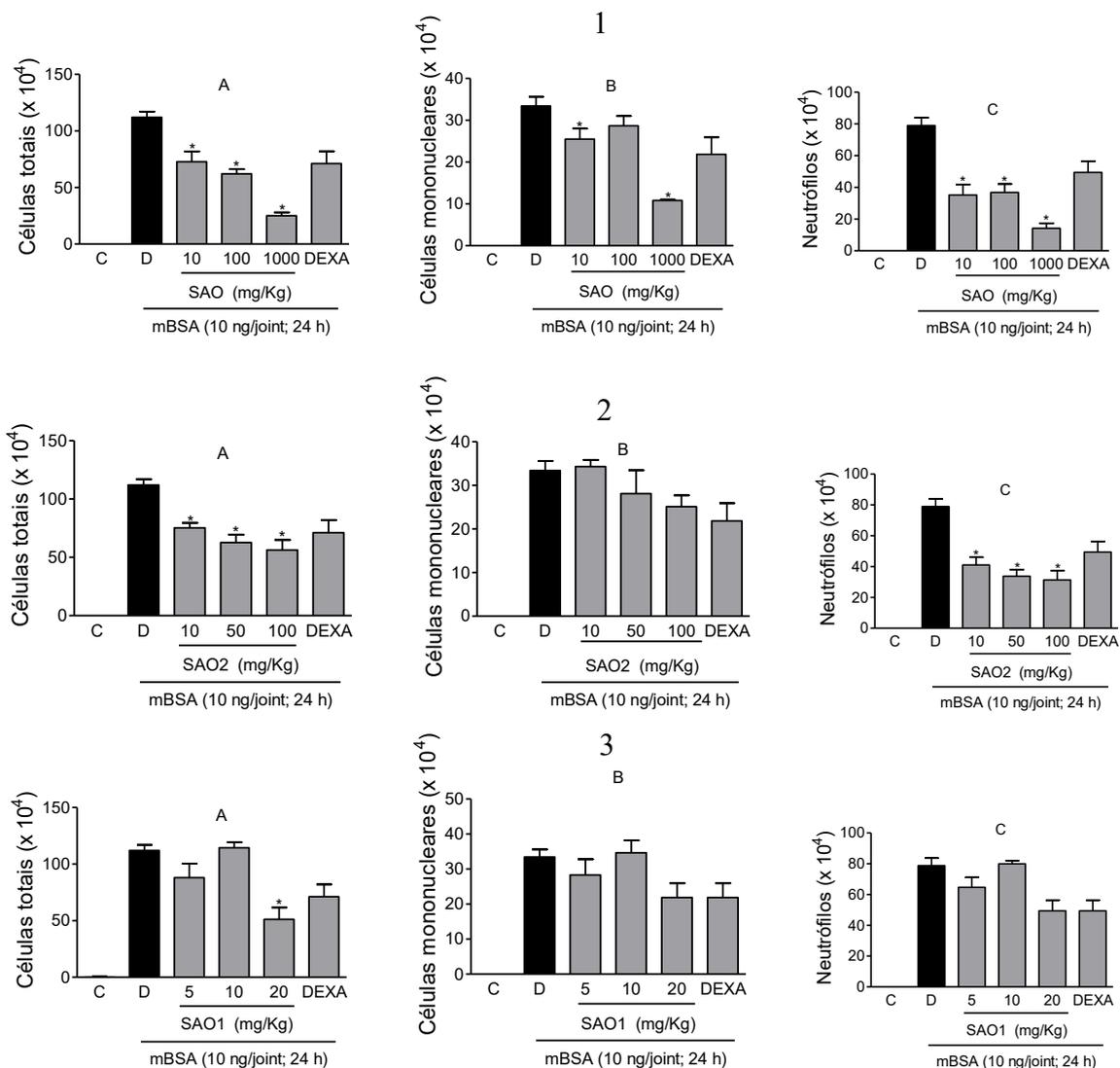


Figura 17 – Efeito induzido em animais tratados por gavagem com veículo ou com a fração orgânica de *S. adstringens* (SAO) (1), com a fração enriquecida em polifenóis de *S. adstringens* (SAO2) (2) e com a 4'-*O*-metil-galocatequina (SAO1) isolada das cascas de *S. adstringens* (3), no acúmulo de leucócitos totais (A), células mononucleares (B) e neutrófilos (C) para a cavidade articular após a administração de mBSA (100 ng/cavidade). C: controle negativo (PBS); D: controle positivo (mBSA). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média ($n=6$ animais por grupo). (*): diferença significativa em relação a V ($p<0,05$, ANOVA com pós-teste de Student-Newman-Keuls).

A dexametasona não inibiu estatisticamente a migração de leucócitos totais nem de neutrófilos em nenhum dos experimentos, provavelmente ao valor de desvio padrão obtido. Ainda assim, observou-se tendência de inibição, de $36,43 \pm 21,59\%$ e $44,40 \pm 13,14\%$ para leucócitos e neutrófilos, respectivamente.

A fração SAO2 mostrou-se ativa e com comportamento dose-dependente na faixa de concentrações avaliada. Apresentou inibição da migração de leucócitos de $32,7 \pm 9,6\%$, $44,0 \pm 15,0\%$ e $49,7 \pm 18,74$, e de neutrófilos, $48,0 \pm 15,6\%$, $57,1 \pm 11,7\%$ e $60,3 \pm 18,8\%$, respectivamente, para as doses 10, 50 e 100 mg/kg. Já a fração SAO1, ativa apenas na maior dose avaliada, inibiu em $54,3 \pm 20,7\%$ a migração de leucócitos, efeito superior ao exibido pela dexametasona, controle positivo do ensaio.

A fração SAO foi ativa em todas as doses ensaiadas (10, 100 e 1000 mg/kg), com porcentagens de inibição de $35,0 \pm 18,3\%$, $38,9 \pm 16,6\%$ e $77,7 \pm 2,2\%$ para a migração de leucócitos e $55,4 \pm 17,0\%$, $53,4 \pm 13,4\%$ e $82,0 \pm 6,7\%$ para a migração de neutrófilos. Como pode ser observado, houve comportamento dose-dependente apenas na migração de leucócitos totais.

A atividade anti-inflamatória da fração em acetona derivada do extrato metanólico das cascas de *S. adstringens* já foi descrita em diferentes modelos, nas doses 400 e 800 mg/kg, por via oral. A fração suprimiu o edema inflamatório agudo de pata induzido por carragenina e dextrana em ratos em ambas as doses, com efeito comparável aos fármacos de referência indometacina e ciproheptadina, administrados a 5 mg/kg. Essa fração também se mostrou efetiva em reduzir o volume de exudato e a migração de leucócitos em modelo de pleurisia aguda induzida por carragenina em ratos, na dose de 800 mg/kg. Também reduziu o aumento da permeabilidade vascular produzida por ácido acético na cavidade peritoneal de camundongos, na mesma dose. Em modelo de AIA em ratos, a fração avaliada na dose de 800 mg/kg exerceu um potente efeito, similar à fenilbutazona (100 mg/kg), efeito não observado quando administrada na dose de 400 mg/kg (LIMA et al., 1998).

A atividade anti-inflamatória de diversos extratos e frações de plantas em modelo de AIA encontra-se descrita na literatura. A faixa de concentrações avaliada nesses estudos é ampla, e os dados descritos a seguir indicam a potencialidade das frações de *S. adstringens*, que induziram significativa atividade anti-ártrítica em doses mais baixas.

A atividade anti-inflamatória de uma fração enriquecida em polifenóis do extrato hidroalcoólico de cascas de *Cinnamon zeylanicum* foi avaliada em modelos de inflamação e artrite reumatoide. A fração inibiu o edema de pata induzido pela carragenina em ratos de maneira dose-dependente, quando avaliada nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, por via oral.

Essa mesma fração, na dose de 200 mg/kg/dia, reverteu o aumento da concentração de TNF- α sérico na região subplantar de ratos com AIA, em relação ao grupo controle (RATHI et al., 2013). Portanto, polifenóis são ativos em modelo de AIA.

O extrato aquoso das cascas de *Equisetum giganteum*, na dose de 600 mg/kg, administrado duas vezes ao dia (iniciando 2 dias antes da injeção intra-articular) por via oral, reduziu a nocicepção articular e diminuiu a migração de leucócitos em modelo de AIA em camundongos BALB-C (FARINON et al., 2013).

Em relação aos trabalhos supracitados, as frações ensaiadas no presente trabalho foram ativas em doses menores, 10 e 50 mg/kg. Além disso, as frações foram ativas em dose única, administrada apenas 1h antes da injeção intra-articular do agente desafiante. Esses resultados ressaltam o grande potencial anti-inflamatório das frações.

Polifenóis também apresentam resultados promissores em modelos de AIA. Em diversos estudos, foram verificadas melhorias de quadros de artrite com a administração de extratos ricos em polifenóis. Em ratos Lewis com AIA, um extrato enriquecido em polifenóis de *Rubus idaeus*, administrado oralmente uma vez ao dia na dose de 120 mg/kg durante 30 dias após a indução da artrite, diminuiu sua severidade, com inibição da inflamação, do dano à cartilagem e da reabsorção óssea (JEAN-GILLES et al., 2012). Em outro estudo, um extrato padronizado de romã (*Punica granatum*), rico em polifenóis, nas doses 13,6 e 34 mg/kg administrado oralmente por 10 dias antes da indução da artrite, reduziu a incidência de artrite promovida por colágeno em camundongos DBA/1 (SHUKLA et al., 2008). Um extrato comercial de chá verde (Polyphenon 60, *Camelia sinensis*) com alto teor de polifenóis, administrado na dose de 200 mg/kg uma vez ao dia, por via oral, reduziu a artrite em ratos Lewis com AIA, diminuindo os níveis de MCP-1/CCL1 e GRO α /CXCL1 e aumentando a expressão dos genes CCR-1, -2 e -5 e CXCL1 nas articulações dos animais (MAROTTE et al., 2010).

O galato de epigallocatequina, ensaiado na dose 10 mg/kg por via oral, melhorou os sintomas clínicos e diminuiu o escore histológico, além de suprimir a proliferação de células T e alterar as frequências relativas de células T CD4, CD8 e B em camundongos DBA/1 J com artrite induzida por colágeno (MIN et al., 2015).

Assim, é provável que os polifenóis encontrados nas cascas de *S. adstringens* (vide capítulo III) sejam os responsáveis pela atividade anti-inflamatória das frações SAO e SAO2 em modelo de AIA.

De acordo com os resultados exibidos na Figura 17, as frações de *S. adstringens*, SAO e SAO2, apresentaram maior atividade anti-inflamatória que a substância isolada 4'-O-metil-

galocatequina, SAO1, uma vez que SAO e SAO2 reduziram a migração de leucócitos totais e de neutrófilos inclusive na menor concentração ensaiada, 10 mg/kg, o que não foi observado para a substância isolada, que apenas foi ativa na maior dose ensaiada, 20 mg/kg.

Esses resultados sugerem que haja sinergismo entre os componentes das frações em detrimento da substância isolada, uma vez que algumas das substâncias presentes nessas frações, como o ácido gálico e as prodelphinidinas, são extensivamente conhecidas por possuírem ação anti-inflamatória (itens I.1 e II.1) e podem agir por diferentes mecanismos (MIN et al., 2007; BISCHOFF, 2008; KIM et al., 2011; INDRA et al., 2013; RATHI et al., 2013; UCHIYAMA et al., 2013; WANG et al., 2014). A 4'-*O*-metil-galocatequina não possui atividade anti-inflamatória descrita na literatura, entretanto, no presente trabalho, a substância demonstrou essa atividade em modelo de inflamação aguda induzida pela injeção intrarticular no joelho de camundongos (item II.1). Portanto, é provável que essa substância contribua com a atividade anti-inflamatória das frações de *S. adstringens*.

II.3 Modelo de colite ulcerativa induzida por injeção intracolônica de TNBS

Com base nos resultados obtidos nos experimentos de inflamação induzida por LPS e no modelo de AIA, bem como no uso popular da espécie para tratar diarreia, a fração SAO2 foi selecionada para avaliação em modelo de colite ulcerativa induzida por injeção intracolônica de TNBS em camundongos.

O TNBS, quando administrado por via intracolônica veiculado em etanol a 50%, altera a permeabilidade vascular do epitélio e desencadeia no tecido uma resposta imunológica, que provoca intensa inflamação tissular com formação de edema e úlceras, espessamento do tecido e aumento da infiltração de leucócitos, com aumento do nível de mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- α , além do aumento de atividades de algumas enzimas produzidas por células inflamatórias, como MPO e EPO (HOFFMANN et al., 2001; SÁNCHEZ-HIDALGO et al., 2007; WIRTZ et al., 2007; WU et al., 2011).

O efeito da fração foi avaliado a partir da determinação da perda de peso, escore clínico e escore macroscópico do cólon, além da determinação da atividade de MPO e EPO no cólon. Os resultados são exibidos na Figura 18. Não se observou diferença estatística entre os grupos controles tratado e não tratado. Entretanto, apesar da ausência de diferença estatística entre os grupos, observa-se que o tratamento dos animais com a fração SAO2 induziu o aumento da atividade das enzimas MPO e EPO, além de uma piora geral no quadro clínico dos animais e do aumento da lesão intestinal, como observado na dose de 50 mg/kg.

O quadro clínico dos animais foi determinado através de uma pontuação atribuída, denominada escore clínico, somando-se a pontuação para o grau de diarreia que os animais apresentaram (fezes normais, semissólidas, pastosas, cremosas ou líquidas) e da perda de peso apresentada pelos animais. Também foram observadas características como o quadro geral do animal, como a prostração e a presença de piloereção.

Já a extensão da lesão intestinal foi determinada através da pontuação de escore macroscópico, uma pontuação que leva em consideração a presença e intensidade de eritema e edema na região proximal e distal do cólon, além da presença de úlceras.

A perda de peso também é um importante parâmetro do modelo, e ocorre não só devido à diarreia que os animais desenvolvem, mas também devido à diminuição do consumo de alimentos, em consequência dessa diarreia e da dor abdominal desenvolvida (WU et al., 2011). Como nos outros parâmetros, não houve diferença estatística entre os grupos, porém, foi observada uma maior perda de peso nos grupos estimulados com TNBS (controle; tratado com SAO2; e tratado com prednisolona) que nos controles não estimulados. Do segundo para o terceiro dia de experimento, os animais tratados com SAO2 e com prednisolona continuaram a exibir perda de peso, o que não aconteceu com o controle estimulado, que não perdeu mais peso e se aproximou da massa corporal relativa dos grupos controle não estimulados. Isso sugere que houve, entre os dias 2 e 3, uma breve recuperação dos animais desse grupo, o que poderia explicar os danos menores no cólon e as baixas atividades de MPO e EPO exibidos para esse grupo ao final do dia 3, que é quando ocorre a eutanásia e esses parâmetros são avaliados.

Outro parâmetro que pode sugerir a extensão das lesões provocadas pela indução da colite por TNBS é a relação entre o peso e o tamanho do cólon dos animais. Quanto maior a gravidade do processo inflamatório, maior é o peso do cólon, que aumenta essa razão. Entretanto, nesse experimento, também não foram detectadas diferenças estatísticas entre a razão peso/tamanho do cólon entre os diferentes grupos (dados não apresentados).

Apesar de a doença ter sido apenas fracamente induzida nos grupos estimulados (pequenas diferenças entre os controles induzido e não induzido), é possível fazer algumas inferências sobre os tratamentos. A prednisolona, controle positivo empregado no experimento, apresentou algum efeito em atenuar a colite, que não foi mais evidente porque a doença foi relativamente leve nesses animais. Esse efeito não foi estatisticamente significativo. A prednisolona é um dos glicocorticoides mais utilizados no tratamento da colite ulcerativa. Essa classe de fármacos atenua o processo inflamatório através da redução dos níveis de mediadores pró-inflamatórios como COX-2, e em algumas citocinas inflamatórias (ROGLER, 2010). Estudos anteriores em modelos de colite ulcerativa empregaram esse fármaco como controle positivo dos experimentos (WITAICENIS, 2010; KESHAVARS et al., 2013; COSTA et al., 2015).

A fração SAO2 provocou aumento nas atividades de MPO e EPO em relação ao controle não tratado, sugerindo um efeito pró-inflamatório. Entretanto, no controle não estimulado com TNBS, esse efeito não foi observado. Assim, não se pode afirmar que a fração seja pró-inflamatória ou indutora de colite ulcerativa, mas sim que provavelmente atua

sinergisticamente com o TNBS. O mesmo foi observado para o escore clínico, no qual o grupo tratado com a fração pareceu sofrer uma piora clínica.

Além da atividade anti-inflamatória e antidiarreica, um fator adicional deve ser levado em consideração no modelo de colite ulcerativa: acredita-se que alterações na microbiota intestinal possam causar ou agravar as lesões características da doença. Segundo Sartor (2008), a homeostase intestinal depende do equilíbrio entre a presença da microbiota natural do epitélio e de patógenos, e esse equilíbrio pode ser afetado pelo uso de antibióticos. Assim, substâncias que possuam atividade antimicrobiana poderiam afetar o desenvolvimento da colite, agravando ou atenuando o desenvolvimento do processo inflamatório. A atividade antimicrobiana de cascas de *S. adstringens* já foi amplamente descrita, contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos (AUDI et al., 1999; TOLEDO, 2002; ISHIDA et al., 2006; SANCHES et al., 2005). Assim, é possível supor que a fração SAO2 seja capaz de afetar a microbiota intestinal dos animais, e por isso tenha agravado o desenvolvimento da colite ulcerativa.

Outra possibilidade a ser considerada para explicar a inatividade da fração é que a posologia não tenha sido correta, e o tratamento com doses excessivas de polifenóis tenha provocado o aumento da diarreia e do processo inflamatório.

As substâncias presentes na fração SAO2 (vide capítulo III), ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina e galato de epigalocatequina, apresentam atividade anti-inflamatória descrita na literatura (vide itens I.1, II.1 e II.2). Também foram relatados os efeitos atenuantes da colite ulcerativa apresentados por polifenóis, como os flavonoides quercetina (SANCHEZ DE MEDINA et al., 2002) e hesperidina (CRESPO et al., 1999), e taninos como epigalocatequina (MOCHIZUKI & HASEGAWA, 2010) e ácido gálico (PANDURAGAN et al., 2015).

Diversos extratos ricos em polifenóis apresentaram atividade em modelo de colite induzida por TNBS. O extrato rico em antocianidinas obtido de *Vaccinium ashei*, administrado por via oral uma vez ao dia, nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg, promoveu recuperação significativa do peso e redução da diarreia, além de reduzir a mortalidade dos animais e diminuir os níveis de IL-12, TNF- α , IFN- γ e óxido nítrico, em modelo de colite ulcerativa induzida por TNBS em ratos (WU et al., 2011). Já o extrato aquoso de cascas de *Cinnamomum cassia*, rico em polifenóis, administrado na dose de 50 μ g/g por via oral, durante 20 dias, reduziu a perda de peso e a mortalidade dos animais, bem como os níveis de TNF- α em modelo de colite ulcerativa experimental induzida por TNBS em camundongos (KWON et al., 2011). Por sua vez, o extrato rico em polifenóis do chá verde, *Camelia*

sinensis, aumentou os níveis de antioxidantes e atenuou a severidade da colite em modelo de colite induzida por DSS em camundongos, quando incorporado na dieta dos animais a 1% m/m. Os efeitos obtidos foram análogos à sulfasalazina, fármaco padrão utilizado nos experimentos (OZ et al., 2013).

Com base nos dados relatados na literatura para polifenóis, esperava-se que a fração SAO2, enriquecida em substâncias dessa classe, fosse capaz de atenuar os efeitos da colite ulcerativa.

CAPÍTULO III

Fitoquímica das espécies vegetais selecionadas

III.1 Caracterização cromatográfica dos extratos e frações

Os extratos etanólicos de *C. lineatifolia*, *S. adstringens* e *T. glabrescens* inibiram a produção de TNF- α por células THP-1 estimuladas por LPS, indicando potencial anti-inflamatório. A fim de investigar as substâncias ou classes de metabólitos secundários responsáveis por essa atividade, a composição química dos extratos e frações foi avaliada a partir dos perfis cromatográficos obtidos por CCD de sílica gel e por CLAE-DAD.

III.1.1 Análises por CCD de sílica gel

As análises foram realizadas empregando anisaldeído, cloreto férrico e vanilina sulfúrica como reveladores. O anisaldeído foi utilizado para avaliar a complexidade dos extratos, o cloreto férrico, para avaliar a presença de polifenóis e a vanilina sulfúrica, para avaliar a presença de taninos condensados. Como substâncias de referência, foram utilizadas catequina, ácido gálico e proantocianidina A2.

Os cromatogramas obtidos para as frações aquosa e orgânica de *C. lineatifolia*, *S. adstringens* e *T. glabrescens* estão demonstrados na Figura 19.

De forma geral, os perfis cromatográficos das frações aquosas e orgânicas das três espécies vegetais foram semelhantes, com predomínio de substâncias polares. Como esperado, as frações aquosas apresentaram bandas com menor valor de fator de retenção (Rf), devido à presença de compostos mais polares, não exibindo bandas com Rf equivalentes aos das substâncias de referência avaliadas (catequina, ácido gálico e proantocianidina A2).

A revelação com anisaldeído resultou no aparecimento de manchas de colorações variadas. A comparação dos valores de Rf e das colorações sugeriu a presença de catequina e proantocianidina A2 na fração orgânica de *S. adstringens*, mas não para as outras frações. Esse revelador não se mostrou adequado para a revelação do ácido gálico, que apareceu apenas como uma banda muito fraca, com tempo de retenção semelhante ao da catequina, e, por isso, não pode ser identificada nas frações analisadas (Figura 23, cromatograma 1).

Na revelação com o cloreto férrico, foi possível visualizar uma mancha azul forte referente ao ácido gálico, e uma mancha correspondente na fração orgânica de *S. adstringens*, sugerindo a presença dessa substância na fração. A catequina apresentou Rf semelhante ao do ácido gálico, mas, com esse revelador, não foi possível identificar bandas semelhantes em todas as frações analisadas, apenas na fração aquosa de *S. adstringens*, na qual também se identificou a presença de uma banda de menor intensidade, com coloração e Rf semelhantes à proantocianidina A2 (Figura 19, cromatograma 2). Esse revelador não se mostrou adequado para a análise das outras frações, uma vez que apenas bandas muito fracas foram observadas.

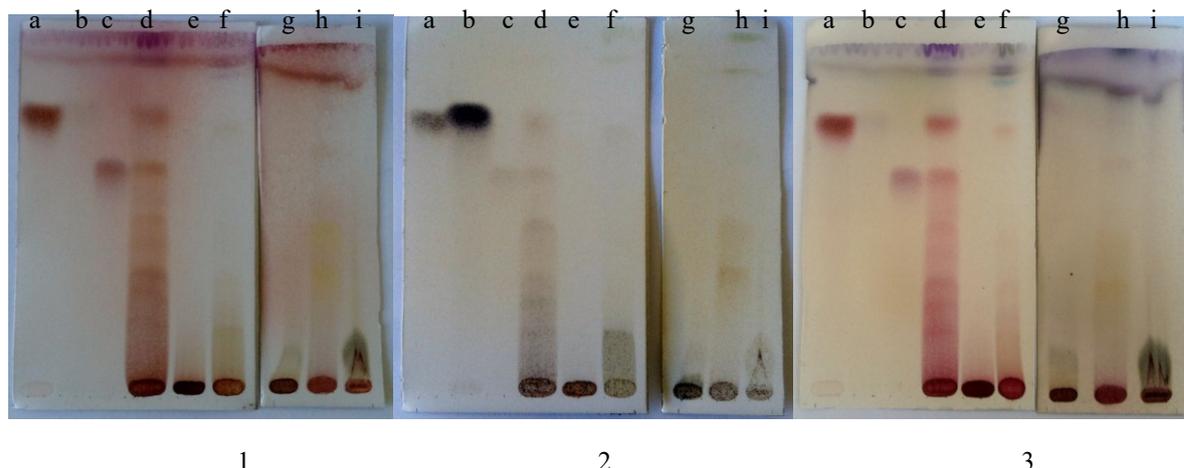


Figura 19. Perfis cromatográficos obtidos por CCD de sílica gel para extratos e frações das espécies selecionadas para estudo. Eluente: tolueno/acetona/ácido acético (3:3:1). Reveladores: anisaldeído (1), cloreto férrico (2) e vanilina sulfúrica (3). Substâncias de referência catequina (a), ácido gálico (b) e proantocianidina A2 (c). Amostras: frações orgânica (d) e aquosa (e) de *S. adstringens*, frações orgânica (f) e aquosa (g) de *T. glabrescens*, frações orgânica (h) e aquosa (i) de *C. lineatifolia*.

A revelação com vanilina sulfúrica evidenciou a presença de manchas de coloração avermelhada, compatível com a formação do complexo da vanilina com taninos condensados em todas as frações, com destaque para a fração orgânica de *S. adstringens*, que exibiu bandas com Rf e coloração semelhantes à catequina e proantocianidina A2. Também na fração orgânica de *T. glabrescens* é possível identificar a ocorrência de uma banda correspondente à catequina (Figura 19, cromatograma 3). Nas frações de *C. lineatifolia*, não foi identificada a ocorrência de bandas com Rf e coloração semelhantes aos padrões utilizados. Já o ácido gálico produziu uma coloração muito fraca com esse revelador.

III.1.2 Análises por CLAE-DAD

Os extratos e as frações foram caracterizadas por CLAE-DAD, sendo utilizadas como substâncias de referência ácido gálico, catequina, galocatequina, epigalocatequina, galato de epigalocatequina e quercetrina.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é utilizada em trabalhos de fitoquímica para monitorar etapas de isolamento e avaliar a pureza final das substâncias isoladas. Além disso, o perfil cromatográfico obtido por CLAE para extratos vegetais em condições padronizadas, denominado “impressão digital”, fornece informações sobre sua constituição qualitativa e permite caracterizar o material analisado. A obtenção deste perfil é

importante por permitir comparações qualitativas entre a composição química de diferentes extratos, ou de diferentes frações oriundas de cada extrato. A obtenção da “impressão digital” permite, ainda, identificar metabólitos secundários nos estágios iniciais da análise fitoquímica de espécies vegetais (HOSTETTMANN et al., 1997).

III.1.2.1 *Campomanesia lineatifolia*

O cromatograma do extrato etanólico apresentou picos mal resolvidos, eluídos uma como banda larga, sendo possível detectar quatro picos majoritários. A maioria dos picos elui com tempo de retenção (TR) inferior a 20 minutos, indicando componentes de média a alta polaridade (Figura 20, cromatograma a).

O perfil cromatográfico da fração orgânica de *C. lineatifolia* mostra o predomínio de substâncias de alta e média polaridades, com TR inferiores a 15 minutos. Os picos majoritários eluem entre 10 e 15 minutos. Os espectros no UV obtidos *on line* para algumas dessas substâncias são compatíveis com polifenóis, como flavonoides e taninos (MARKHAM, 1982), conforme mostrado na Figura 20b. O cromatograma também apresenta picos com máximos de absorção em torno de 280 nm (Figura 20, cromatograma b, pico 1), compatíveis com proantocianidinas (KAMYIA et al., 2001).

O cromatograma da fração aquosa de *C. lineatifolia* apresenta picos correspondentes a constituintes de polaridade alta, sendo o TR dos picos majoritários inferior a 10 minutos. De maneira semelhante à fração orgânica, os constituintes da fração aquosa também apresentam espectros no UV compatíveis com polifenóis, como flavonoides (MARKHAM, 1982) (Figura 20, cromatograma c, pico 3).

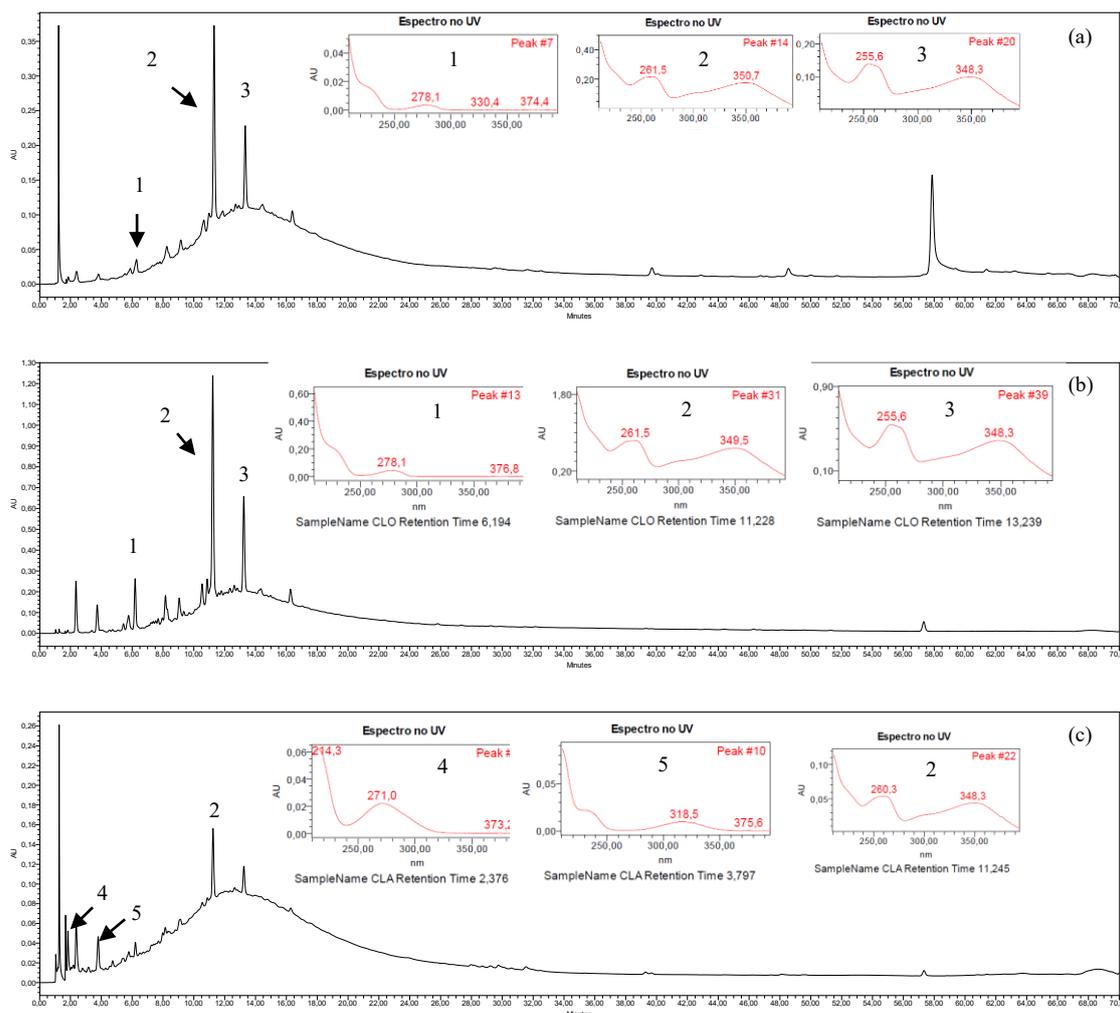


Figura 20. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para o extrato etanólico (a) e as frações orgânica (b) e aquosa (c) de *Campomanesia linearifolia*. Os espectros no UV foram obtidos *on line* pelo detector DAD para os picos majoritários. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.6. Os cromatogramas foram registrados no comprimento de onda de 220 nm. Constituintes identificados: catequina (1), quercitrina (2), polifenóis não identificados (3), (4) e (5).

Conforme esperado, observa-se a ocorrência de picos comuns ao extrato e às frações. Entretanto, a fração orgânica apresenta um perfil mais simplificado, com melhor resolução entre os picos. Dessa forma, o fracionamento do extrato por partição entre solventes imiscíveis foi satisfatória, pois resultou em frações com perfis cromatográficos diferenciados.

Para esta espécie, já foi descrita a ocorrência de quercitrina e catequina (MADALOSSO et al., 2012). O cromatograma obtido para a fração orgânica sugere a presença da quercitrina, identificada por comparação com o TR (11,2 min) e o espectro no UV de substância de referência (λ 261,5 e 349,5 nm) analisada nas mesmas condições cromatográficas. Já a catequina (TR = 6,1 min, λ 278 nm) foi identificada na fração como um

pico minoritário. Para a fração aquosa, essas substâncias foram identificadas apenas como traços. Também foi possível identificar essas substâncias no extrato etanólico (Figura 20, cromatograma a, picos 1 e 2), indicando que esses marcadores químicos, após a partição líquido-líquido, concentraram-se na fração orgânica.

III.1.2.2 *Stryphnodendron adstringens*

O extrato etanólico apresentou um perfil cromatográfico altamente complexo, com baixa resolução entre os picos, que eluíram parcialmente sobrepostos, formando uma banda larga (Figura 21, cromatograma a). A maioria dos picos apresenta TR inferior a 10 minutos, indicando a natureza polar do extrato. Os espectros no UV obtidos *on line* para alguns desses picos indicam a presença de polifenóis (Figura 21, cromatograma a).

O perfil cromatográfico registrado para a fração orgânica de *S. adstringens* revela a presença de substâncias de polaridade alta, eluídas como uma banda larga no intervalo de 4 a 16 minutos, cujo perfil espectral no UV é compatível com polifenóis (Figura 21, cromatograma b).

O cromatograma da fração aquosa de *S. adstringens* apresenta alta complexidade, destacando-se um pico intenso com TR = 1,25 min. Provavelmente este pico refere-se a diversas substâncias polifenólicas de alta polaridade, que eluíram próximo ao tempo morto do sistema cromatográfico (Figura 21, cromatograma c).

Diversos compostos fenólicos já foram isolados das cascas *S. adstringens* incluindo galocatequina, epigalocatequina, 3-*O*-galato de epigalocatequina, 4-*O*-metil-galocatequina, 3-*O*-(3,5-dimetil)-galato de epigalocatequina, 3-*O*-(3-metoxi-4-hidroxi)-benzoato de epigalocatequina, epigalocatequina (4 β -8)-galocatequina, epigalocatequina (4 β -8)-epigalocatequina, epigalocatequina (4 β -8)- 3-*O*-galato de epigalocatequina, epigalocatequina (4 β -8)- 3-*O*-*p*-hidroxibenzoato de epigalocatequina, 3-*O*-galato de epigalocatequina (4 β -8)- 3-*O*-galato de epigalocatequina, epigalocatequina (4 β -6)-epigalocatequina, galocatequina (4 α -8)-epigalocatequina, galocatequina-(4 α -8)- 3-*O*-*p*-hidroxibenzoato de epigalocatequina, robinetinidol-(4 β -8)-epigalocatequina, robinetinidol-(4 β -8)-galocatequina, robinetinidol-(4 α -8)-epigalocatequina, robinetinidol-(4 β -8)-3-*O*-galato de epigalocatequina, robinetinidol-(4 β -6)-galocatequina, robinetinidol-(4 β -6)-epigalocatequina e robinetinidol-(4 α -8)-3-*O*-galato de epigalocatequina (MELLO et al., 1996a,b). Esses componentes são de difícil separação, devido à alta massa molecular e polaridade semelhantes, o que explicaria a banda larga no cromatograma (eluição entre 4 e 16 min), referente ao cluster de taninos de alta polaridade.

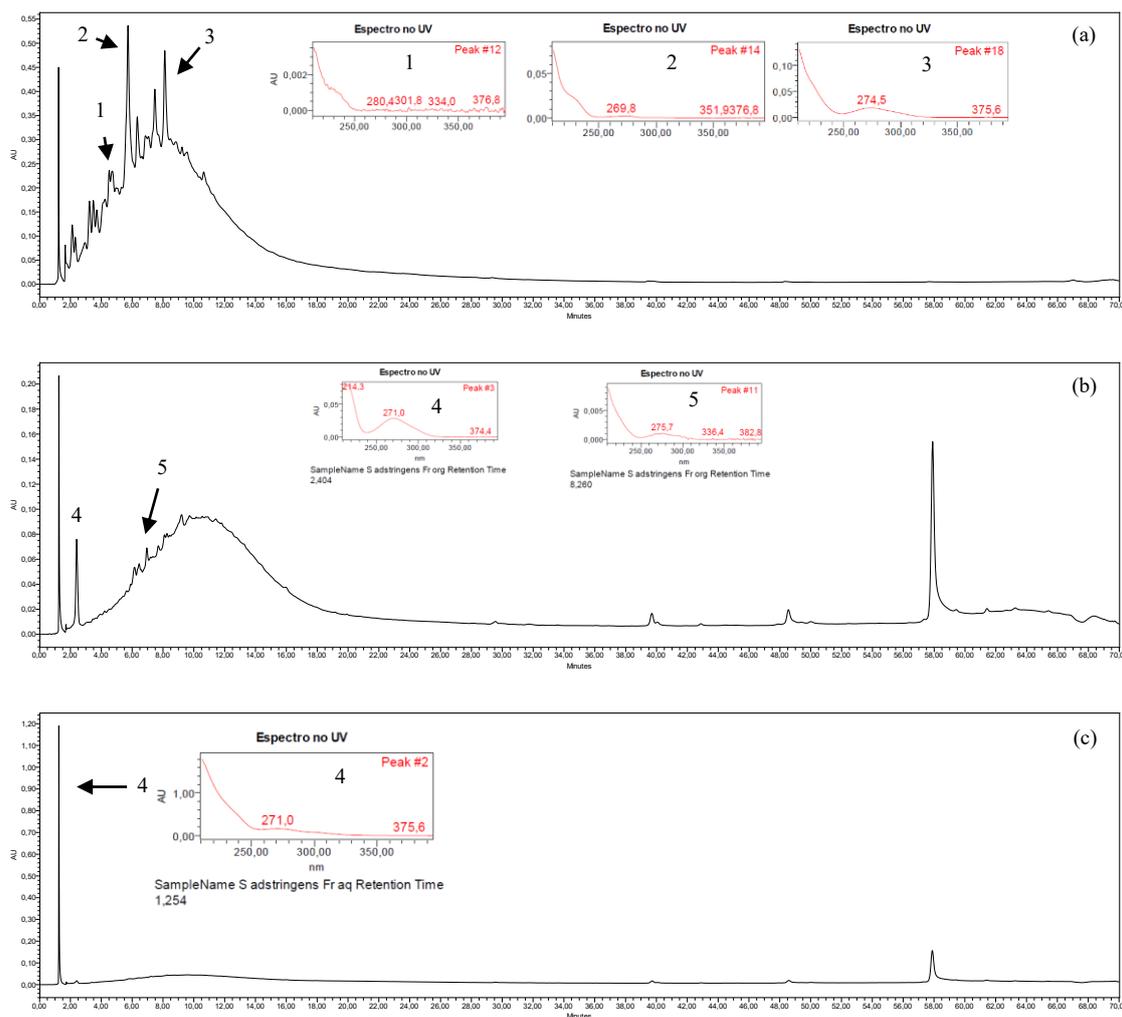


Figura 21 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para o extrato etanólico (a) e as frações orgânica (b) e aquosa (c) de *Stryphnodendron adstringens*. Os espectros no UV foram obtidos *on line* pelo detector DAD para os picos majoritários. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.6. Os cromatogramas foram registrados no comprimento de onda de 220 nm. Constituintes identificados: polifenóis não identificados (1-3, 5), ácido gálico (4).

Na fração orgânica, foi detectada a presença de ácido gálico (TR 4,4 min, λ 215,5 e 271,0 nm), mas não foram identificados picos relativos à galocatequina e galato de epigalocatequina devido à baixa resolução cromatográfica. De maneira semelhante, não foi possível detectar a presença de ácido gálico, galocatequina e galato de epigalocatequina na fração aquosa de *S. adstringens*, a partir da comparação com os tempos de retenção de substâncias de referência eluídas nas mesmas condições.

III.1.2.3 *Terminalia glabrescens*

O perfil cromatográfico obtido para o extrato etanólico mostrou que o material é de alta polaridade, com a maioria dos picos eluindo com TR inferior a 15 minutos, porém, com resolução superior aos extratos anteriores (Figura 22, cromatograma a).

O cromatograma da fração orgânica de *T. glabrescens* indica a presença de substâncias de diferentes polaridades, sendo a maioria de polaridade média a alta, com TR inferior a 15 minutos. Os espectros no UV obtidos *on line* para algumas dessas substâncias são compatíveis com flavonoides (MARKHAM, 1982) (Figura 22, cromatograma b).

Já o cromatograma da fração aquosa de *T. glabrescens* apresentou um perfil mais simplificado, com o predomínio de picos com tempo de retenção inferior a 10 minutos, correspondendo a substâncias de maior polaridade em relação às substâncias presentes na fração orgânica, conforme esperado. Os perfis espectrais de algumas dessas substâncias são compatíveis com polifenóis, como flavonoides (MARKHAM, 1982) (Figura 22, cromatograma c).

O pico majoritário do extrato etanólico (Figura 22, cromatograma a, pico 3) não foi identificado nos cromatogramas das frações orgânica e aquosa. Isso pode ser devido à degradação da substância, que apresenta máximo de absorção próximo a 280 nm, característico de proantocianidinas.

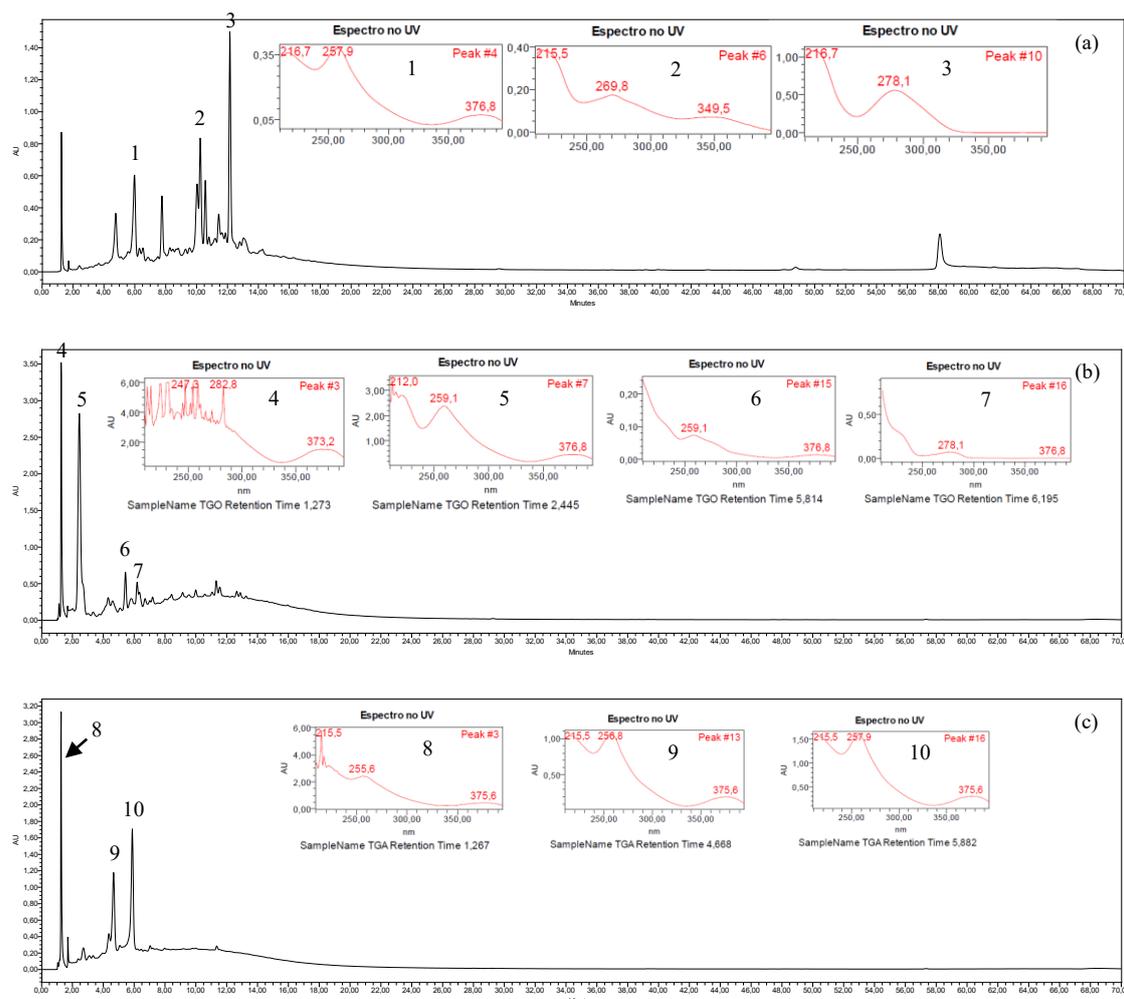


Figura 22 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para o extrato etanólico (a) e as frações orgânica (b) e aquosa (c) de *Terminalia glabrescens*. Os espectros no UV foram obtidos *on line* pelo detector DAD para os picos majoritários. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.6. Os cromatogramas foram registrados no comprimento de onda de 220 nm. Constituintes identificados: polifenóis não identificados (1-9), catequina (10).

Para essa espécie, já foi descrita a ocorrência dos ácidos $3\beta,6\beta,23,28$ -tetraidroiolean-12-ene, ursólico, 2α -hidroxiúrsico, oleanólico, maslínico, arjunólico, sumaresinólico e asiático, além de esqualeno, fitol, sitosterol-3- O - β -D-glicopiranosídeo, n -alcanos, friedelina, taraxerol, lupeol, lupenona, betulina, betulona, ácido betulínico, arjunglicosídeo, estigmastane- $3\beta,6\alpha$ -diol, β -sitosterol, catequina, β -D-pirantagatose, β -D-furanofrutose e α -D-furanofrutose (GARCEZ et al., 2003).

Na análise do cromatograma da fração aquosa, realizada a partir da comparação com o tempo de retenção de substâncias de referência injetadas nas mesmas condições, não foi constatada a presença da catequina, ao contrário da fração orgânica, que apresentou um pico

com tempo de retenção e máximos de absorção (6,1 minutos e λ 278,1 e 376,8 nm) compatíveis com essa substância. No perfil cromatográfico do extrato etanólico, também não foi possível identificar o pico relativo à catequina.

III.2 Estudo fitoquímico de *S. adstringens*

A fração orgânica de *S. adstringens* apresentou significativa atividade anti-inflamatória em modelo de inflamação aguda induzida por LPS na cavidade articular do joelho de camundongos (vide capítulo II), sendo, por isso, selecionadas para fracionamento. Análises químicas preliminares dessas frações indicaram a ocorrência, entre outras substâncias, de proantocianidinas (vide item III.1).

III.2.1 Análise de *S. adstringens* por CLAE-DAD em condições otimizadas

Na análise cromatográfica inicial utilizando gradiente exploratório, as frações aquosa e orgânica de *S. adstringens* mostraram-se altamente complexas, e com cromatogramas pouco resolvidos, com a maioria das substâncias eluindo com tempo de retenção máximo de 15 minutos, conforme discutido anteriormente (Figura 21, item III.1.2.2). Por isso, novo método de análise por CLAE, com gradiente de eluição mais curto e coluna cromatográfica mais longa, foi utilizado (NASCIMENTO et al., 2013).

O cromatograma da fração orgânica (SAO) obtido nessa condição cromatográfica está representado na Figura 23.

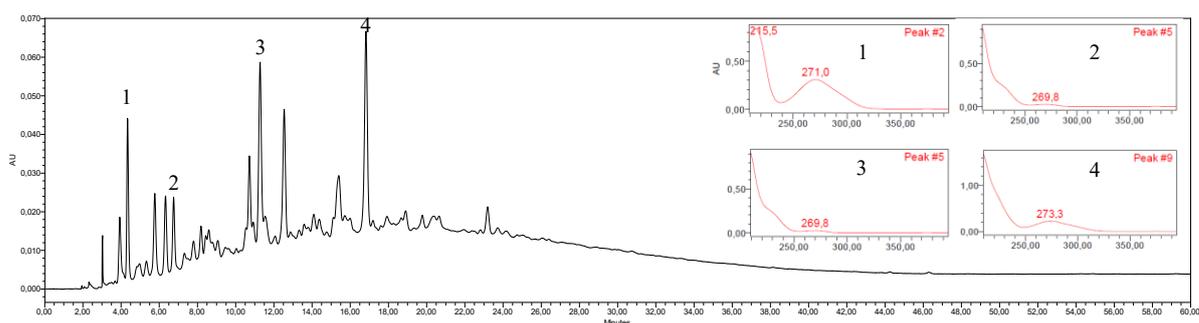


Figura 23 – Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD para a fração orgânica de *S. adstringens* (SAO), registrado no comprimento de onda de 220 nm. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.7. Constituintes identificados: ácido gálico (1), galocatequina (2), epigalocatequina (3) e galato de epigalocatequina (4).

Os cromatogramas obtidos nesta condição cromatográfica apresentaram melhor resolução, em comparação com a condição anterior. Verificou-se, no cromatograma registrado

para SAO, a ocorrência de onze picos majoritários, dos quais a maioria apresenta espectros no UV compatíveis com polifenóis, possivelmente relativos à prodelfinidinas.

A fim de identificar constituintes químicos já descritos para *S. adstringens* na fração SAO, as substâncias de referências catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina, galato de epigalocatequina e ácido gálico foram analisadas nas mesmas condições cromatográficas. Os tempos de retenção e máximos de absorção no UV obtidos para essas substâncias estão descritos na Tabela 13. A presença/ausência dos marcadores químicos na fração foi adicionalmente confirmada pela adição das substâncias de referência à fração.

A análise do cromatograma registrado para SAO e a comparação com os dados das substâncias de referência (Tabela 13) indicou a ausência de catequina e epicatequina na fração. A ocorrência de catequina em *S. adstringens* foi previamente relatada por Nascimento e colaboradores (2013). Esta divergência pode estar relacionada com diferenças na composição química dos materiais analisados, que podem ser ocasionadas por condições ambientais do local onde o vegetal cresceu ou da época de coleta. Galocatequina, epigalocatequina, galato de epigalocatequina e ácido gálico foram identificados na fração.

Tabela 13 – Tempos de retenção (TR min) e máximos de absorção (λ nm) no UV registrados para substâncias de referência em análises por CLAE-DAD. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.7.

Substância	Tempo de retenção (min)	Máximos de absorção (nm)
Ácido gálico	4,4	215,5; 271,0; 375,6
Galocatequina	7,0	269,8
Epigalocatequina	11,0	269,8
Catequina	12,3	278,1; 376,8
Epicatequina	16,5	278,1; 376,8
Galato de epigalocatequina	17,2	274,5; 376,8

A fração aquosa de *S. adstringens* (SAA) também foi analisada utilizando o método cromatográfico proposto por Nascimento et al. (2013) e o cromatograma obtido está representado na Figura 24. O perfil obtido revelou-se altamente complexo, com predomínio de uma banda larga de eluição no intervalo de 2 a 40 minutos, resultante da sobreposição de diferentes constituintes químicos. Esta característica inviabilizou a comparação com as substâncias de referência.

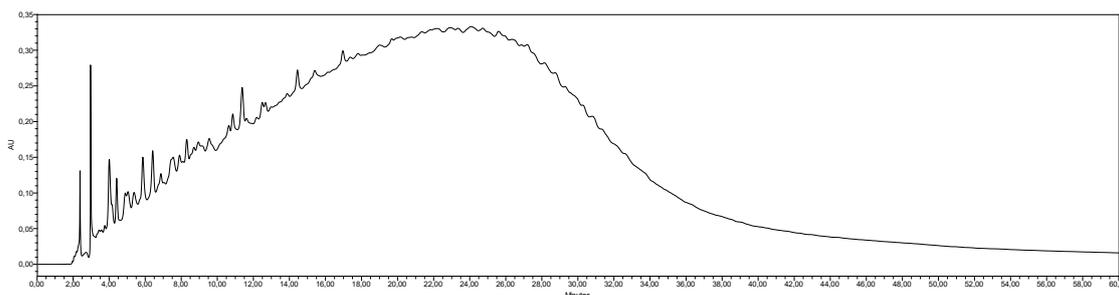


Figura 24 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD para a fração aquosa de *S. adstringens* (SAA), registrado no comprimento de onda de 220 nm. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.7.

III.2.2 Caracterização fitoquímica da fração orgânica de *S. adstringens* (SAO) por UPLC-MS-ESI

Tendo em vista a atividade inibitória da migração de leucócitos para a cavidade articular do joelho de camundongos desafiados com LPS e com CFA induzida por SAO, esta fração teve sua composição química analisada por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massas com ionização por eletrospray (UPLC-MS-ESI).

Nas condições estabelecidas, 12 substâncias foram identificadas (Figura 25) a partir da análise dos dados espectrais (UV e ESI-MS) e comparação com substâncias de referência ou com dados previamente publicados para substâncias isoladas de *S. adstringens* (MELLO et al., 1996a; 1996b; 1999). Os resultados obtidos indicam a presença de flavan-3-óis e derivados, incluindo isômeros, com ou sem substituintes nos anéis A e B. Foram identificados monômeros e dímeros. A composição química de SAO obtida a partir das análises por UPLC-MS-ESI está disposta na Tabela 14 e os cromatogramas registrados para a fração constam da Figura 25.

Para confirmar as atribuições propostas, foi realizado o experimento de UPLC-ESI-MS/MS, buscando pelos fragmentos filhos de cada íon *quasi*-molecular, no modo de ionização negativo.

A técnica, que utiliza dois analisadores de massa acoplados, permite que os íons precursores sejam inicialmente separados e selecionados pela razão massa/carga por um analisador de massas, sendo, então, fragmentados. Os fragmentos gerados são então caracterizados por um segundo analisador de massas e identificados com a razão massa/carga.

Na técnica ESI-MS, ocorre a ionização simultânea de uma grande variedade de substâncias presentes na fração. Por outro lado, em ESI-MS/MS, é possível selecionar a massa do fragmento que se quer caracterizar e, por isso, é possível identificar quais são os

fragmentos oriundos desse, permitindo assim a confirmação estrutural de moléculas e reduzindo interferência de coeluição de compostos oriundos da matriz.

As condições de eluição empregadas no experimento de UPLC-ESI-MS/MS foram distintas daquelas utilizadas no experimento anterior, com redução no tempo de eluição e fluxo. Nas condições cromatográficas empregadas, não se obteve boa resolução dos picos, mas as análises de MS/MS possibilitaram confirmar a identificação dos constituintes. O cromatograma obtido para SAO nesse método é exibido na Figura 26. A descrição da identificação de cada constituinte, com base nos dados de fragmentação, é apresentada na sequência.

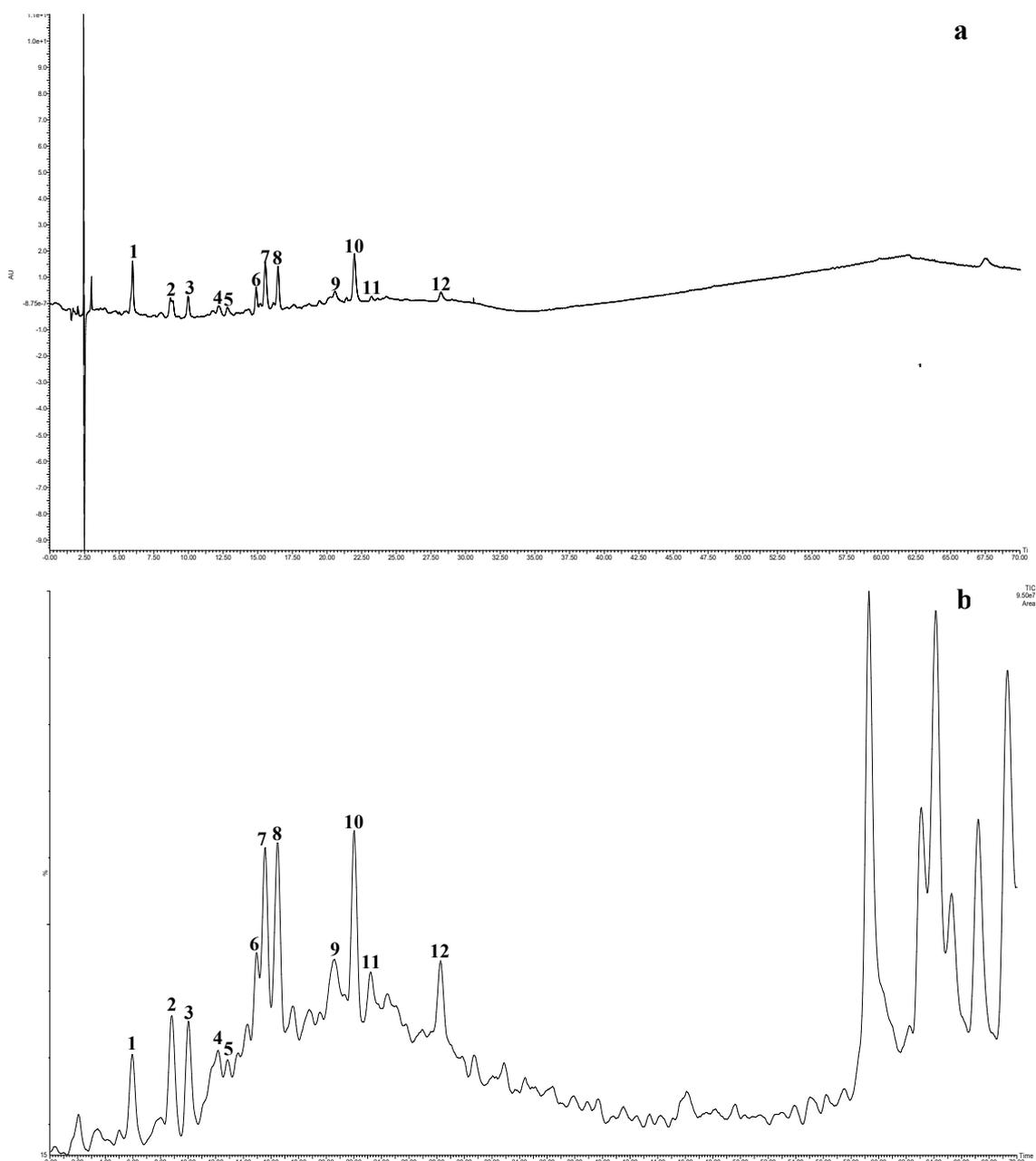


Figura 25 - Cromatogramas da fração orgânica de *S. adstringens* (SAO), registrados com detector DAD em comprimento de onda 220 nm (a) e por UPL-MS-ESI no modo de detecção negativo (ESI-) (b). Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.8. Substâncias identificadas: **1** ácido gálico (TR 5,96), **2** dímero composto de duas unidades de (epi)galocatequina (TR 8,70), **3** galocatequina (TR 9,98), **4** dímero composto de duas unidades de galato de (epi)galocatequina (TR 12,17), **5** dímero composto de uma unidade de galato de 4'-*O*-metil-(epi)galocatequina e uma unidade de galato de (epi)galocatequina (TR 12,84), **6** epigalocatequina (TR 14,88), **7** dímero composto de uma unidade de (epi)galocatequina e uma unidade de galato de (epi)galocatequina (TR 15,54), **8** 4'-*O*-metil-galocatequina (TR 16,60), **9** dímero composto de duas unidades de galato de (epi)galocatequina (TR 20,57), **10** galato de epigalocatequina (TR 21,97), **11** dímero composto de uma unidade de 4'-*O*-metil-(epi)galocatequina e uma unidade de (epi)galocatequina (TR 23,25) e **12** galato de 4'-*O*-metil-galocatequina (TR 28,2). As substâncias 1, 3, 6 e 10 foram identificadas por comparação com padrões, as outras por análises de MS.

Tabela 14. Atribuições dos picos e dados de fragmentações obtidos pelas análises de SAO por UPLC-MS-ESI.

Nº	Substâncias postuladas	TR (min)	λ max (nm)	Íons ESI ⁻ (m/z)	Íons ESI ⁺ (m/z)	MM (g/mol)	Fórmula molecular
1	Ácido gálico	5,96	212,3; 269,3	169 [M-H] ⁻ , 183 [M+Na] ⁻ , 125	-	170	C ₇ H ₆ O ₅
2	Dímero: duas unidades de (epi)galocatequina	8,70	210,3	609 [M-H] ⁻ , 137, 305, 423, 441	611 [M+H] ⁺ , 142, 307	610	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄
3	Galocatequina	9,98	210,3	305 [M-H] ⁻ , 165	307 [M+H] ⁺ , 142, 164	306	C ₁₅ H ₁₄ O ₇
4	Dímero: duas unidades de galato de (epi)galocatequina	12,17	210,3	913 [M-H] ⁻ , 137, 259, 382, 445, 544, 761	915 [M+H] ⁺ , 164, 1241	914	C ₄₄ H ₃₄ O ₂₂
5	Dímero: galato de 4'-O-metil-(epi)galocatequina e galato de (epi)galocatequina	12,84	210,3	927 [M-H] ⁻ , 137, 305, 609	164, 930, 961	928	C ₄₅ H ₃₈ O ₂₂
6	Epigalocatequina	14,88	210,3	305 [M-H] ⁻ , 137, 167, 179, 615	164, 187, 208, 442, 476	306	C ₁₅ H ₁₄ O ₇
7	Dímero: (epi)galocatequina e galato de (epi)galocatequina	15,54	210,3	761 [M-H] ⁻ , 137, 423, 591, 609	763 [M+H] ⁺ , 164, 208, 305	762	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₈
8	4'-O-metil-galocatequina	16,50	210,3	319 [M-H] ⁻ , 137, 220, 304	321 [M+H] ⁺ , 164	320	C ₁₆ H ₁₆ O ₇
9	Dímero: duas unidades de galato de (epi)galocatequina	20,57	210,3	913 [M-H] ⁻ , 137, 607, 761, 775	915 [M+H] ⁺ , 164, 317	914	C ₄₄ H ₃₄ O ₂₂
10	Galato de epigalocatequina	21,97	210,3	457 [M-H] ⁻ , 137, 169, 219, 287, 305, 331, 480	459 [M+H] ⁺ , 164, 289, 949	458	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁
11	Dímero: 4'-O-metil-(epi)galocatequina e (epi)galocatequina	23,25	210,3	623 [M-H] ⁻ , 137, 319, 423, 606, 722	625 [M+H] ⁺ , 164	624	C ₃₁ H ₃₀ O ₁₄
12	Galato de 4'-O-metil-galocatequina	28,2	210,3	471 [M-H] ⁻ , 137, 169, 319, 943	473 [M+H] ⁺ , 164, 187, 208, 945	472	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₁

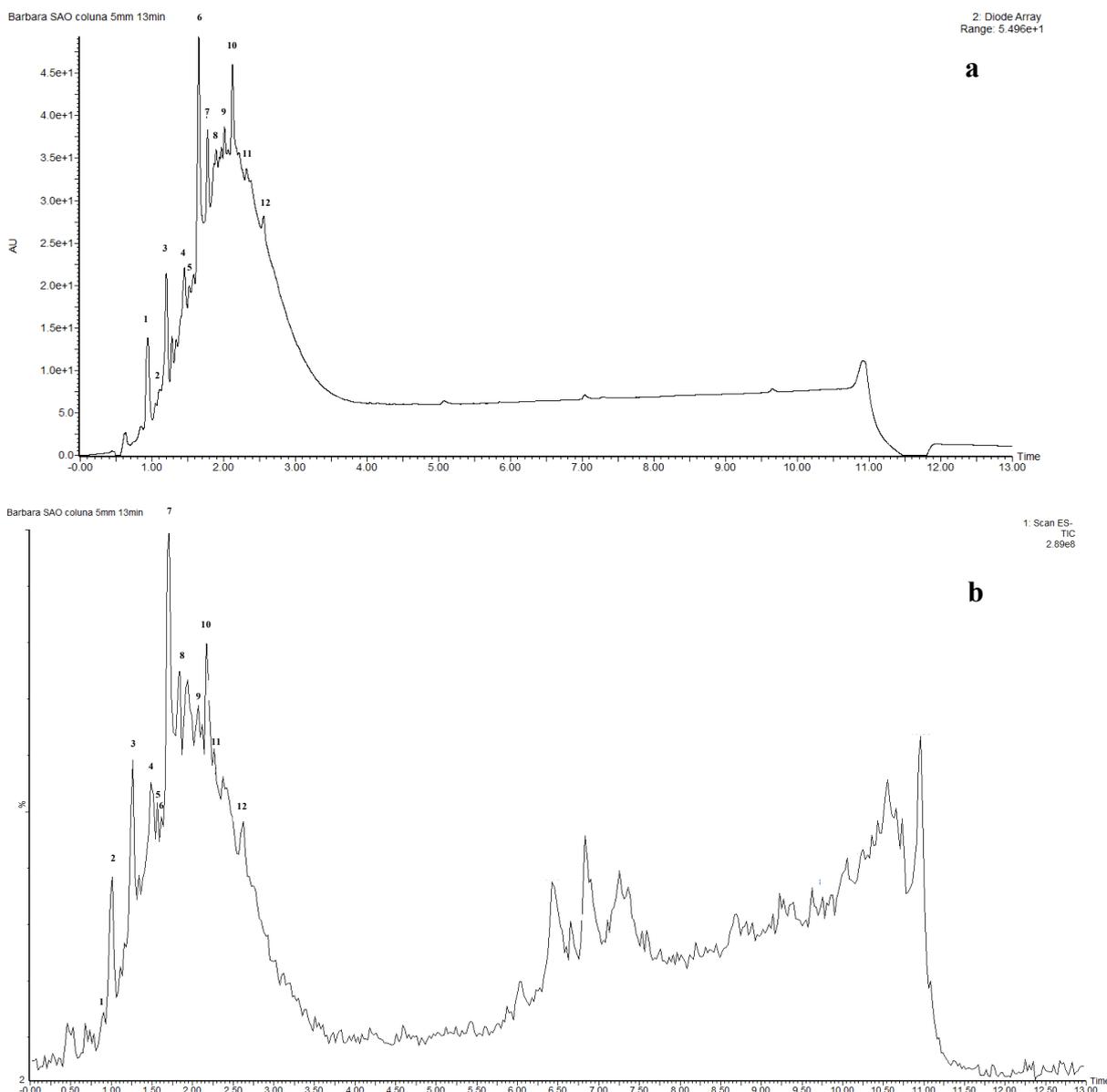


Figura 26 - Cromatogramas da fração orgânica de *S. adstringens* (SAO), registrados com detector DAD em comprimento de onda 220 nm (a) e por UPL-MS-ESI no modo de detecção negativo (ESI-) (b). Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, subitem 4.8. Substâncias identificadas: **1** ácido gálico (TR 0,91), **2** dímero composto de duas unidades de (epi)galocatequina (TR 0,98), **3** galocatequina (TR 1,26), **4** dímero composto de duas unidades de galato de (epi)galocatequina (TR 1,51), **5** dímero composto de uma unidade de galato de 4'-*O*-metil-(epi)galocatequina e uma unidade de galato de (epi)galocatequina (TR 1,61), **6** epigalocatequina (TR 1,66), **7** dímero composto de uma unidade de (epi)galocatequina e uma unidade de galato de (epi)galocatequina (TR 1,71), **8** 4'-*O*-metilgalocatequina (TR 1,81), **9** dímero composto de duas unidades de galato de (epi)galocatequina (TR 2,04), **10** galato de epigalocatequina (TR 2,17), **11** dímero composto de uma unidade de 4'-*O*-metil-(epi)galocatequina e uma unidade de (epi)galocatequina (TR 2,27) e **12** galato de 4'-*O*-metilgalocatequina (TR 2,65). As substâncias 1, 3, 6 e 10 foram identificadas por comparação com padrões, as outras por análises de MS.

III.2.2.1 Ácido gálico

O ácido gálico (1) foi identificado como correspondente ao pico com TR 5,96 min (Figura 25). Este ácido foi previamente descrito como componente das cascas de *S. adstringens* (MELLO et al., 1996a), e constitui a subunidade de taninos hidrolisáveis – substâncias que possuem um poliol central, geralmente açúcares, como a glicose, esterificado com unidades galoil (BUENDÍA et al., 2010). A perda de 169 U.M.A. (massa molecular da unidade galoil) a partir do íon molecular caracteriza a fragmentação desse tipo de tanino. A identificação foi realizada pela comparação com a substância química de referência e os fragmentos no modo negativo para essa substância são exibidos na Tabela 14.

III.2.2.2 Prodelfinidinas

Várias substâncias presentes em SAO apresentaram perfil de fragmentação em UPLC-MS-ESI característico de prodelfinidinas. Essas substâncias são subunidades de taninos condensados – polímeros de flavan-3-óis que apresentam uma rica diversidade estrutural resultante dos padrões de substituição entre as unidades flavânicas, além de diversidade nas posições de ligação das unidades e na estereoquímica dessas ligações. As ligações podem ser do tipo C-C ou C-O, originando dímeros, trímeros ou tetrâmeros (SANTOS & MELLO, 2004).

Prodelfinidinas são um tipo especial de tanino condensado, que possuem os carbonos C-5 e C-3' hidroxilados. A fragmentação de substâncias dessa classe é caracterizada pela perda um fragmento de 305 Da a partir do íon molecular, o que indica a presença de unidades de galocatequina ou epigalocatequina na estrutura molecular.

Outra característica de fragmentação de prodelfinidinas é a fissão de Retro-Diels-Alder (RDA) do núcleo, com ruptura do anel C, o que gera o fragmento em m/z 137 no modo negativo, uma quinona metídeo (ZYWICKI et al., 2002). Uma proposta da fissão de RDA está demonstrada na Figura 27. Nas análises por ESI, o fragmento em m/z 137 Da apareceu em todas as prodelfinidinas analisadas (picos 2-12) e, para algumas delas, este fragmento corresponde ao pico base.

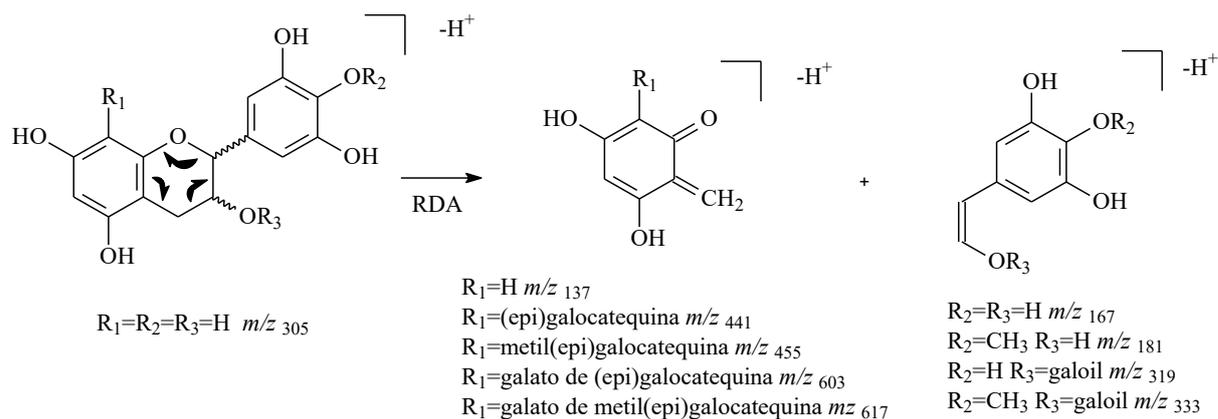


Figura 27 – Proposta de fragmentação de prodelfinidinas por fissão de Retro-Diels-Alder (ZYWICKI et al., 2002).

Para confirmar que o fragmento em m/z 137 Da é oriundo da fissão por RDA, foram realizados experimentos de ESI-MS/MS, buscando pelos íons pais desse fragmento. O íon *quasi*-molecular foi detectado para as substâncias **2**, **4**, **7**, **8**, **9** e **10**. A título de exemplo, os espectros das substâncias **7** e **8** estão demonstrados na Figura 28.

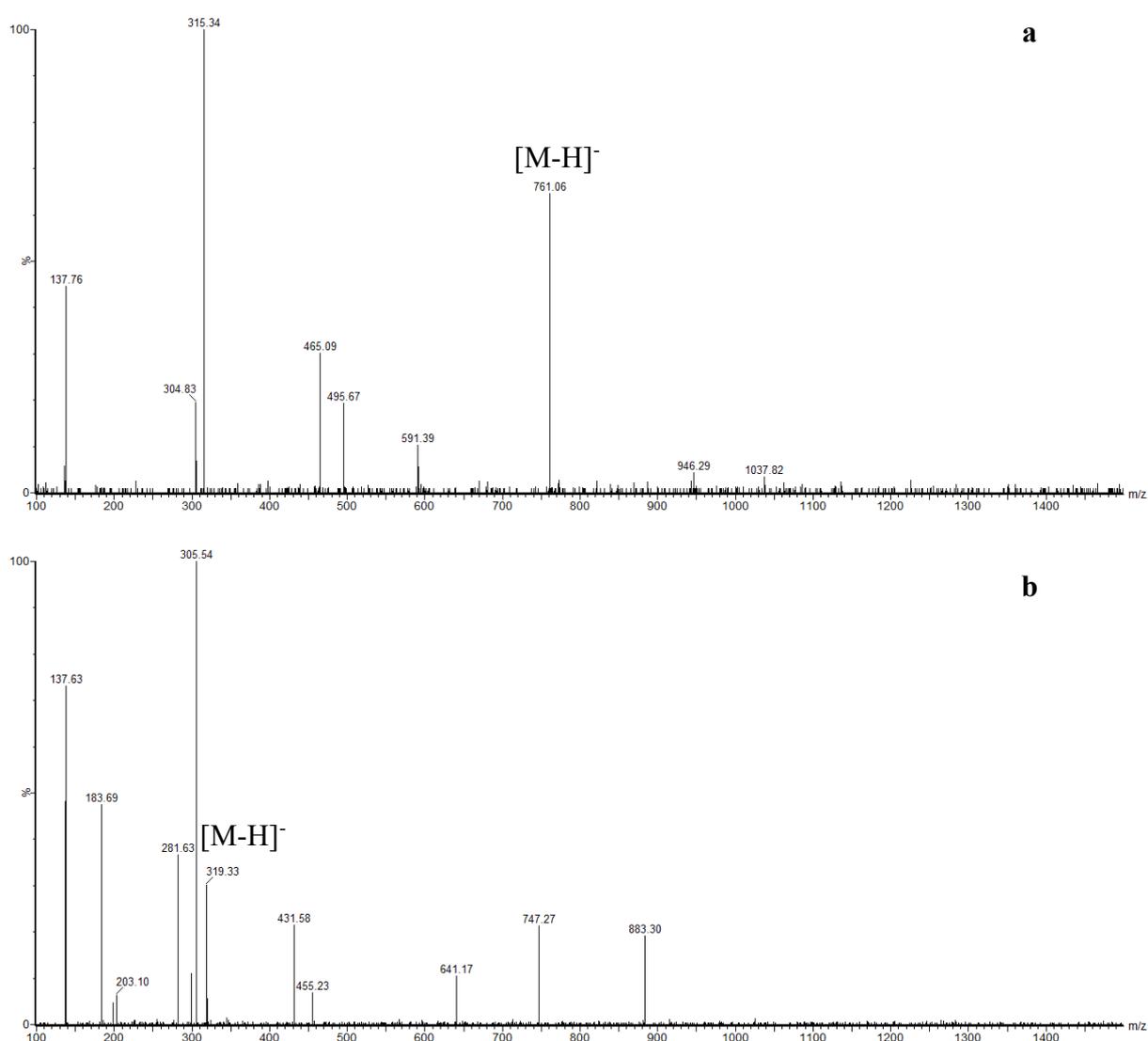


Figura 28 – Espectro de ESI-MS/MS obtido no modo negativo de ionização, indicando os íons pais do fragmento em m/z 137 Da, revelando a presença do íon *quasi*-molecular para as substâncias **7** (RT 1,69 min, a), **8** (RT 1,81 min, b), por CLUE-EM. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.8.

III.2.2.2.1 Monômeros de prodelfinidinas identificados por comparação com substâncias de referência

Três monômeros de prodelfinidinas previamente descritos em *S. adstringens* (MELLO et al., 1996a) foram identificados na fração SAO (Figura 25) através da comparação com substâncias de referência: galocatequina (**3**), epigalocatequina (**6**) e galato de epigalocatequina (**10**). Os fragmentos obtidos nos modos positivo e negativo para essas substâncias são exibidos na Tabela 14.

III.2.2.2.2 Outros monômeros de prodelfinidinas

Além das substâncias identificadas por comparação com substâncias de referência, descritas anteriormente, outros monômeros foram identificados a partir da análise dos dados espectrais e comparação com dados previamente relatados para constituintes da espécie (MELLO et al., 1996a).

A substância **8**, que eluiu com TR de 16,50 min, foi identificada como 4'-*O*-metil-galocatequina.

O espectro obtido para a substância **8** exibe o pico do íon *quasi*-molecular em m/z 319 $[M-H]^-$, no modo negativo de ionização, e em m/z 321 $[M+H]^+$, no modo positivo (Figura 30). Também foi detectada a presença de fragmento em m/z 304 $[M-15-H]^-$, atribuído à perda de um grupo metila. Por sua vez, o pico em m/z 137 $[M-182-H]^-$ (pico base) observado no modo negativo de ionização foi atribuído à quinona metídeo, formada a partir da fissão de RDA (conforme Figura 27). O íon *quasi*-molecular foi detectado no espectro em MS/MS no modo negativo, confirmando a massa molecular proposta (Figura 30).

Essa fragmentação está demonstrada na Figura 29, e os espectros no modo negativo, positivo e de MS/MS, na Figura 30.

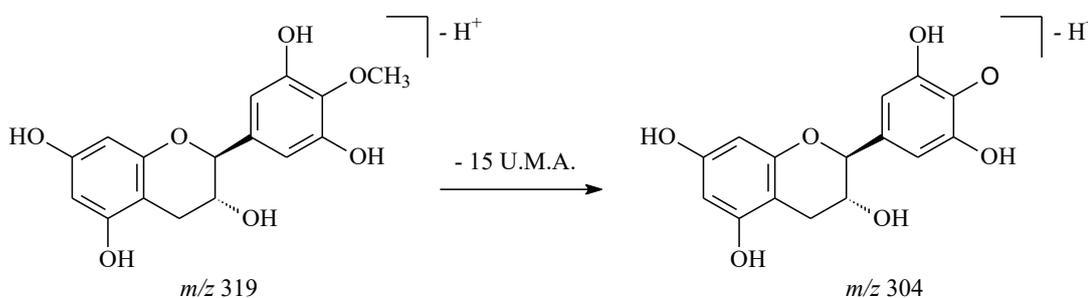


Figura 29 – Fragmentos obtidos por UPLC-MS-ESI para a substância correspondente ao pico com TR de 16,50 min, identificada como 4'-*O*-metil-galocatequina (**8**).

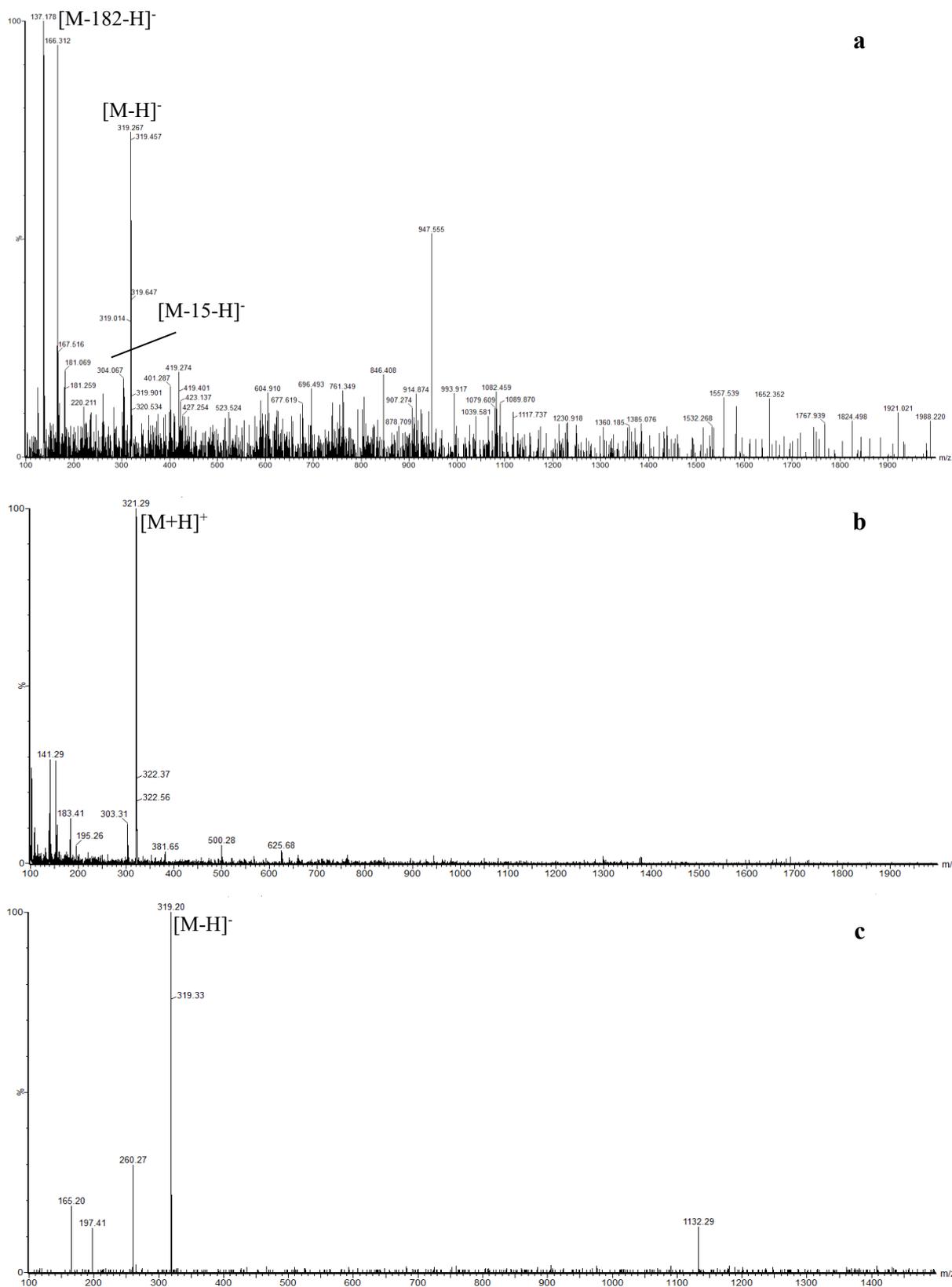


Figura 30 – Espectro de massas da substância **8** (4'-O-metil-galocatequina, TR= 16,50 min) no modo negativo (a) e no modo positivo (b) por UPLC-ESI-MS e de MS/MS (c). Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.6.

Além dos monômeros descritos anteriormente, também foi identificado um constituinte não descrito por Mello e colaboradores (1996a). Esta substância (**12**) apresentou um TR de 28,22 minutos nas análises por UPLC-MS-ESI, e foi identificada como galato de *O*-metil-(epi)galocatequina.

O espectro obtido para **12** no modo negativo de ionização exibe o pico do íon *quasi*-molecular em m/z 471 $[M-H]^-$, confirmado pelo pico em m/z 473 $[M+H]^+$ no modo positivo. Já o fragmento em m/z 169 $[M-302-H]^-$ foi atribuído ao resíduo de galoiil, enquanto aquele em m/z 319 $[M-152-H]^-$ foi creditado à unidade 4'-*O*-metil-galocatequina. De maneira semelhante ao observado para os monômeros descritos anteriormente, o fragmento em m/z 137 $[M-334-H]^-$ (pico base) é correspondente à quinona metídeo da fissão de RDA (conforme Figura 29). Também se observaram picos correspondentes à associação de duas unidades monoméricas em m/z 943 $[M+M-H]^-$ e 945 $[M+M+H]^+$, respectivamente nos modos negativo e positivo de ionização. O íon *quasi*-molecular foi detectado no espectro em MS/MS no modo negativo, confirmando a massa molecular proposta (Figura 32).

Essa fragmentação está demonstrada na Figura 31, e os espectros no modo negativo, positivo e de MS/MS, na Figura 32.

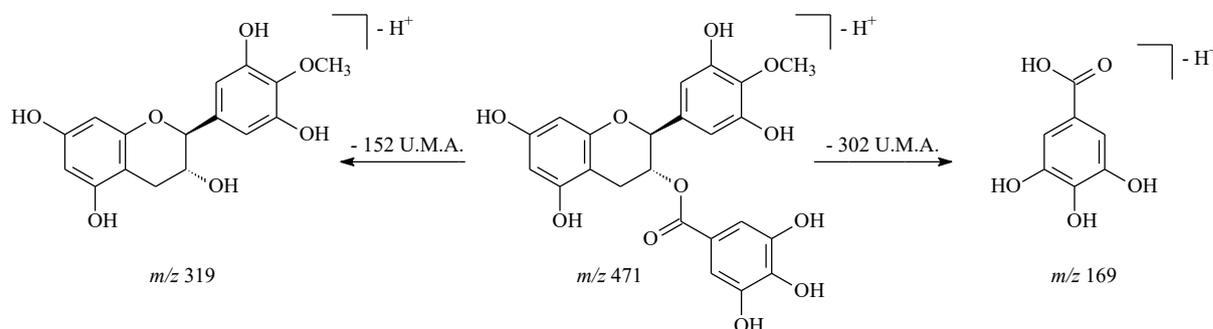
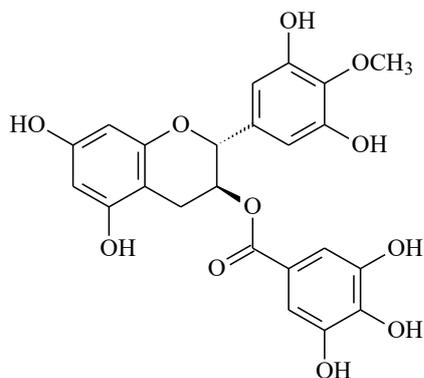


Figura 31 – Fragmentos obtidos por UPLC-MS-ESI para a substância correspondente ao pico eluído em 28,22 min, identificada como galato de 4'-*O*-metil-galocatequina (**12**).

Em comparação com o galato de epigalocatequina, a massa molecular (MM) da substância **12** apresenta mais 14 U.M.A., compatível com a presença de um grupo metila, que poderia estar localizado no núcleo prodelfinidínico ou na unidade galoiil. A localização da metila no anel B foi definida com base no fragmento em m/z 319 $[M-152-H]^-$, correspondente à MM de 305 Da da galocatequina mais 14 U.M.A.

Por outro lado, a partir dos dados de MS não é possível identificar em qual carbono do anel B da unidade de (epi)galocatequina ocorre esse substituinte, bem como não é possível

saber qual se os hidrogênios ligados aos carbonos C2 e C3 estão *cis*- ou *trans*-posicionados, ou seja, se o núcleo é galocatequina ou epigalocatequina. Contudo, uma vez que a planta produz a 4'-*O*-metil-galocatequina, infere-se que a planta conta com o sistema enzimático capaz de metilar o carbono 4' da galocatequina. Por isso, a estrutura mais provável para a substância **12** é o galato de 4'-*O*-metil-(epi)galocatequina.

**12**

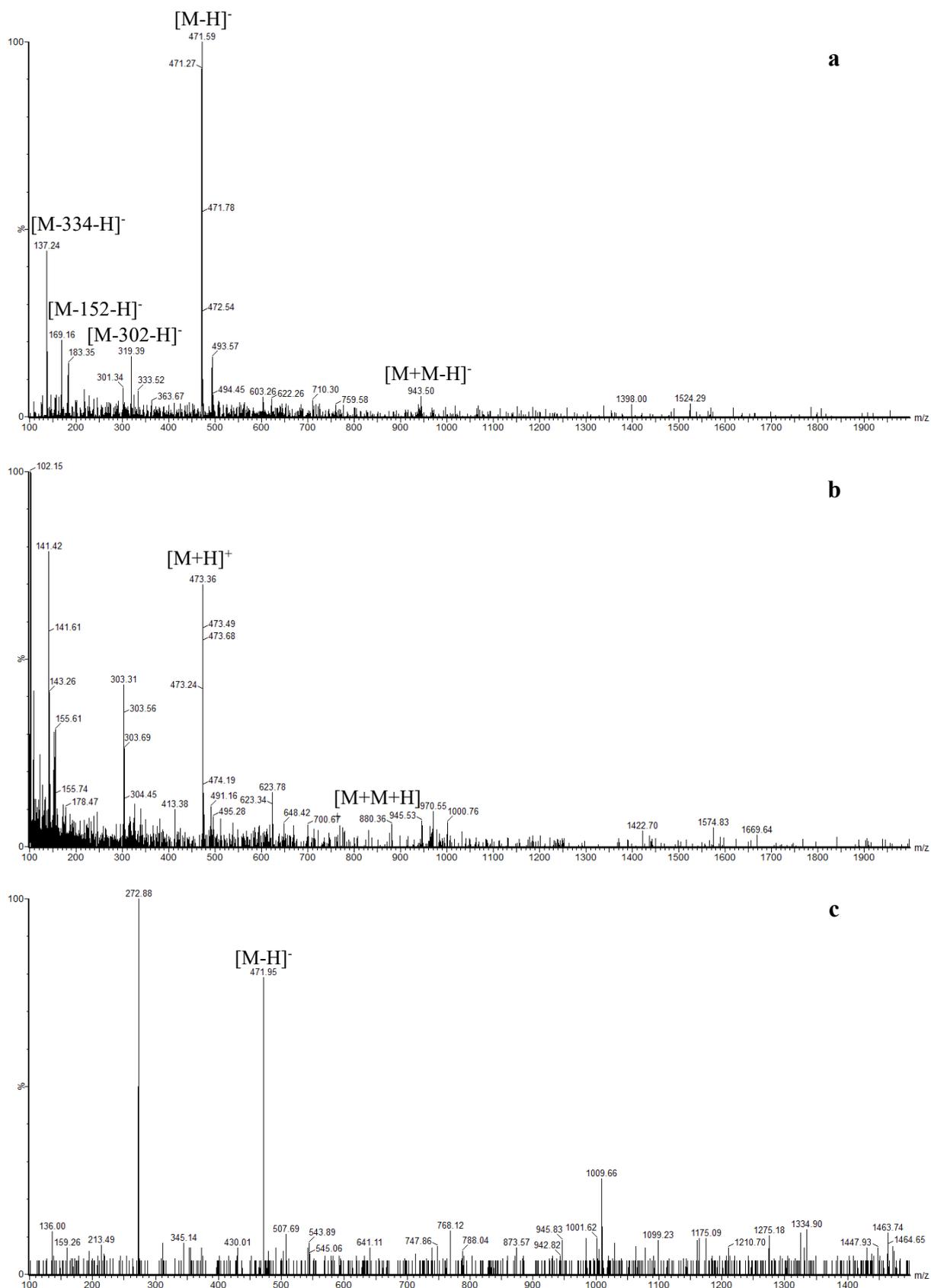


Figura 32 – Espectro de massas da substância **12** (galato de 4'-*O*-metil-galocatequina, TR= 28,22 min) no modo negativo (a) e no modo positivo (b) por UPLC-ESI-MS e de MS/MS (c). Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.6.

III.2.2.2.3 Dímeros de prodelfinidinas

Os outros seis picos majoritários no cromatograma de SAO (Figura 25) são compatíveis com dímeros de galocatequina e/ou epigalocatequina ou derivados. Esses compostos foram identificados pela comparação com dados previamente descritos na literatura para *S. adstringens* (MELLO et al., 1996a; 1996b, 1999).

Além da isomeria *cis-trans* do anel B, que diferencia os monômeros em galocatequina ou epigalocatequina, outros tipos de isomeria podem ocorrer quando se trata de dímeros. A estereoquímica da ligação entre os monômeros pode ser α ou em β (XIE & DIXON, 2005), conforme representados na Figura 33. Outra isomeria possível é a ligação entre os monômeros, que pode se dar entre o carbono 4 da unidade superior e os carbonos 6 ou 8 da unidade inferior (XIE & DIXON, 2005), como demonstrado na Figura 34.

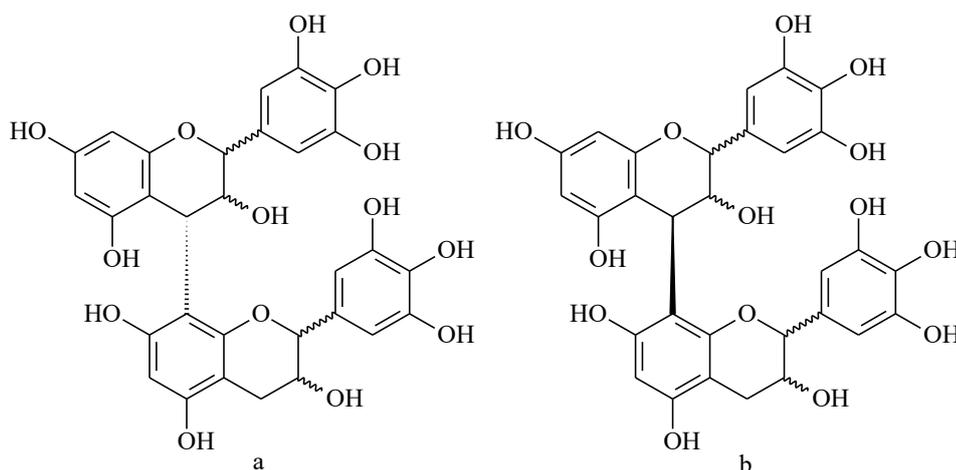


Figura 33 – Dímeros de prodelfinidinas cujos monômeros apresentam estereoquímica da ligação α (a) ou β (b). Estruturas químicas representadas: (epi)galocatequina-(4 α →8)-(epi)galocatequina (a) e (epi)galocatequina- (4 β →8)-(epi)galocatequina (b).

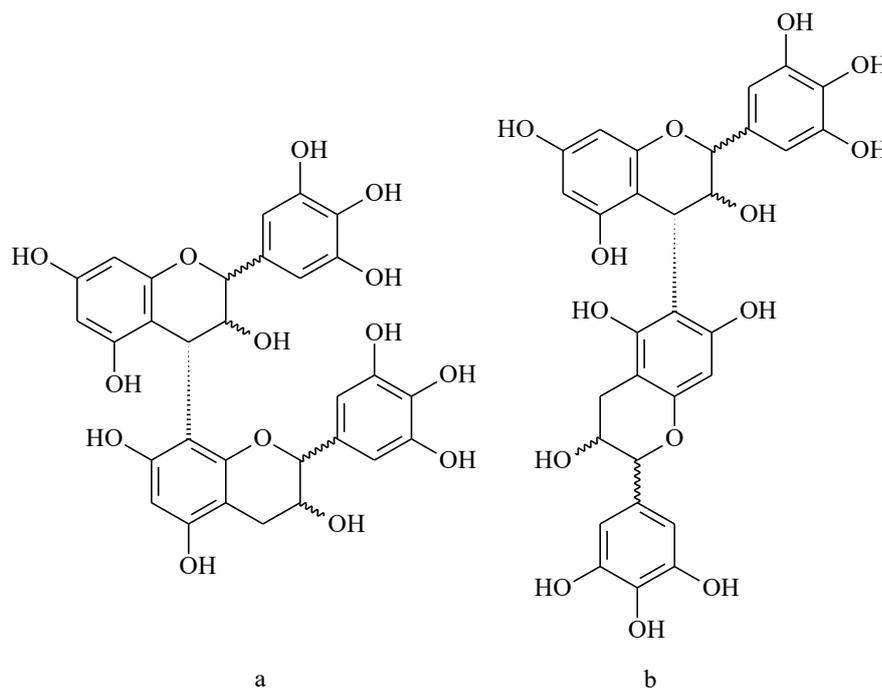


Figura 34 – Dímeros de prodelfinidinas cujos monômeros estão ligados entre os carbonos 4 da unidade superior e 8 da unidade inferior (a) ou entre os carbonos 4 da unidade superior e 6 da unidade inferior (b). Estruturas químicas representadas: (epi)galocatequina-(4 α →8)-(epi)galocatequina (a) e (epi)galocatequina-(4 α →6)-(epi)galocatequina (b).

Tendo em vista a diversidade de isômeros possíveis, cuja fragmentação tende a gerar fragmentos com mesma massa molecular, não é possível identificar a estrutura tridimensional de dímeros de prodelfinidinas apenas com os dados de espectrometria de massas. Para tanto, faz-se necessário a comparação com substâncias de referência ou o isolamento da substância e sua elucidação estrutural por métodos físicos. Assim, para as próximas substâncias que serão apresentadas, foram identificados apenas quais desses isômeros são compatíveis com as massas dos fragmentos encontrados.

A substância **2**, eluída em 8,70 minutos (Figura 25), foi identificada como um dímero composto por duas unidades de (epi)galocatequina. O espectro exibe o pico do íon *quasi*-molecular em m/z 609 $[M-H]^-$, no modo negativo, e em 611 $[M+H]^+$, no modo positivo. Também foi detectada a presença de fragmentos em m/z 305 $[M-304-H]^-$ e 307 $[M-304+H]^+$, respectivamente, no modo negativo e positivo, do resíduo de (epi)galocatequina (resultante da quebra da ligação entre as duas unidades). No modo negativo, foi observada a ocorrência dos fragmentos oriundos da fissão de RDA, em m/z 137 $[M-472-H]^-$ (pico base), correspondente à quinona metídeo do monômero (epi)galocatequina, e em m/z 441 $[M-168-H]^-$, correspondendo à quinona metídeo da unidade inferior quando a unidade superior é uma

unidade de (epi)galocatequina (conforme Figura 27). Também ocorreu um fragmento em m/z 423 $[M-186-H]^-$, provavelmente, oriundo da desidratação do fragmento em m/z 441 $[M-168-H]^-$. O íon *quasi*-molecular não foi detectado no espectro em MS/MS no modo negativo, entretanto, foram detectados os pico em m/z 423 $[M-186-H]^-$ e em m/z 305 $[M-304-H]^-$, confirmando a estrutura proposta. Essa fragmentação está demonstrada na Figura 35, e os espectros, na Figura 36.

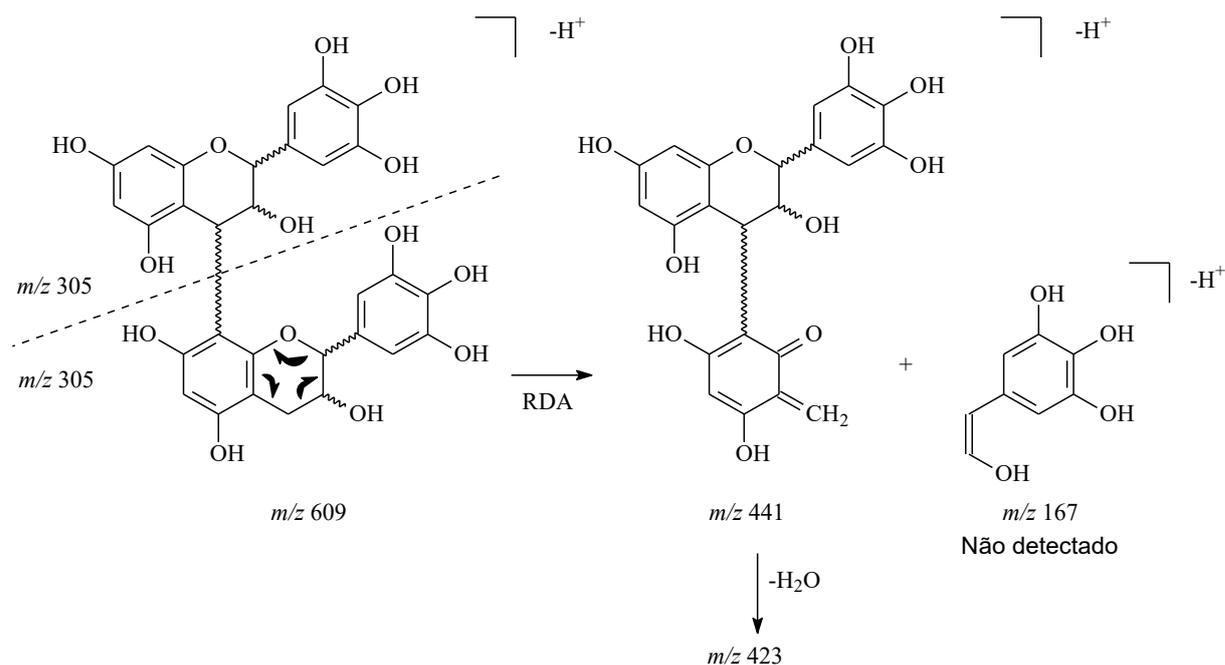


Figura 35 – Fragmentos obtidos por UPLC-MS-ESI para a substância correspondente ao pico eluído em 8,70 min, identificada como um dímero composto por duas unidades de (epi)galocatequina (**2**). Fissão de RDA proposta por Zywicki e colaboradores (2002).

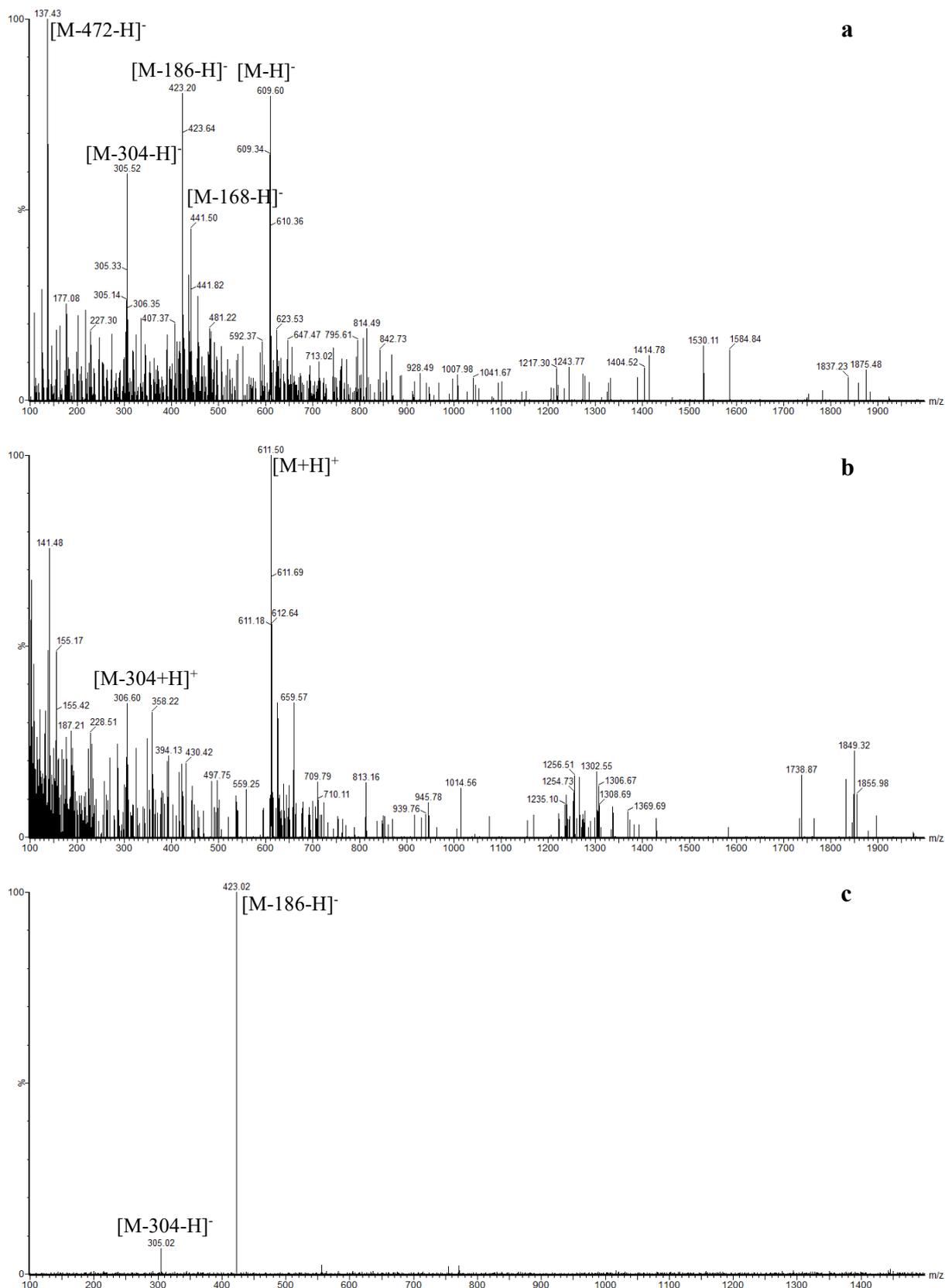


Figura 36 – Espectro de massas da substância **2** (dímero composto por duas unidades de (epi)galocatequina, $TR= 8,70$ min) no modo negativo (a) e no modo positivo (b) por UPLC-ESI-MS e de MS/MS (c). Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.6.

A substância **7**, que eluiu em 15,54 minutos (Figura 25), foi identificada como um dímero composto por uma unidade de (epi)galocatequina e uma unidade de galato de (epi)galocatequina, com massa molar 762 g/mol. O íon *quasi*-molecular foi formado nos modos negativo e positivo, respectivamente, em m/z 761 $[M-H]^-$ e 763 $[M+H]^+$. No modo negativo, foi detectada também a ocorrência dos fragmentos da fissão RDA, em m/z 137 $[M-624-H]^-$ e 423 $[M-338-H]^-$ (conforme Figuras 27 e 35). Também foram observados os fragmentos em m/z 609 $[M-152-H]^-$, relativa à perda da unidade galoil, e 591 $[M-170-H]^-$, relativa à desidratação desse fragmento. Como ocorrido para a substância **2**, o íon *quasi*-molecular não foi detectado no espectro em MS/MS no modo negativo, mas foi detectado o pico em m/z 423 $[M-338-H]^-$ (Figura 39). Essa fragmentação está demonstrada na Figura 37.

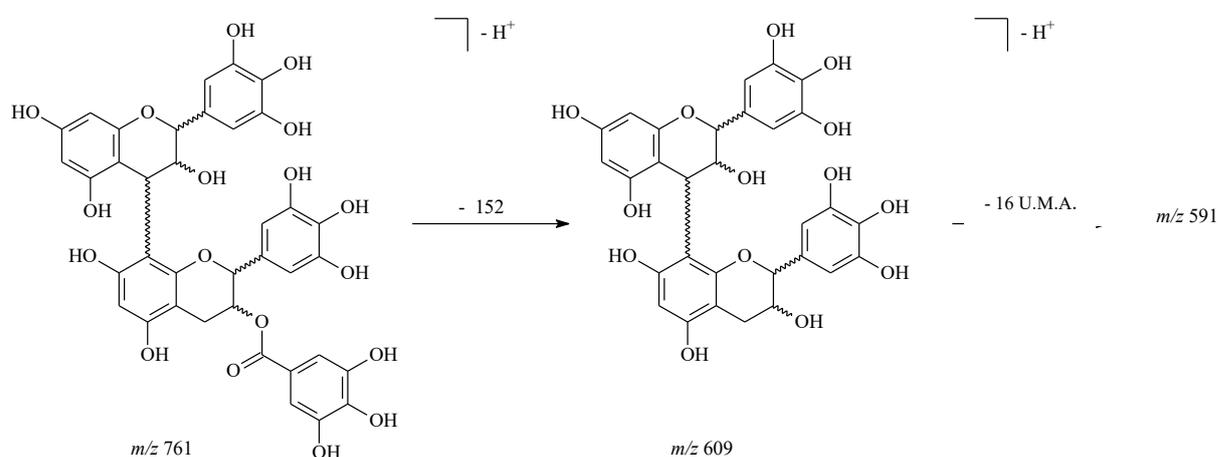


Figura 37 – Fragmentos obtidos por UPLC-MS-ESI para a substância correspondente ao pico eluído em 15,54 min, identificada como um dímero composto por uma unidade de galato (epi)galocatequina e uma unidade de (epi)galocatequina (**7**).

A ocorrência do fragmento em m/z 423 no espectro da substância **7** sugere que a (epi)galocatequina é o fragmento superior da molécula. Assim, a substância **7** é a (epi)galocatequina (4→6 ou 8)-(epi)galocatequina, como demonstrado na Figura 38, e os espectros no modo positivo, negativo e de MS/MS, na Figura 39.

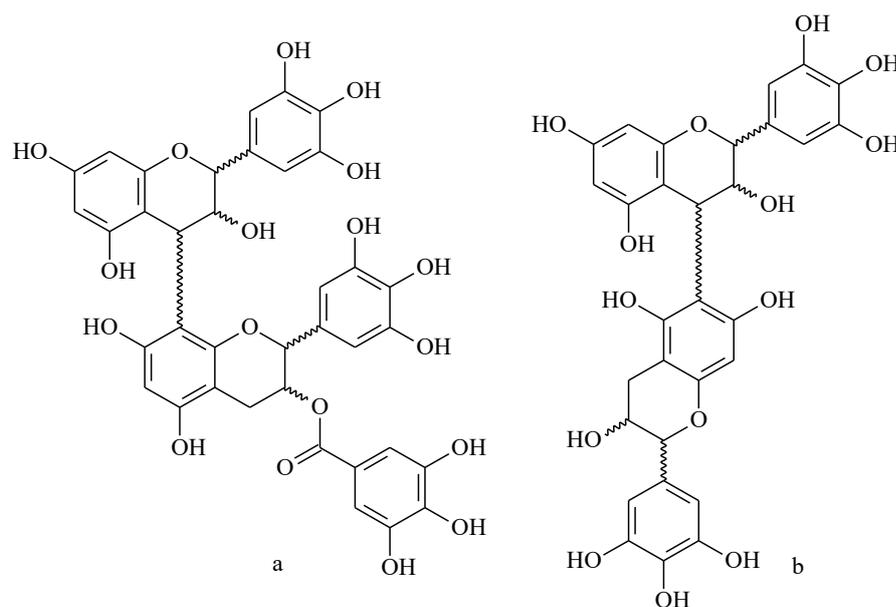


Figura 38 – Prováveis estruturas para a substância 7, um dímero composto por uma unidade superior (epi)galocatequina e uma unidade inferior galato de (epi)galocatequina, que podem estar ligados em α ou em β . Estruturas químicas representadas: (epi)galocatequina (4→8)-galato de (epi)galocatequina (a) e (epi)galocatequina (4→6)-galato de (epi)galocatequina (b).

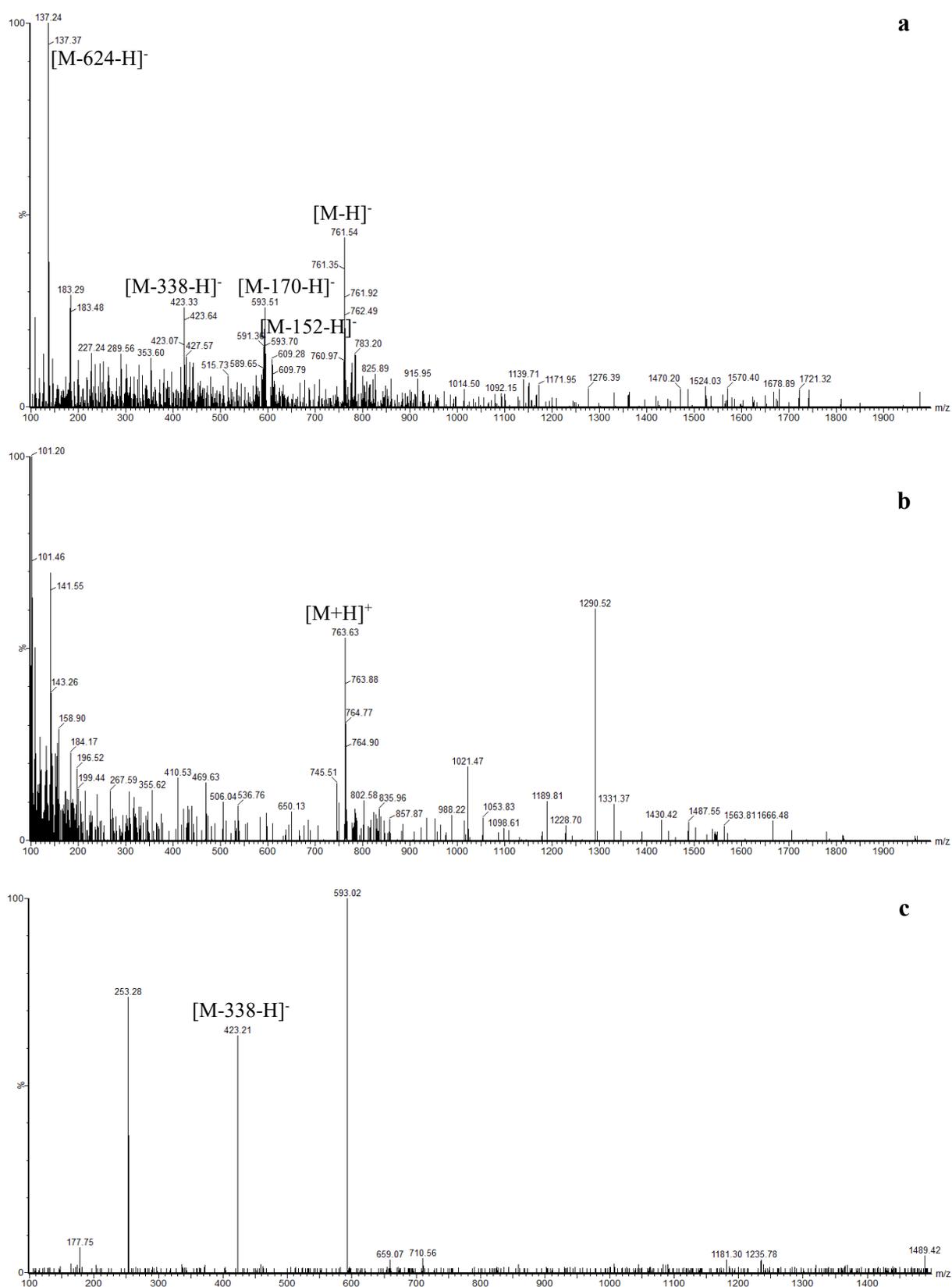


Figura 39 – Espectro de massas da substância 7 (dímero composto por uma unidade de (epi)galocatequina e uma unidade de galato de metil-(epi)galocatequina, TR= 15,54 min) no modo negativo (a) e no modo positivo (b) por UPLC-ESI-MS e de MS/MS (c). Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.6.

As substâncias identificadas como **4** e **9** no cromatograma de SAO (Figura 25), eluídas respectivamente em 12,17 e 20,57 minutos, apresentaram o íon *quasi*-molecular com mesmo valor, em m/z 913 $[M-H]^-$ no modo negativo e em m/z 915 $[M+H]^+$ no modo positivo. Uma substância com massa molecular de 914 g/mol já foi previamente descrita para *S. adstringens*, o galato de epigalocatequina-(4 β →8)-galato de epigalocatequina (MELLO et al., 1996a). No presente trabalho, os dados de UPLC-MS-ESI sugerem a presença de no mínimo dois isômeros com essa massa molecular, compatíveis com dímeros de unidades de (epi)galocatequina galoiladas.

Para ambas as substâncias **4** e **9**, dímeros compostos por duas unidades de galato de (epi)galocatequina, foram detectados, no modo negativo, fragmentos em m/z 137 $[M-776-H]^-$ (conforme Figura 25) e em m/z 761 $[M-152-H]^-$, decorrentes da perda de uma unidade galoil. A geração desse fragmento está demonstrada na Figura 40. No espectro em MS/MS no modo negativo, a presença do íon *quasi*-molecular confirmou a estrutura proposta para a substância **4**, o que não ocorreu com a substância **9**. Os espectros no modo negativo, positivo e em MS/MS são exibidos nas Figuras 41 e 42, respectivamente, para as substâncias **4** e **9**.

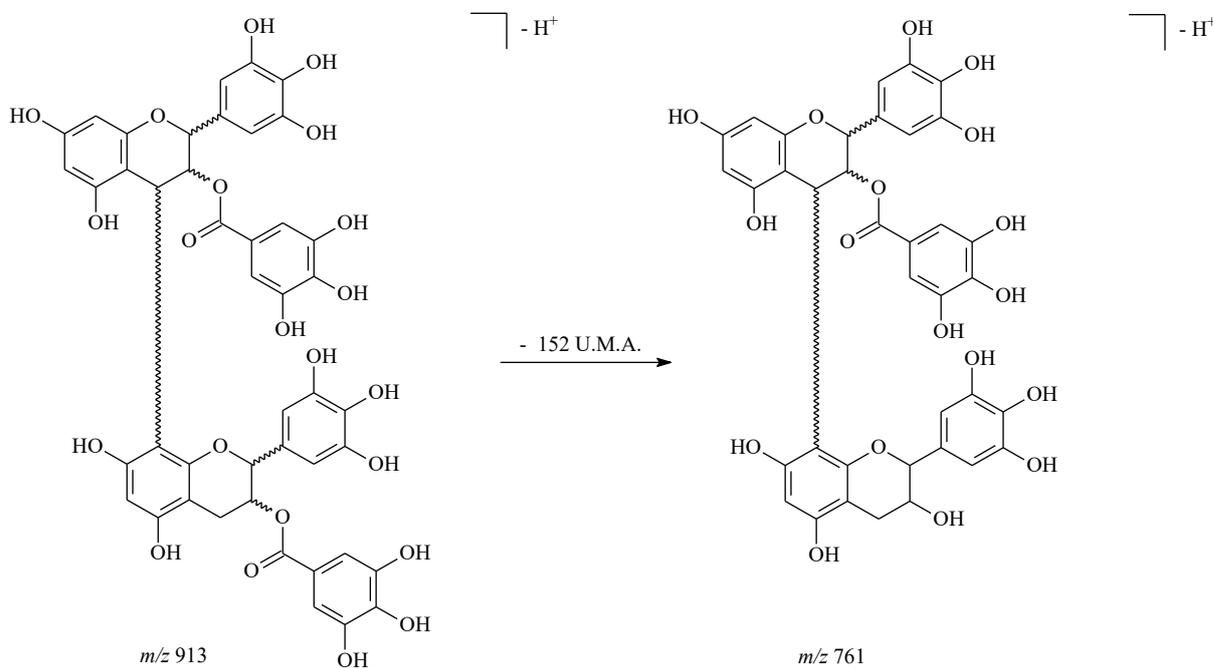


Figura 40 – Fragmentos obtidos por UPLC-MS-ESI para as substâncias correspondentes aos picos eluídos em 12,17 min e em 20,57, identificada como dímeros compostos por duas unidades de galato (epi)galocatequina (**4** e **9**).

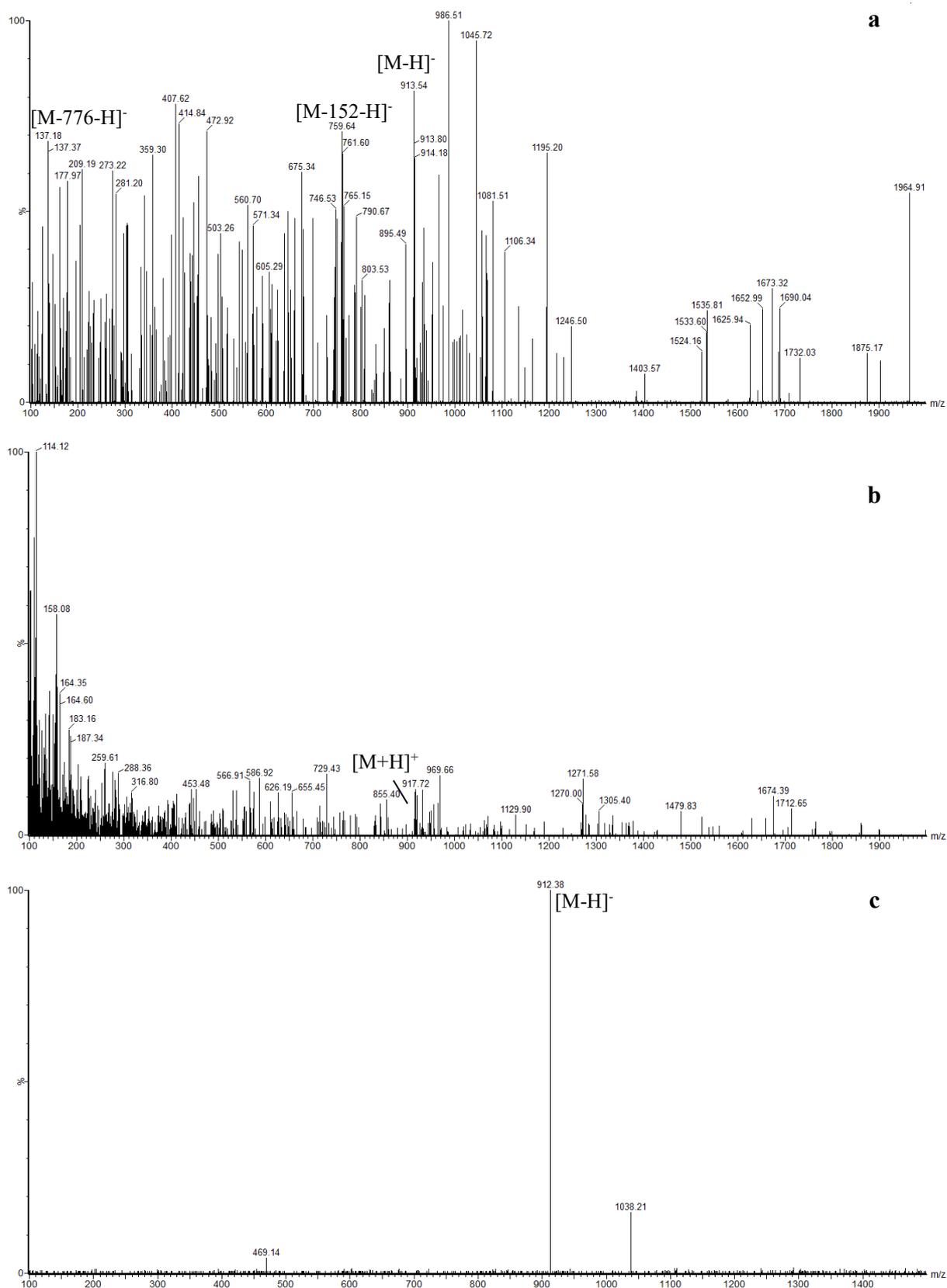


Figura 41 – Espectro de massas da substância 4 (dímero composto por duas unidades de galato de (epi)galocatequina, TR= 12,17 min) no modo negativo (a) e no modo positivo (b) por UPLC-ESI-MS e de MS/MS (c). Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.6.

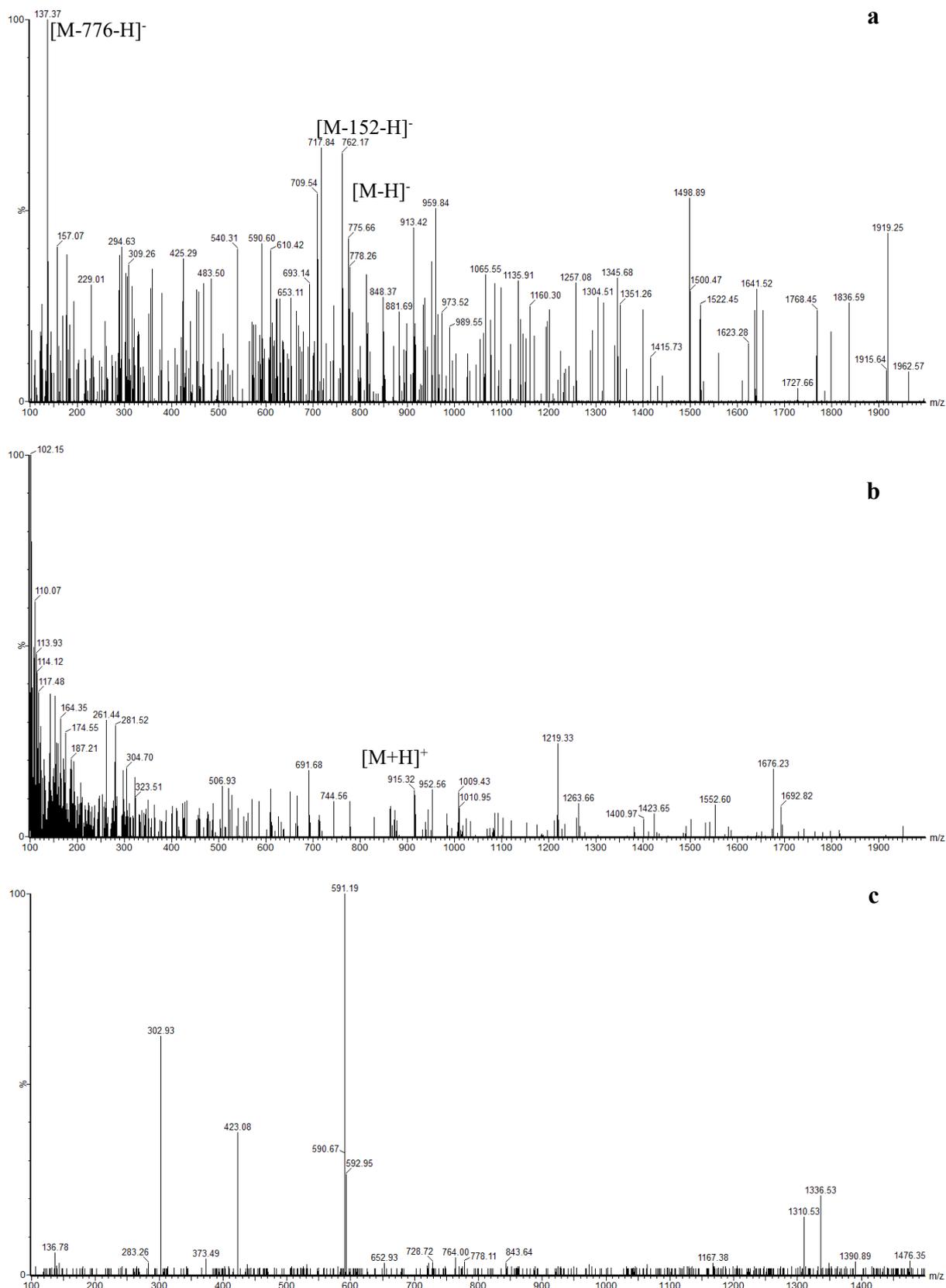


Figura 42 – Espectro de massas da substância **9** (dímero composto por duas unidades de galato de (epi)galocatequina, TR= 2 ,57 min) no modo negativo (a) e no modo positivo (b) por UPLC-ESI-MS e de MS/MS (c). Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.6.

Também foi detectada no presente trabalho a ocorrência de uma substância com massa molecular superior às massas das substâncias já relatadas para *S. adstringens*, com o íon *quasi*-molecular em m/z 927 $[M-H]^-$ no modo negativo e em m/z 929 $[M+H]^+$ no modo positivo, acusando a presença de uma substância com massa molecular 928 g/mol (**5**, tempo de retenção 12,84 minutos). Como essa substância apresenta 14 U.M.A a mais que os isômeros **4** e **9** (MM 914 g/mol), parece se tratar de um dímero de duas unidades de galato de (epi)galocatequina metilado. A presença do fragmento em m/z 319 $[M-608-H]^-$, compatível com uma (epi)galocatequina metilada, sugere que esse grupo metila está ligado ao anel B e não à unidade galoil. Assim, é possível supor que a substância **5** seja um dímero composto por uma unidade de galato de (epi)galocatequina e uma unidade de galato de metil-(epi)galocatequina.

A análise dos espectros mostra ainda a ocorrência de fragmentos em m/z 137 $[M-790-H]^-$, correspondente ao fragmento da fissão de RDA (conforme Figura 27), e 305 $[M-622-H]^-$, relativo aos núcleos (epi)galocatequina e metil-(epi)galocatequina, além do fragmento em m/z 609 $[M-318-H]^-$, relativo ao dímero entre duas dessas unidades. A presença do íon *quasi*-molecular no espectro de MS/MS confirmou a massa molecular atribuída. Esses fragmentos são exibidos na Figura 43, e os espectros de massas para a substância **5**, na Figura 44.

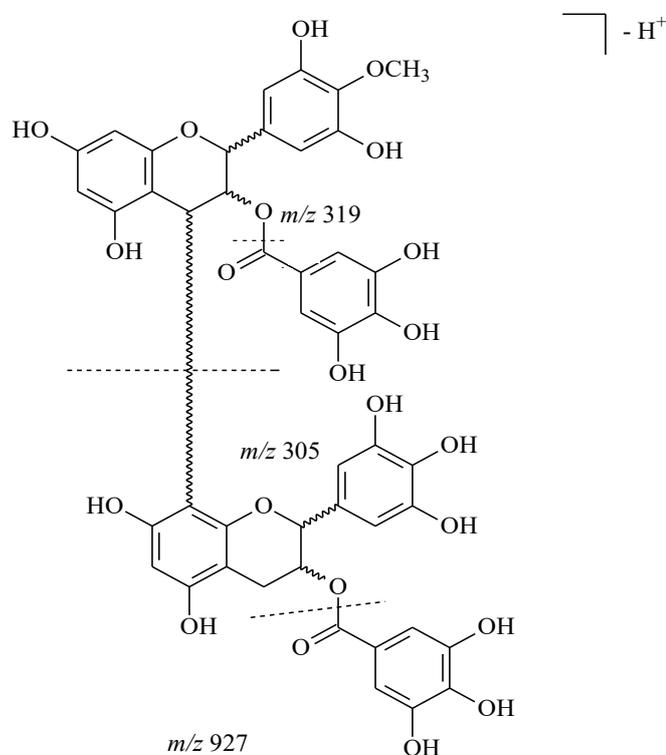


Figura 43 – Fragmentos obtidos por UPLC-MS-ESI para a substância correspondente ao pico eluído em 12,84 min, identificada como um dímero composto por uma unidade de galato de (epi)galocatequina e uma unidade de galato de metil-(epi)galocatequina (**5**).

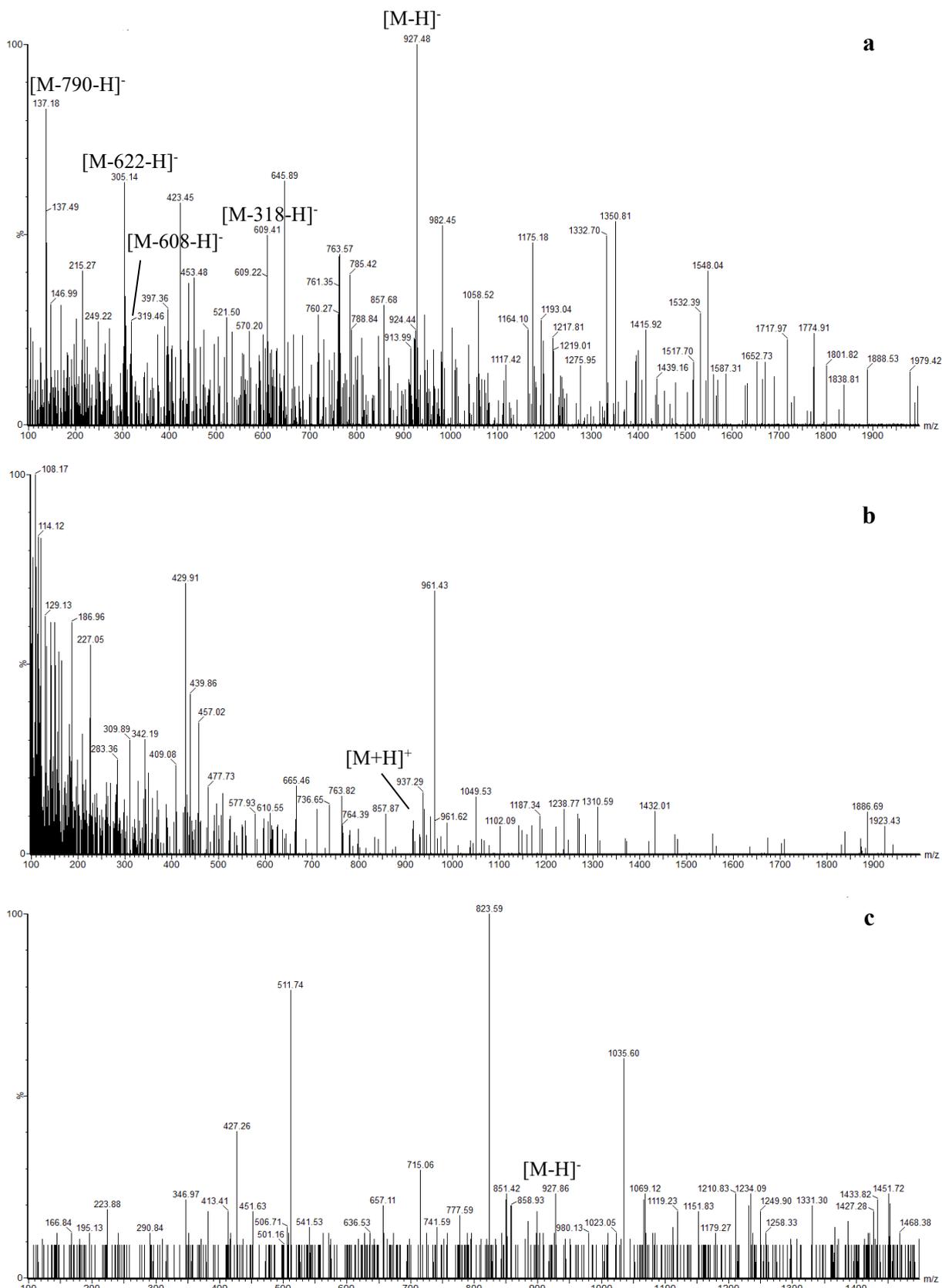


Figura 44 – Espectro de massas da substância **5** (dímero composto por uma unidade de galato de (epi)galocatequina e uma unidade de galato de metil-(epi)galocatequina, TR= 12,84 min) no modo negativo (a) e no modo positivo (b) por UPLC-ESI-MS e de MS/MS (c). Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.6.

A substância **11** eluiu em 23,25 minutos (Figura 25) e foi identificada como um dímero composto por uma unidade de (epi)galocatequina e uma unidade de metil-(epi)galocatequina, devido à presença do íon *quasi*-molecular em m/z 623 $[M-H]^-$ no modo negativo e em m/z 625 $[M+H]^+$ no modo positivo. Não foram encontrados relatos da presença de substâncias com a massa molecular 624 g/mol em *S. adstringens*. O fragmento em m/z 137 $[M-486-H]^-$, oriundo da fissão de RDA (conforme Figura 27) também está presente. No modo negativo, é possível visualizar também o fragmento em m/z 319 $[M-304-H]^-$, correspondendo ao monômero metilado oriundo da quebra da ligação dimérica. O íon *quasi*-molecular não foi detectado no espectro em EM/EM no modo negativo, porém, a presença do fragmento em m/z 423 $[M-200-H]^-$, correspondente à desidratação de fragmento oriundo da fissão de RDA (conforme Figuras 27 e 35), sugere que a unidade superior é uma unidade de (epi)galocatequina. Os fragmentos estão exibidos na Figura 45, e os espectros, na Figura 46.

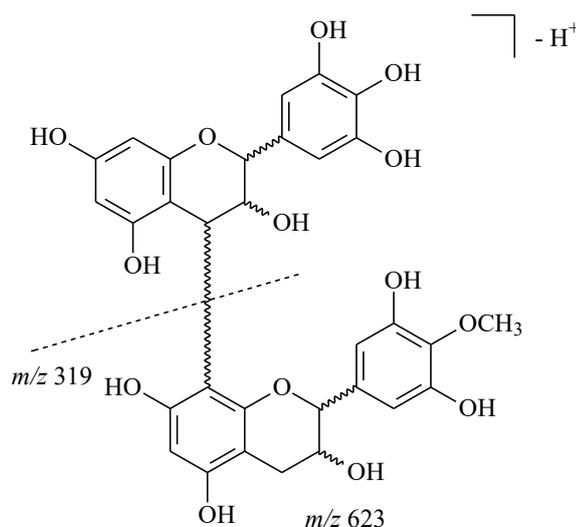


Figura 45 – Fragmentos obtidos por UPLC-MS-ESI para a substância correspondente ao pico eluído em 23,25 min, identificada como um dímero composto por uma unidade de (epi)galocatequina e uma unidade de metil-(epi)galocatequina (**11**).

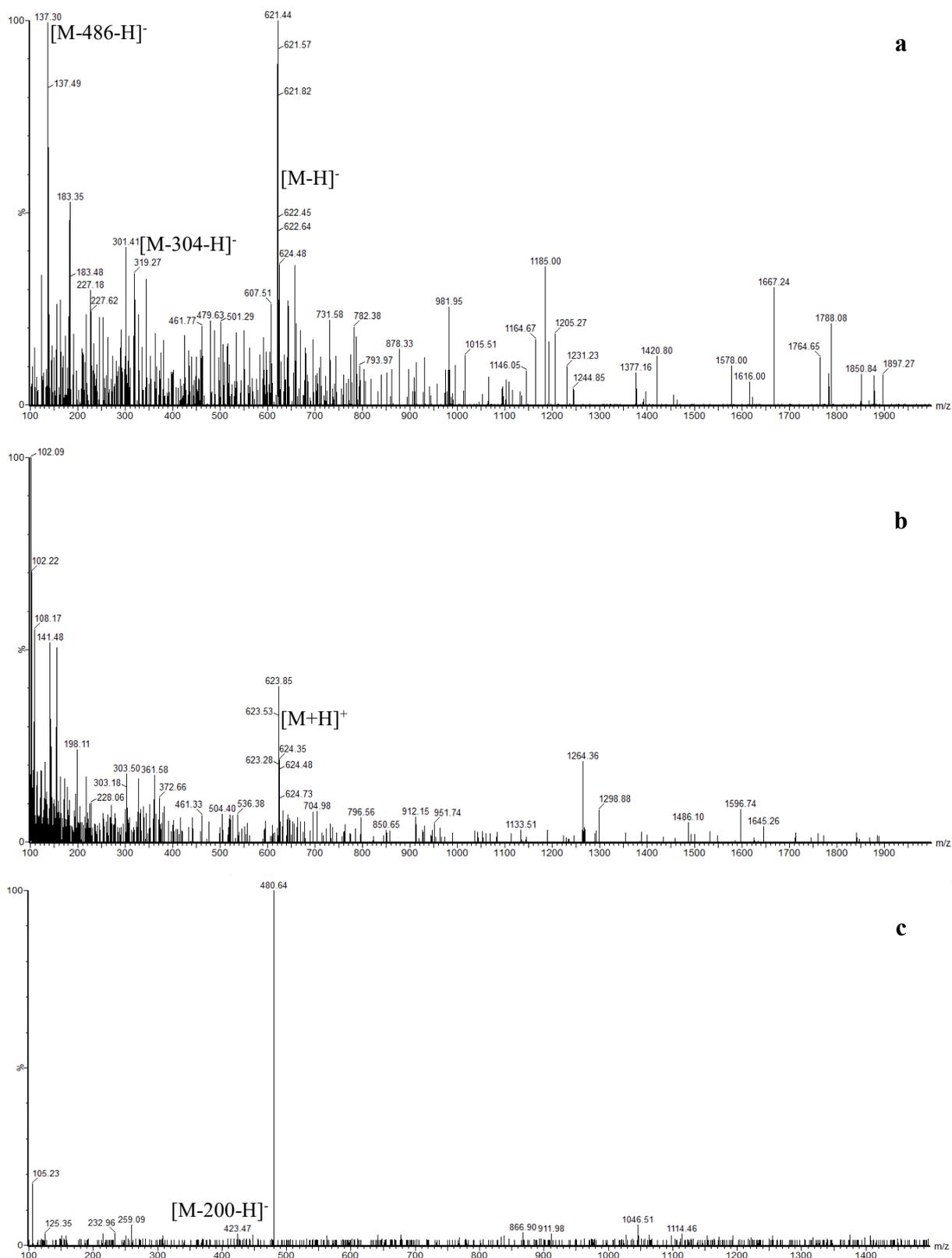


Figura 46 – Espectro de massas da substância 11 (dímero composto por uma unidade (epi)galocatequina e uma unidade de metil-(epi)galocatequina, TR= 23,25 min) no modo negativo (a) e no modo positivo (b) por UPLC-ESI-MS e de MS/MS (c). Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.6.

Prorobinetinidinas já foram descritas para a espécie *S. adstringens* (MELLO et al., 1996b). A diferença dessa classe para as prodelfinidinas é a ausência de hidroxila no carbono 5, como demonstrado na Figura 47.

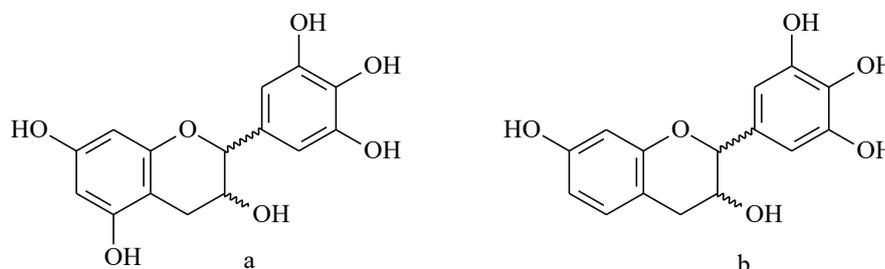


Figura 47 – Estrutura de uma prodelfinidina (a) e de uma prorobinetinidina (b).

No presente trabalho, durante a caracterização da fração orgânica por UPLC-MS-ESI não foram identificados constituintes com massas moleculares compatíveis com prorobinetinidinas (MM com 16 U.M.A. a menos que a prodelfinidina correspondente).

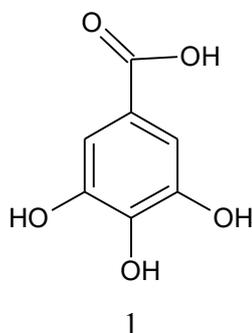
Um fator que pode influenciar a composição química é a época de coleta do material vegetal. Alguns metabólitos secundários são produzidos muitas vezes em resposta aos estímulos ambientais aos quais a planta foi exposta e, geralmente, esses estímulos variam ao longo do ano (por exemplo, a luminosidade não é a mesma no verão e no inverno). Isso pode afetar quais metabólitos estarão presentes no vegetal no momento da coleta e, principalmente, seus teores.

Também é importante considerar os fatores relacionados à degradação de metabólitos secundários nas etapas pós coleta. Por exemplo, a submissão do material vegetal a altas temperaturas ou à luz pode causar a degradação de algumas classes de substâncias. Assim, esses também são fatores que devem ser levados em conta quando são detectadas diferenças químicas entre diferentes materiais vegetais obtidos a partir da mesma espécie.

III.3 Fracionamento cromatográfico da fração orgânica de *S. adstringens* (SAO)

O fracionamento da fração orgânica de *S. adstringens* (SAO) foi realizado por meio de cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluentes misturas de acetato de etila e metanol em polaridades crescentes. Foram obtidas dez frações, que foram agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico por CCD de sílica gel em sete grupos, denominados SAO 1-7 (Tabela 4, item 4.12). Essas frações reunidas foram analisadas por CLAE-DAD, visando identificar constituintes químicos já relatados para *S. adstringens*. Nessas análises, utilizou-se

a comparação com dados cromatográficos e espectrais no UV obtidos para substâncias de referência (ácido gálico (1), galocatequina, epigalocatequina, catequina, epicatequina e galato de epigalocatequina; Tabela 13). Os cromatogramas obtidos estão representados na Figura 48.



A fração SAO1, eluída com acetato de etila, apresentou-se como um sólido pastoso de coloração verde e seu cromatograma indicou a presença de um pico majoritário (Figura 48), com tempo de retenção semelhante ao da catequina (12,7 min), porém com máximo de absorção no UV distinto (λ 271,0 nm). O fracionamento de SAO foi repetido, visando obter massa adicional da fração SAO1.

SAO2, SAO3 e SAO4 foram obtidas como sólidos de coloração marrom. A análise dos espectros dos picos majoritários dessas frações no UV, registrados *on line* pelo detector DAD, indicou polifenóis, incluindo proantocianidinas. SAO2 e SAO3 foram obtidas utilizando acetato de etila como eluente, enquanto SAO4 foi eluída com uma mistura de acetato de etila e metanol 1:1. Nas três frações foi identificada a presença de ácido gálico (TR 4,4 min, λ 215,5 e 271,0 nm; Figura 48; Tabela 13) e de galocatequina (TR 6,8 min, λ 268,9 nm). Epigalocatequina (TR 10,7 min, λ 269,8 nm) foi identificada nas frações SAO2 e SAO4, e o galato de epigalocatequina nas frações SAO2 e SAO3 (TR 16,7 min, λ 273,3 nm).

SAO5 foi obtido como um sólido marrom, eluído da coluna de sílica gel com uma mistura de acetato de etila e metanol 1:1. Quando analisado por CLAE-DAD, o cromatograma apresentou apenas um pico majoritário, correspondente ao ácido gálico (TR 4,4 min; λ 215,5; 271,0 e 375,7 nm; Figura 48).

Já as frações SAO6 e SAO7, eluídas da coluna de sílica gel respectivamente com metanol e com mistura de metanol e água 1:1, quando analisadas por CLAE-DAD não apresentaram substâncias que absorvem nos comprimentos de onda avaliados.

O fracionamento de SAO em coluna de sílica gel foi eficiente na separação dos constituintes, uma vez que possibilitou obter uma fração (SAO1) com um constituinte majoritário, além de frações enriquecidas em polifenóis (SAO2, SAO3 e SAO4).

Outros fracionamentos do extrato etanólico das cascas de *S. adstringens* foram realizados, entretanto, não resultaram no isolamento de nenhuma substância ou na obtenção de frações com massas suficientes para fracionamentos posteriores.

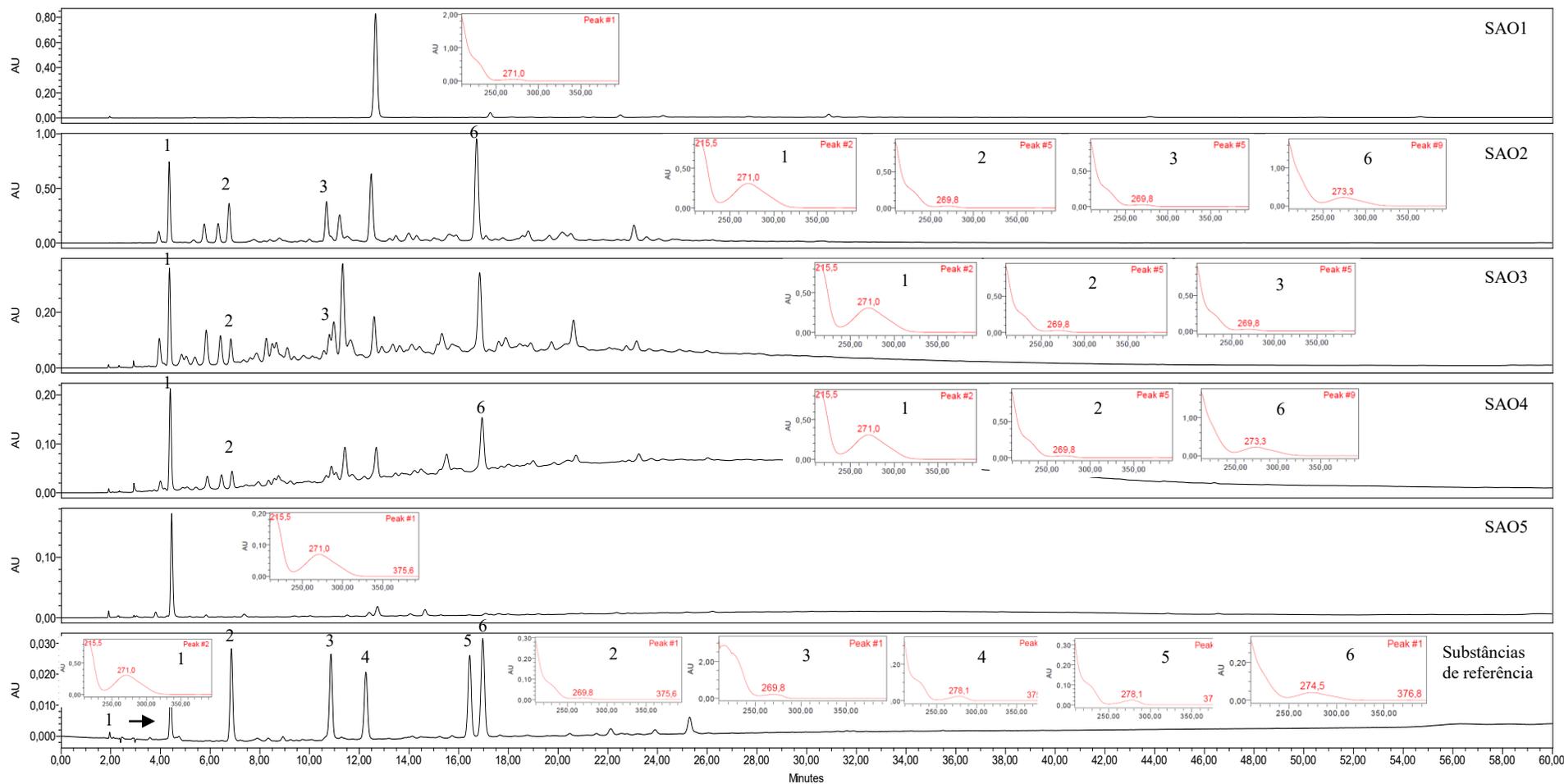


Figura 48: - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para os grupos de frações reunidas, resultantes do fracionamento da fração orgânica de *S. adstringens* (SAO) em coluna de sílica-gel. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.7; cromatogramas registrados no comprimento de onda de 220 nm. Substâncias de referência: 1: ácido gálico; 2: galocatequina; 3: epigalocatequina; 4: catequina; 5: epicatequina; 6: galato de epigalocatequina.

III.3.1 Estudo fitoquímico da fração SAO1

Conforme demonstrado na Figura 48, a análise de SAO1 por CLAE-DAD indicou a ocorrência de um pico majoritário, com tempo de retenção em 12,7 min e com máximo de absorção no UV em λ 271,0 nm, sugerindo tratar-se de uma prodelfinidina. Apesar da análise por CLAE-DAD exibir um pico único, visualmente a fração apresentou-se como um material esverdeado e, quando analisada por CCD evidenciou-se a presença de clorofila na amostra.

A fim de eliminar a clorofila da amostra, inicialmente foi realizada uma partição líquido-líquido entre solventes imiscíveis, utilizando hexano e metanol. Entretanto, não houve separação adequada, pois ambas as fases continham a substância e a clorofila. Procedeu-se, então, a tentativa de purificação por CCD preparativa. A separação não foi completa nem uniforme ao longo da placa, o que inviabilizou a recuperação da amostra. Por isso, esse método também foi descartado. A tentativa seguinte foi realizar uma coluna de Sephadex LH-20, procedendo-se à eluição com gradiente de misturas de metanol, água e acetona. Essa tentativa de purificação também se mostrou infrutífera. Finalmente, SAO1 foi eluída em coluna de sílica gel, utilizando um gradiente suave de hexano e acetato de etila (iniciando com hexano puro e acrescentando acetato de etila de 1 em 1% até 40%). Mesmo assim, não houve separação entre as duas substâncias, que co-eluíram entre 28 e 35% de acetato de etila.

Como a purificação da substância não foi possível a partir da fração SAO1, procedeu-se ao seu isolamento a partir de SAO2, na qual ocorre como substância majoritária (Figura 49). O fracionamento de SAO2 foi realizado por meio de cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluentes misturas de hexano e acetato de etila em polaridades crescentes. Foram obtidas dez frações, que foram agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico por CCD de sílica gel em seis grupos, denominados SAO2a-f (Tabela 5, item 4.12). Essas frações reunidas foram analisadas por CLAE-DAD, visando identificar os constituintes químicos, em especial a substância que compõe a fração SAO1. Os cromatogramas são exibidos na Figura 49.

O fracionamento resultou na obtenção da fração SAO2b, eluída com hexano / acetato de etila (30:70) e (35:65), cujo cromatograma obtido por CLAE-DAD indicou um pico único (Figura 49), com tempo de retenção 12,7 min e máximo de absorção no UV em λ 271,0 nm, ou seja, a substância de interesse. As demais frações foram analisadas e alguns de seus constituintes foram identificados por comparação com substâncias de referência, conforme indicado na Figura 49.

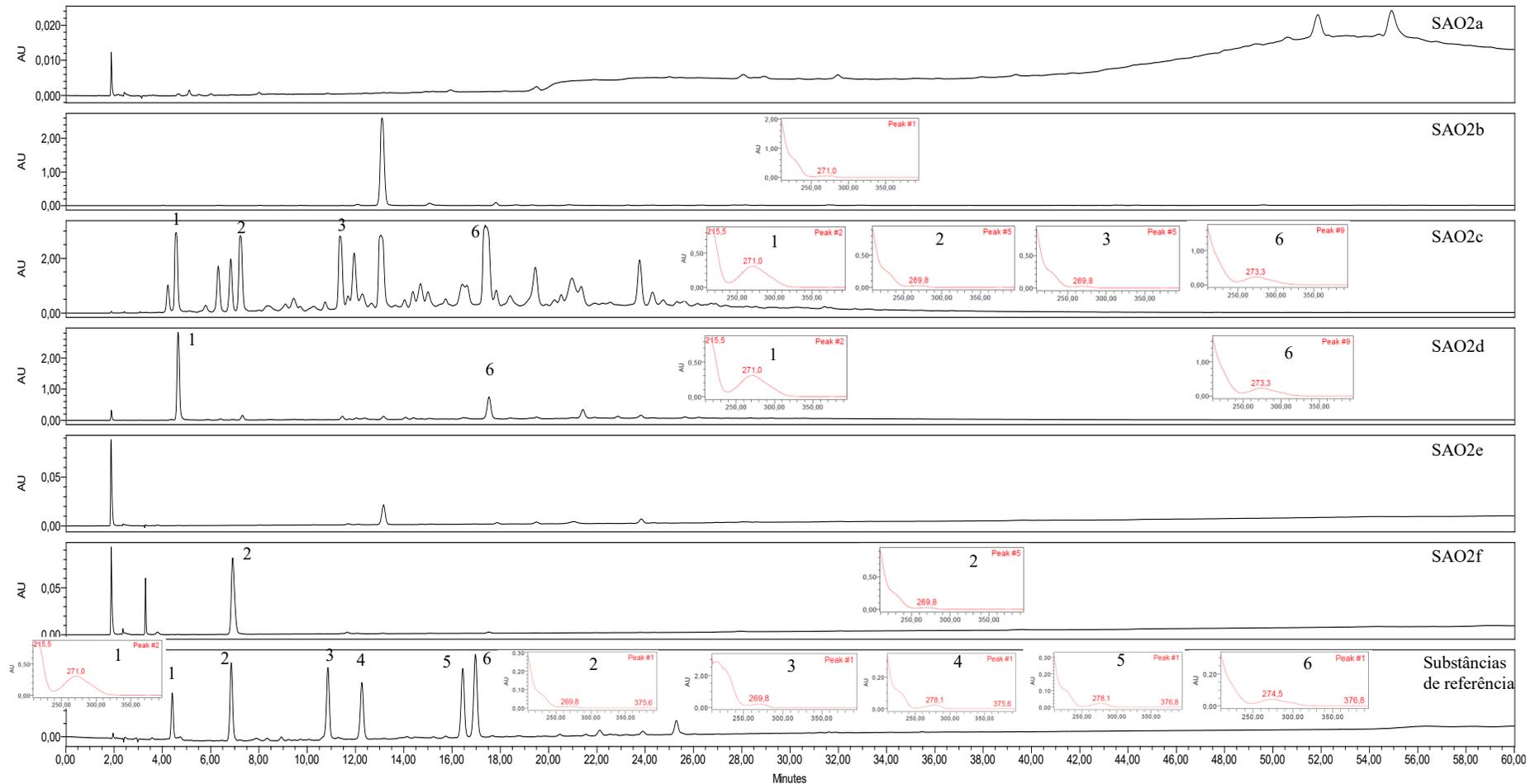


Figura 49 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para os grupos de frações resultantes do fracionamento da fração SAO2 em coluna de sílica gel. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.7; cromatogramas registrados no comprimento de onda de 220 nm. Substâncias de referência: 1: ácido gálico; 2: galocatequina; 3: epigalocatequina; 4: catequina; 5: epicatequina; 6: galato de epigalocatequina.

A substância purificada SAO2b foi, então, caracterizada por espectrometria no infravermelho (IV), por UPLC-MS-ESI e por ressonância magnética (RMN) de ^1H e de ^{13}C (descrito nos itens III.3.2), sendo identificada como 4'-*O*-metil-galocatequina. Essa substância é considerada, pela Farmacopeia Brasileira 5ª Ed., como um marcador químico da espécie, uma vez que no ensaio de identificação da espécie por CCD, é preconizado que ela seja utilizada como substância química de referência (FARMACOPEIA, 2010). Entretanto, essa substância não está comercialmente disponível.

O presente trabalho fornece estratégias para o isolamento da 4'-*O*-metil-galocatequina de forma simples e rápida. É possível obtê-la como menor pureza, para uso em análises qualitativas por CCD, através do fracionamento da fração orgânica SAO por cromatografia em coluna utilizando sílica gel, sendo a substância obtida na primeira fração eluída. Já no caso de análises que demandem uma maior pureza, a substância pode ser obtida a partir do fracionamento sequencial de SAO em duas colunas de sílica gel, eluídas com misturas de hexano e acetato de etila.

Esses dados são relevantes, pois fornecem à indústria de fitoterápicos uma metodologia de obtenção dessa substância rápida e de baixo custo, o que permitirá uma análise de Controle de Qualidade mais completa do barbatimão, utilizado como matéria-prima para a produção de fitoterápicos e fitocosméticos, contribuindo assim para a obtenção de produtos com maior qualidade e, conseqüentemente, com maior segurança e eficácia.

III.3.2 Identificação estrutural de SAO2b

A confirmação da estrutura química de SAO2b foi realizada através de análises espectroscópicas usuais, incluindo dados de IV e RMN de ^1H e de ^{13}C , bem como espectrometria de massas.

A atribuição das bandas do espectro no infravermelho foi realizada pela comparação com valores tabelados (PAVIA et al., 2012). As bandas atribuídas no espectro no infravermelho de SAO2b estão descritas na Tabela 15.

Tabela 15 – Atribuições das bandas observadas no espectro no IV obtido para SAO2b.

Intensidade	Número de ondas	Tipo de vibração	Grupo químico
Larga	3294 cm ⁻¹	Deformação axial	O-H de alcoóis e/ou fenóis envolvidos em ligação de hidrogênio
Forte	1032 cm ⁻¹	Deformação axial	C-O de éter ou de álcool
Fraca	1451 e 1325 cm ⁻¹	Deformação axial	C-H de metila
Fraca	1412 e 1638 cm ⁻¹	Deformação axial	C=C de anel aromático
Média	849 cm ⁻¹	Desdobramento fora do plano (<i>twisting</i>)	C-H de anel aromático

Na sequência, a subfração SAO2b foi analisada por UPLC-MS-ESI. O cromatograma obtido mostra a ocorrência do íon *quasi*-molecular no modo negativo em m/z 319 [M-H]⁻ e em m/z 321 [M+H]⁺ no modo positivo. No espectro ESI⁻ também se observa o fragmento em m/z 137, característico da fissão de Retro-Diels-Alder de prodelfinidinas, descrita na Figura 27 (item III.2.2.2). Os dados de MS são compatíveis com a fórmula molecular C₁₆H₁₆O₇, com massa molecular de 320 g/mol, correspondendo à 4'-*O*-metil-galocatequina, previamente descrita para a espécie (MELLO et al., 1996a).

Para confirmar a estrutura proposta para SAO2b, foram obtidos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C, incluindo experimentos monodimensionais (DEPT-135) e bidimensionais (COSY, HSQC e HBMC).

As atribuições dos sinais dos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C obtidos para SAO2b foram feitas por comparação com dados da literatura previamente relatados para 4'-*O*-metil-galocatequina (GARCIA et al., 1993) e confirmados pela análise dos espectros bidimensionais supracitados. Os dados obtidos estão dispostos nas Tabelas 16 e 17. Os dados obtidos mostraram-se muito próximos a dados previamente publicados para a substância (GARCIA et al., 1993), sendo possível identificá-la como sendo 4'-*O*-metil-galocatequina.

Tabela 16 – Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H obtidos para SAO2b e dados previamente publicados para a substância 4'-*O*-metil-galocatequina (GARCIA et al., 1993).

H	Dados obtidos para SAO2b		4'- <i>O</i> -metil-galocatequina	
	δ (ppm) *	Multiplicidade	δ (ppm) *	Multiplicidade
2	4,55 ($J_{\text{H2-H3}}$ 6,88)	d	4,57 ($J_{\text{H2-H3}}$ 7,0)	d
3	3,96	m	3,98	m
4a	2,78 ($J_{\text{H4a-H3}}$ 4,5; $J_{\text{H4a-H4b}}$ 16,13)	dd	2,79 ($J_{\text{H4a-H3}}$ 5,5; $J_{\text{H4a-H4b}}$ 16,36)	dd
4b	2,50 ($J_{\text{H4b-H3}}$ 7,32; $J_{\text{H4b-H4a}}$ 16,13)	dd	2,51 ($J_{\text{H4b-H3}}$ 7,6; $J_{\text{H4b-H4a}}$ 16,36)	dd
6	5,86	S	5,94 ($J_{\text{H6-H8}}$ 1,8)	d
8	5,92	S	5,89 ($J_{\text{H8-H6}}$ 1,8)	d
11	3,78	S	3,78	s
2'	6,40	S	6,42	s
6'	6,40	S	6,42	s

* Dados obtidos em metanol.

Tabela 17 – Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C obtidos para SAO2b e dados previamente publicados para a substância 4'-*O*-metil-galocatequina (GARCIA et al., 1993).

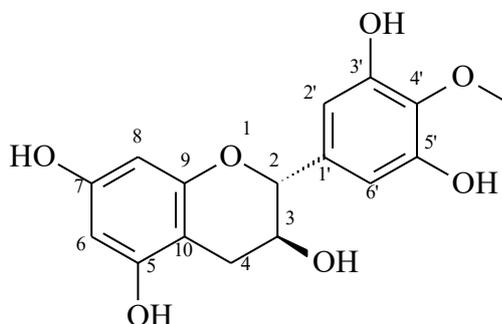
	Dados obtidos para SAO2b	4'-<i>O</i>-metil-galocatequina
C	δ (ppm) *	δ (ppm) *
2	82,61	82,45
3	68,69	68,6
4	28,05	27,9
5	157,86	157,5
6	96,36	96,4
7	157,60	157,7
8	95,56	95,6
9	156,70	156,6
10	100,70	100,7
11	60,67	60,8
1'	136,69	136,6
2'	107,45	107,4
3'	151,59	151,5
4'	136,47	136,4
5'	151,59	151,5
6'	107,45	107,4

* Dados obtidos em metanol.

Os hidrogênios ligados aos carbonos C2 e C3 do anel C podem apresentar estereoquímica *cis* ou *trans*. Quando o anel B e a hidroxila, ligados, respectivamente, aos carbonos 2 e 3, estão trans-posicionados (logo, os hidrogênios H2 e H3 apresentam estereoquímica *trans*), a constante de acoplamento J é maior (em torno de 7), pois o ângulo entre esses hidrogênios é maior que na forma *cis*, para os quais, devido ao menor ângulo entre esses hidrogênios, um J menor é observado (inferior a 3). Para a epigalocatequina, a constante de acoplamento $J_{\text{H2,H3}}$ foi descrita como inferior a 2 Hz (não sendo possível calculá-la), ou seja, constantes de acoplamento com valores mais baixos caracterizam a configuração *trans* (WEINGES et al., 1969; LOPES, 2003; SANCHES, 2004; MACHADO et al., 2005). Já para a galocatequina, Lopes (2003) e Machado (2005) descrevem para a constante de acoplamento $J_{\text{H2,H3}}$ o valor de 7,2 Hz.

A constante de acoplamento entre os hidrogênios H2 e H3 observada no presente trabalho foi $J_{H2-H3} = 6,88$ Hz. Os valores das constantes de acoplamento para esses prótons obtidas na literatura para o isômero *trans*, 4'-*O*-metil-galocatequina, descrita por Clark-Lewis (1968) e Garcia e colaboradores (1993) estão em torno de 7 Hz., assim, conclui-se que SAO2b corresponde essa substância.

Outra forma de diferenciar os epímeros é através do deslocamento químico do carbono C3, entre δ 82 e 83 ppm para a galocatequina e entre δ 79 e 80 ppm para e epigalocatequina (CZOCHANSKA et al., 1979; SANCHES, 2004; MACHADO, 2005; LÔBO et al., 2008), confirmando que SAO2b corresponde ao isômero *trans*.



6 RESUMO DOS RESULTADOS

- Dentre os dezenove extratos etanólicos testados, oriundos de diferentes partes anatômicas de treze espécies vegetais, sete inibiram a produção de TNF- α por células THP-1 estimuladas por LPS, de forma concentração-dependente: *Campomanesia lineatifolia*, *Hymenaea coubaril*, *Hymenaea stigonocarpa*, *Stryphnodendron adstringens*, *Stryphnodendron obovatum*, *Terminalia glabrecens* e *Vernonia phosphorea*.
- Vinte e um dentre os setenta e seis extratos testados apresentaram significativa atividade sequestrante de radicais livres em modelo de DPPH, indicando seu potencial antioxidante, dentre eles o extrato etanólico de *S. adstringens*. Essa atividade parece estar relacionada à ocorrência dos polifenóis nos extratos ativos.
- Os extratos vegetais mais ativos no modelo de inibição da produção de TNF- α pelas células THP-1 estimuladas por LPS, etanólico de folhas de *C. lineatifolia*, etanólico, aquoso e em acetato de etila de *S. adstringens*, etanólico e aquoso de *S. obovatum* e etanólico e aquoso de *T. glabrescens*, também foram ativos no modelo de sequestro de radicais livres do DPPH.
- Dentre as seis frações testadas no ensaio de inflamação aguda induzida por LPS na cavidade articular do joelho de camundongos, as frações aquosa e orgânica de *Stryphnodendron adstringens* mostraram-se mais eficientes na redução da migração celular, com resposta dose-dependente, indicando uma potencial atividade anti-inflamatória da espécie. Essa atividade parece ser atribuída à presença de polifenóis.
- A fração enriquecida em polifenóis, SAO2, e a substância isolada 4'-*O*-metil-galocatequina, SAO1, obtidos de *S. adstringens* reduziram, de maneira dose-dependente, a migração celular para a cavidade articular do joelho de camundongos, no ensaio de inflamação induzida por LPS.
- A fração orgânica, SAO, e a fração enriquecida em polifenóis, SAO2, reduziram a migração celular em modelo de artrite induzida por antígeno em camundongos, de maneira dose-dependente; nesse mesmo ensaio, a 4'-*O*-metil-galocatequina, SAO1, demonstrou essa habilidade apenas na maior dose avaliada.
- A fração enriquecida em polifenóis, SAO2, foi incapaz de atenuar o efeito da colite ulcerativa, em camundongos estimulados por TNBS.

- Análises cromatográficas das frações orgânica e aquosa de *S. adstringens* indicaram a presença de fenóis, como prodelfinidinas. Em algumas sub-frações oriundas de fracionamentos cromatográficos dessas frações, foi identificada a presença de ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina e galato de epigalocatequina.
- A 4'-*O*-metil-galocatequina foi isolada a partir da fração orgânica e identificada por técnicas espectroscópicas usuais.
- A fração orgânica de *S. adstringens* foi caracterizada por CLUE-EM e foram identificados, além do ácido gálico, 11 prodelfinidinas: galocatequina, epigalocatequina, galato de epigalocatequina, 4'-*O*-metil-galocatequina, galato de 4'-*O*-metil-galocatequina, além de um dímero composto de duas unidades de (epi)galocatequina, dois dímeros compostos de duas unidades de galato de (epi)galocatequina, um dímero composto de duas unidades de galato de (epi)galocatequina, sendo uma delas metilada, um dímero composto de uma unidade de (epi)galocatequina e uma unidade de galato de (epi)galocatequina e um dímero composto de uma unidade de (epi)galocatequina e uma unidade de 4'-*O*-metil-(epi)galocatequina.

O resumo dos resultados é apresentado na Figura 50:

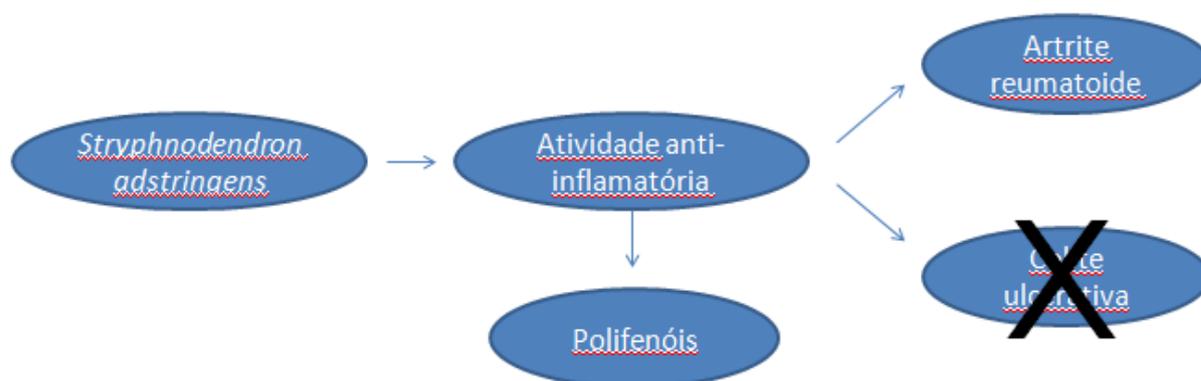


Figura 50 – Representação esquemática dos resultados obtidos no trabalho. A espécie vegetal *S. adstringens* apresentou atividade anti-inflamatória, atribuída à presença de polifenóis, confirmada em modelo de artrite reumatóide, mas não no modelo de colite ulcerativa.

7 CONCLUSÃO

Nesse trabalho, inicialmente, foram avaliadas 13 plantas medicinais brasileiras, utilizando-se diferentes extratos de diferentes partes anatômicas, gerando um total de 19 extratos diferentes. A avaliação foi feita quanto à potencial atividade anti-inflamatória e antioxidante dos extratos, utilizando-se os testes de inibição a produção de TNF- α por células THP-1 estimuladas por LPS e sequestro de radicais livres DPPH. Destes, 8 extratos, de 4 plantas diferentes, apresentaram potencial satisfatório, com comportamento concentração-dependente nas doses avaliadas, podendo assim ser testados em modelos inflamatórios mais específicos.

Os extratos mais ativos foram avaliados em ensaio de inflamação aguda induzida por LPS na cavidade articular do joelho de camundongos, sendo que os dois extratos que obtiveram melhor resultado foram o aquoso e o orgânico de cascas de *Stryphnodendron adstringens*, que mostraram-se eficientes na redução da migração celular, com resposta dose-dependente, apresentando potencial para o tratamento da artrite reumatoide. Essa atividade é atribuída às prodelphinidinas presentes no extrato, dentre elas, 4'-*O*-metil-galocatequina, que pôde ser posteriormente isolada e caracterizada a partir da fração orgânica, e mostrou-se ativa nesse mesmo ensaio de atividade anti-inflamatória.

Em modelo de artrite induzida por antígeno, entretanto, observou-se que SAO e SAO2, a fração orgânica enriquecida em polifenóis, foram mais eficientes nesse modelo que a 4'-*O*-metil-galocatequina, SAO1, o que indica que a ação sinérgica das prodelphinidinas presentes nas frações é potencialmente mais eficaz que a substância isolada. Esses resultados demonstram o potencial anti-artrítico de *S. adstringens*.

Também foi avaliada a potencial atividade anti-inflamatória de *S. adstringens* em modelo de colite ulcerativa, entretanto, uma vez que a fração testada, SAO2, não apresentou resultados promissores no modelo, a planta parece não ser eficaz no tratamento dessa doença.

Devido ao potencial da fração orgânica de *Stryphnodendron adstringens* para o tratamento da artrite reumatoide, foi realizado estudo fitoquímico para sua caracterização. Assim, esse estudo também fornece método simples para a obtenção de 4'-*O*-metil-galocatequina, marcador químico da espécie, além da caracterização dos polifenóis presentes no extrato por ULPC-MS-ESI, o que possibilitará a produção e o controle de qualidade de fitoterápicos e fitocosméticos que utilizem ou possam vir a utilizar essa fração com maior qualidade e, conseqüentemente, maior segurança e eficácia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALBERS, C.; GERLAG, D.; VOS, K.; VERVOORDELDONK, M.; LANDEWÉ, R.; TAK, P. P. Intra-articular etanercept treatment in inflammatory arthritis: A randomized double-blind placebo-controlled proof of mechanism clinical trial validating TNF as a potential therapeutic target for local treatment. *Joint Bone Spine*, v. 82, p. 338-344, 2015

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FRANÇA, P.F; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn*. v. 18, P. 472-508, 2008

AHMAD, S. F.; BANI, S., SULTAN, P.; ALI, S. A.; BAKHEET, S. A.; ATTIA, S. M.; ABD-ALLAH, A. R. TNF- α inhibitory effect of *Euphorbia hirta* in rats. *Pharmaceutical Biology*, v. 51, p. 411-417, 2013

AMAYA-AMAYA, J.; JAVIER-CALIXTO, O.; SAADE-LEMUS, S.; CALVO-PARAMO, e.; MANTILLAA, R.; ROJAS-VILLARRAGA, R.; ANAYA, J. Does non-erosive rheumatoid arthritis exist? A cross-sectional analysis and a systematic literature review. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, v.44, p.489–498, 2015

ALESSANDRI, A. L.; SOUSA, L. P.; LUCAS, C. D.; ROSSI, A. G.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacology & Therapeutics*. V. 139, n. 2, p. 189-212. 2013.

ALLISON, A. C.; CACABELOS, R.; LOMBARDI, V. R.; ALVAREZ, X. A.; VIGO, C. Celastrol, a potent antioxidant and anti-inflammatory drug, as a possible treatment for Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. V. 25, n. 7, p. 1341-1357. 2001.

ALMEIDA, N.; BASTO, F.; CORRÊA, C.; PEREIRA, D. Química no Mundo Real – Química 11. V. 1, 1.^a Edição, Porto Editora, Maia, p. 22-24. 2011

ALTWEGG, R.; VINCENT, T. TNF Blocking Therapies and Immunomonitoring in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Mediators Inflamm*. ID 172821. 2014.

AUDI, E.A.; TOLEDO, D.P.; PERES, P.G.; KIMURA, E.; PEREIRA, W.K.; DE MELLO, J.C.; NAKAMURA, C.; ALVES-DO-PRADO, W.; CUMAN, R.K.; BERSANI-AMADO, C.A. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. *Phytother Res*. v.13, p.264-266, 2009

BAGCHI, D.; GARG, A.; KROHN, R.; BAGCHI, M.; BAGCHI, D. J.; BALMOORI, J.; STOHS, S. J. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. *Gen Pharmacol*. V. 30, p. 771-776. 1998.

BAHADIR, O.; ÇITOĞLU, G. S.; OZBEK, H.; DALL'ACQUA, S.; HOŠEK, J.; SMEJKAL, K. Hepatoprotective and TNF- α inhibitory activity of *Zosima absinthifolia* extracts and coumarins. *Fitoterapia*. V. 82, n. 3, p. 45445-9. 2011.

- BANG, J. S.; OH, D. H.; CHOI, H. M.; SUR, B. J.; LIM, S. J.; KIM, J. Y.; YANG, H. I.; YOO, M. C.; HAHM, D. H.; KIM, K. S. Anti-inflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1 β -stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. *Art. Res. Ther.*, v. 11, p. R49-R58, 2009
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Quim. Nova*, V. 32, n. 3, p. 679-688. 2009.
- BARROS, W. M.; RAO, V. S. N.; SILVA, R. M.; LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O. Anti-inflammatory effect of the ethanolic extract from *Bowdichia virgilioides* H.B.K. stem bark. *An. Acad. Bras. Cienc.* V. 82, n.3, p. 609-616. 2010.
- BARSANTE, M. M.; CUNHA, T. M.; ALLEGRETTI, M.; CATTANI, F.; POLICANI, F.; BIZZARRI, C.; TAFURI, W. L.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; BERTINI, R.; TEIXEIRA, M. M. Blockade of the chemokine receptor CXCR2 ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats. *Br J Pharmacol.* V. 153, n. 5, p. 992-1002. 2008.
- BERG, M. E. *Plantas medicinais da Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático*. 2ª Ed. Belém: Mus Para Emílio Goeldi, 1993.
- BISCHOFF SC. Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* V. 6, p. 733-740. 2008.
- BITON, J.; BOISSIER, M. C.; BESSIS, N. TNF alpha: activator or inhibitor of regulatory T cells? *Joint Bone Spine.* V. 79, p. 119-123. 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 de 29.05.03. Determina a Publicação do “Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. *Diário Oficial da União*, 02.06.03.
- BRENNAN, F.M.; GIBBONS, D., MITCHELL, T.; COPE, A.P.; MAINI, R.N.; FELDMANN, M. Enhanced expression of tumor necrosis factor receptor mRNA and protein in mononuclear cells isolated from rheumatoid arthritis synovial joints. *Eur J Immunol.* v.22, p.1907-12, 1992.
- BRESSAN, E.; TONUSSI C.R.; Antiinflammatory effects of etoricoxib alone and combined with NSAIDs in LPS-induced reactive arthritis. *Inflamm. Res.*, v. 57, p.586-592, 2008
- BRYNSKOV, J.; TVEDE, N.; ANDERSEN, C. B.; VILIEN, M. Increased concentrations of interleukin-1 beta, interleukin-2 and soluble interleukin-2 receptors in endoscopic mucosal biopsy specimens with active inflammatory bowel disease. *Gut.* V. 33, p.55-58. 1993.
- BUENDÍA, B.; GIL, M.I.; TUDELA, J.A.; GADY, A.L.; MEDINA, J.J.; SORIA C.; LÓPEZ, J.M.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A..HPLC-MS analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15 strawberry cultivars. *J Agric Food Chem*, v.58, p.3916-3926, 2010.
- BYKERK, V.P.; SCHOELS, M.M. Treatment strategies for early rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, v. 25, p. 375-383, 2013.

CACHOFEIRO, V.; MIANA, M.; HERAS, N.; MARTÍN-FERNÁNDEZ, B.; BALLESTEROS, S.; BALFAGÓN, G., LAHERA, V. Inflammation: a link between hypertension and atherosclerosis. *Curr. Hypertens. Rev.* V.5, p. 40-48, 2009.

CASTILHO, R. O. *Química de Chrysobalanus icaco L. e Licania tomentosa Benth (Chrysobalanaceae): plantas brasileiras com potencial terapêutico.* Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. 176p. 2001. (tese).

CAMPANA, P. R. V. Espécies vegetais e produtos naturais com potencial atividade antiartrítica: fitoquímica e atividade anti-tnf- α de *Mansoa hirsuta* e *Ouratea semiserrata*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 265p, 2014 (tese)

CARRARA, M. R. *Espécies de Campomanesia Ruiz & Pavon (Myrtinae, Myrtaceae) ocorrentes no Estado do Rio de Janeiro.* Rio de Janeiro: Universidade do Rio de Janeiro. 187p. 1997. (dissertação).

CARVALHO, P. S. P.; TAGLIAVINI, D. G.; TAGLIAVINI, R. L. Cicatrização cutânea após aplicação tópica de creme de calêndula e de associação de confrei, própolis e mel em feridas infectadas: um estudo clínico e histológico em ratos. *Rev. Ciênc. Biom.* V. 12, p. 39-50, 1991.

CASTILHO, R. O. *Química de Chrysobalanus icaco L. e Licania tomentosa Benth (Chrysobalanaceae): plantas brasileiras com potencial terapêutico.* Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. 176p. 2001. (tese).

CELEGHINI, M. S.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Sprengel "guaco" leaves. *J. Braz. Chem. Soc.* V. 12, p. 706-709. 2001.

CHEN, Z. Y.; CHAN, P. T.; HO, K. Y.; et al. Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chem. Phys. Lipids.* V. 79, p. 157-163. 1996.

CHOPRA, A.; SALUJA, M.; TILLU, G. Ayurveda-Modern Medicine Interface: A Critical Appraisal Of Studies Of Ayurvedic Medicines To Treat Osteoarthritis And Rheumatoid Arthritis.. *J Ayurveda Integrative Med (J-AIM)*, v.1, p.190-198, 2010

CHUNG, K. F. Inflammatory biomarkers in severe asthma. *Curr Opin Pulm Med.* V. 18, p. 35-41. 2012.

CLARK-LEWIS, J. W. Nuclear magnetic resonance spectra, configuration and conformation of flavan derivatives. *Aust J Chem*, v.21, p.2059-2075, 1968

COELHO, R. G.; VILEGAS, K. F.; DEVIENNE, M. S. G.; RADDI, A. A new cytotoxic naphthopyrone dimer from *Paepalanthus bromelioides*. *Fitoterapia* V. 71, p. 497-500. 2000.

COELHO, F. M.; PINHO, V.; AMARAL, F. A.; SACHS, D.; COSTA, V. V.; RODRIGUES, D. H.; VIEIRA, A. T.; SILVA, T. A.; SOUZA, D. G.; BERTINI, R.; TEIXEIRA, A. L.; TEIXEIRA, M. M. The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis & Rheumatism*. V. 58, n. 8, p. 2329–2337. 2008.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (Eds.). *Robbins Pathologic Basis of Disease* (6th ed.). Philadelphia: WB Saunders Co. 1999.

CORRÊA, M. P. *Dicionário de plantas úteis do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura. 1962.

CORRÊA, M. P. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil*, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro. V. 5, p. 195. 1974

CORREA, M. P. *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. V.6. Rio de Janeiro/Brasília: Imprensa Nacional Brasília, Ministério da Agricultura. 1984.

COSTA, M. A.; PALAZZO DE MELLO, J. C.; KANESHIMA, E. N.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; AUDI, E. A.; NAKAMURA, C. V. Acute and Chronic Toxicity of an Aqueous Fraction of the Stem Bark of *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) in Rodents. *Evid Based Complement Alternat Med*. ID 841580. 2013.

COSTA, J. O.; LEMOS, L. L. B.; MACHADO, M. A. A.; ALMEIDA, A. M.; KAKEHASID, A. M.; ARAÚJO, V. E.; CHERCHIGLIA, M. L.; ANDRADE, E. I. G.; ACURCIO, F. A. Influximabe, metotrexato e sua combinação no tratamento da artrite reumatoide: revisão sistemática e metanálise. *Rev. Bras. Reumatol.*, v.5, p.146–158, 2015

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1830, p 3670-3695, 2013

CRESPO, M.E.; GÁLVEZ, J.; CRUZ, T.; OCETE, M.A.; ZARZUELO, A. Anti-inflammatory activity of diosmin and hesperidin in rat colitis induced by TNBS. *Planta Med.*, v.65, p.651-653, 1999

CROFT, M.; BENEDICT, C. A.; WARE, C. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. *Drug Discov.*, v. 12, p. 147-168, 2013

CZOCHANSKA, Z.; FOO, L. Y.; NEWMAN, R. H., PORTER, L. J., THOMAS, W. A., JONES, W. T. Direct proof of a momogeneous polyflavan-3-ol structure for polymeric proanthocyanidina. *J. Chem. Soc. Chemical Communications*, p. 375-377. 1979

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The immune system. Part I. *N. Engl. J. Med.* V. 343, p. 37-50. 2000.

DI STASI, L. C.; CAMUESCO, D.; NIETO, A.; VILEGAS, W.; ZARZUELO, A.; GALVEZ, J. Intestinal anti-inflammatory activity of paepalantine, an isocoumarin isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides*, in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Planta Med.* V. 70, n. 4, p. 315-320. 2004.

DOWLING, D. K.; SIMMONS, L. W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history. *Proceeding of the Royal Society B-Biological Sciences* V. 276, p. 1737-1745. 2009.

FARIAS, K.S.; SANTOS, T.S.N.; PAIVA, M.R.A.B.; ALMEIDA, S.M.L.; GUEDES P.T.; VIANNA, A.C.A; FAVARO, S.P.; BUENO, N.R.; CASTILHO, R.O. Antioxidant properties of species from the Brazilian *cerrado* by different assays. *Rev. bras. plantas med.* V. 15, n. 4, p. 520-528. 2013.

FARINON, M.; LORA, P.S.; FRANCESCATO, L.N.; BASSANI, V.L.; HENRIQUES, A.T.; XAVIER, R.M.; DE OLIVEIRA, P.G. Effect of Aqueous Extract of Giant Horsetail (*Equisetum giganteum* L.) in Antigen-Induced Arthritis. *Open Rheumatol J.* v.30, p.129-133, 2013

FARMACOPEIA brasileira. 5 ed. Vol.2. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 808p.

FAUSTMAN, D.; DAVIS, M. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov.* V. 9, p. 482–493. 2010.

FERNANDES, E. S.; PASSOS, G. F.; MEDEIROS, R.; DA CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; PIANOWSKI, L. F.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *Eur J Pharmacol.* V. 569, n. 3, p. 228-236. 2007.

FINE, A. M. Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. *Altern Med Rev.* V. 5, p. 144–151. 2000.

GALLO, M. B. C.; MARQUES, A. S. F.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M.; GUIDO, R. V.; OLIVA, G.; THIEMANN, O. H.; ALBUQUERQUE, S.; FAIRLAMB, A. H. Enzymatic inhibitory activity and tripanocidal effects of extracts and compounds from *Siphoneugena densiflora* O. Berg and *Vitex polygama* cham. *Z Naturforsch C.* V. 63, n. 5-6, p. 371–382. 2008.

GANJARE, A. B.; NIRMAL, S. A.; PATIL, A. N. Use of apigenin from *Cordia dichotoma* in the treatment of colitis. *Fitoterapia.* V. 82, p. 1052–1056. 2011.

GARCIA, J.; MASSOMA, T.; MORIN, C.; MPONDO, T. N.; NYASSÉ, B. 4'-O-Methylgalocatechin from *Panda oleosa*. *Phytochemistry*, v.32, p. 1626-1623, 1993

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; MIGUEL, D. L. S.; SEREA, A. A. T.; PRADO, F. C. Chemical constituents from *Terminalia glabrescens*. *J. Braz. Chem. Soc.* V. 14, n. 3. 2003.

GENTILE, C.; ALLEGRA, M.; ANGILERI, F.; PINTAUDI, A.M.; LIVREA, M.A.; TESORIERE, L. Polymeric proanthocyanidins from Sicilian pistachio (*Pistacia vera* L.) nut extract inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. *Eur. J. Nutr.* V. 51, n. 3, p. 353-363. 2011.

GERLING, M.; GLAUBEN, R.; HABERMANN, J. K.; KÜHL, A. A.; LODDENKEMPER, C.; LEHR, H.; ZEITZ, M.; SIEGMUND, B. Characterization of Chromosomal Instability in Murine Colitis-Associated Colorectal Cancer. *PLoS ONE*, V. 6, n. 7, 2011.

GISLASON, G.H.; RASMUSSEN, J.N.; ABILDSTROM, S.Z.; SCHRAMM, T.K.; HANSEN, M.L.; FOSBØL, E.L.; SØRENSEN, R.; FOLKE, F.; BUCH, P.; GADSBØLL, N.; RASMUSSEN, S.; POULSEN, H.E.; KØBER, L.; MADSEN, M.; TORP-PEDERSEN, C. Increased mortality and cardiovascular morbidity associated with use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in chronic heart failure. *Arch Intern Med.*, v.169, p.141-149, 2009

GROEGER, G.; QUINEY, C.; COTTER, T. G. Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule. *Antioxid Redox Signal.* V. 11, p. 2655–2671. 2009.

GUO, Y.; NONGHUA, L.; BAI, A. Clinical use and mechanisms of infliximab treatment on inflammatory bowel disease: a recent update. *Biomed Research International*. ID 581631. 2013.

GUSMAN, G. S.; CAMPANA, P. R. V.; CASTRO, L. C.; CASTILHO, R.O.; TEIXEIRA, M.M.; BRAGA, F.C. Evaluation of the effects of some Brazilian medicinal plants on the production of TNF- α and CCL2 by THP-1 cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015, p. 497123, 2015

HABTEMARIAN, S. Natural inhibitors of Tumor Necrosis Factor- α production, secretion and function. *Planta Med.*, V. 66, p.303-313. 2000.

HALLETT, J. M.; LEITCH, A. E.; RILEY, N. A.; DUFFIN, R.; HASLETT, C.; ROSSI, A. G. Novel pharmacological strategies for driving inflammatory cell apoptosis and enhancing the resolution of inflammation. *Trends Pharmacol Sci.* V. 29, p. 250–257. 2008.

HANAI, H.; IIDA, T.; TAKEUCHI, K.; WATANABE, F.; MARUYAMA, Y.; ANDOH, A.; TSUJIKAWA, T.; FUJIYAMA, Y.; MITSUYAMA, K.; SATA, M.; YAMADA, M.; IWAOKA, Y.; KANKE, K.; HIRAISHI, H.; HIRAYAMA, K.; ARAI, H.; YOSHII, S.; UCHIJIMA, M.; NAGATA, T.; KOIDE, Y. *Curcumin* maintenance therapy for ulcerative colitis: randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Gastroenterol Hepatol.* V. 4, p. 1502–1506. 2006.

HARRIS, E.D. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med*, v.322, p1277-1289, 1990

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug and medicines: possible modes of actions. *Nat. Prod. Rep.* V. 59, n.2, p. 205-220. 1996.

HEIT, B.; TAVENER, S.; RAHARJO, E.; KUBES, P. An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *J Cell Biol.* V. 159, n. 1, p. 91-102. 2002.

HELIÖVAARA, M.; AHO, K.; AROMAA, A.; KNEKT, P.; REUNANEN, A. Smoking and risk of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.*, v.20, p.1830-1835, 1993

HERATH, H. M.; TAKANO-ISHIKAWA, Y.; YAMAKI, K. Inhibitory effect of some flavonoids on tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulating mouse macrophage cell line J774.1. *J. Med. Food.* V.6, n.4, p. 365-370. 2003.

HIRATA, L. L.; SATO, M. E. O.; SANTOS, C. A. M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. *Acta. Farm. Bonaerense*. V. 23, n. 3, p. 418-424. 2004.

HOCHBERG M.C.; SPECTOR, T.D. Epidemiology of rheumatoid arthritis: update. *Epidemiol Re.*, v.12, p.247-252, 1990

HOFFMANN, J.C.; PETERS, K.; HENSCHKE, S.; HERRMANN, B.; PFISTER, K.; WESTERMANN, J.; ZEITZ, M. Role of T lymphocytes in rat 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) induced colitis: increased mortality after gammadelta T cell depletion and no effect of alphabeta T cell depletion. *Gut*, v.48, p.489-495.

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J.L.; RODRIGUEZ, S. Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. *Planta Medica*, V. 63, p. 2-10, 1997.

HUBER, R.; DITFURTH, A. V.; AMANN, F.; GÜTHLIN, C.; ROSTOCK, M.; TRITTLER R.; KÜMMERER, K.; MERFORT, I. *Tormentil* for active ulcerative colitis: an open-label, dose-escalating study. *J Clin Gastroenterol*. V. 41, p. 834–838. 2007.

HYAMS, J. S.; FITZGERALD, J. E.; TREEM, W. R.; WYZGA, N.; KREUTZER, D. L. Relationship of functional and antigenic interleukin 6 to disease activity in inflammatory bowel disease. *Gastroent*. V.104, n.5, p. 1285-1292. 1993.

IMPELLIZZERI, D.; ESPOSITO, E.; MAZZON, E.; PATERNITI, I.; DI PAOLA, R.,; BRAMANTI, P.; CUZZOCREA, S. Effect of apocynin, a NADPH oxidase inhibitor, on acute lung inflammation. *Biochem Pharmacol*. V. 81, p. 636–648. 2011.

INDRA, M. R.; KARYONO, S.; RATNAWATI, R.; MALIK, S. G. Quercetin supresses inflammation by reducing ERK1/2 phosphorylation and NF kappa B activation in leptin-induced human umbilical vein cells (HUVCs). *BMC Research Notes*. V. 6. P. 275-282. 2013.

ISHIDA, K.; DE MELLO, J.C.; CORTEZ, D.A.; FILHO, B.P.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*. V.58, p.942-949, 2006.

JEAN-GILLES D.; LI, L.; MA, H.; YUAN, T.; CHICHESTER, C.O. Anti-inflammatory effects of polyphenolic-enriched red raspberry extract in an antigen-induced arthritis rat model. *J Agric Food Chem.*, v.60, p.5755-5762, 2013

JORGE-NETO, J.; FRACASSO, J. F.; CAMARGO-NEVES, M. C. L.; SANTOS, L. E.; BANUTH, V. L. Tratamento de úlcera varicosa e lesões de pele com *Calendula officinalis* L. e/ou com *Stryphnodendron barbatiman* (Vellozo) Martius. *Rev. Ciênc. Farm*. V. 17, p. 181-186. 1996.

KAMADA, N.; HISAMATSU, T.; OKAMOTO, S. et al. Abnormally differentiated subsets of intestinal macrophage play a key role in Th1-dominant chronic colitesthrough excess production of IL-12 and IL-23 in reponse to bacteria. *Journal of Immunology*. V. 175, n. 10, p. 6900-6908. 2005.

- KAMIYA, K.; WATANABE, C.; ENDANG, H.; UMAR, M.; SATAKE, T. Studies on the constituents of bark of *Parameria laevigata* moldenke. *Chem. Pharm. Bull.*, V. 49, p. 551-557. 2001.
- KANAI, Y. Genome-wide DNA methylation profiles in precancerous conditions and cancers. *Cancer Sci.* V. 101, p.36–45. 2010.
- KAPLAN, M.; MUTLU, E. A.; BENSON, M.; FIELDS, J. Z.; BANAN, A.; KESHAVARZIAN, A. Use of herbal preparations in the treatment of oxidant-mediated inflammatory disorders. *Complement. Ther. Med.* V. 15, p. 207-216. 2007.
- KARLSON E,W,; LEE, I.M.; COOK, N.R.; MANSON, J.E.; BURING, J.E.; HENNEKENS, C.H.; A retrospective cohort study of cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis in female health professionals. *Arthritis Rheum.*, v.42, 910-917, 1999.
- KAWALEC, P.; MIKRUT, A.; WISNIEWSKA, N.; PILC, A. Tumor necrosis factor- α antibodies (infliximab, adalimumab and certolizumab) in Crohn's disease: sustematic review and meta-analysis. *Arch. Med. Sci.* V. 9, n. 5, p. 765-779. 2013.
- KESHAVARZ, A.; MINAIYAN, M.; GHANNADI, A.; MAHZOUNI, P. Effects of *Carum carvi* L. (Caraway) extract and essential oil on TNBS-induced colitis in rats. *Res Pharm Sci.* v.8, p. 1-8, 2013
- KHANNA, D.; SETHI, G.; AHN, K.S.; PANDEY, M.K.; KUNNUMAKKARA, A.B.; SUNG, B.; AGGARWAL, A.; AGGARWAL, B.B. Natural products as a gold mine for arthritis treatment. *Curr. Opin. Pharmacol.*, v. 7, p. 344–351, 2007
- KIDD, B. L.; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. *Br. J. Anaesth.* V. 87, p. 3–11. 2001.
- KIM, M. J.; SEONG, A. R.; YOO, J. Y.; JIN, C. H.; LEE, Y. H.; KIM, Y. J.; LEE, J.; JUN, W. J.; YOON, H. G. Gallic acid, a histone acetyltransferase inhibitor, suppresses β -amyloid neurotoxicity by inhibiting microglial-mediated neuroinflammation. *Mol Nutr Food Res.* V. 55, n. 12, p. 1798-1808. 2011.
- KILTZ, U.; VAN DER HEIJDE, D.; MIELANTS, H.; FELDTKELLER, E.; BRAUN, J.; ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis: the patient version. *Ann Rheum Dis.*, v.68, p.1381-1386, 2009
- KOETZNER L.; GROVER, G.; BOULET, J.; JACOBY, H.I.. Plant-derived polysaccharide supplements inhibit dextran sulfate sodium-induced colitis in the rat. *Dig Dis Sci.* V.5, p.1278-1285, 2010
- KONTTINEN, Y. T.; KEMPPINEN, P.; SEGERBERG, M. Peripheral and spinal neural mechanisms in arthritis, with particular reference to treatment of inflammation and pain. *Arthritis Rheum.* V. 37, p. 965–982. 1994.
- KORBECKI, J.; BARANOWSKA-BOSIACKA, I.; GUTOWSKA, I.; CHLUBEK, D. The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid. *Journal Of Physiology And Pharmacology.* V. 64, n. 4, p. 409-421. 2013.

KRUIDENIER, L.; VERSPAGET, H.W. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease--radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther.*, v. 16, p. 1997-2015, 2015

KUPPAN, G.; BALASUBRAMANYAM, J.; MONICKARAJ, F.; SRINIVASAN, G.; MOHAN, V.; BALASUBRAMANYAM, M. Transcriptional regulation of cytokines and oxidative stress by gallic acid in human THP-1 monocytes. *Cytokine*. V. 49, n. 2, p.229-234. 2010.

KURECHI, T.; KIKUGAWA, K.; KATO, T. Studies on the antioxidants. XIII Hydrogen donation capability of antioxidants to 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Chem. Pharm. Bull.* V. 28, p. 2089-2093. 1980.

KWON, H. K.; HWANG, J-S.; LEE, C-G.; SO, J-S.; SAHOO, A.; IM, C-R.; JEON, W. K.; KO, B. S.; LEE, S. H.; PARK, Z. Y.; IM, S-H. Cinnamon extract suppresses experimental colitis through modulation of antigen-presenting cells. *World J. Gastroenterol.* V. 17, n. 8, p. 976-986. 2011.

LACET, M. A. B.; ALMEIDA, J. A.; ALMEIDA, R. N.; THOMAS, G. *Resumo do II Simpósio Nacional de Farmacologia e Química de Produtos Naturais*, Fortaleza, Brasil, 1993.

LANGMAN, M.J.; JENSEN, D.M.; WATSON, D.J.; HARPER, S.E.; ZHAO, P.L.; QUAN, H.; BOLOGNESE, J.A.; SIMON, T.J. Adverse upper gastrointestinal effects of rofecoxib compared with NSAIDs. *JAMA*, v.24, p.1929-1933, 1999.

LANGMEAD, L.; FEAKINS, R. M.; GOLDTHORPE, S.; TSIRONI, E.; DE SILVA, A.; JEWEL, D. P.; RAMPTON, D. S. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of oral *Aloe vera* gel for active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* V. 19, n. 7, p.739-747. 2004.

LANGMEAD, L.; MAKINS, R. J.; RAMPTON, D. S. Anti-inflammatory effects of *Aloe vera* gel in human colorectal mucosa in vitro. *Aliment Pharmacol Ther.* V. 19, p. 521-527. 2004.

LAI, W.C.; TSUI, Y.T.; SINGAB, A.N.; EL-SHAZLY, M.; DU, Y.C.; HWANG, T.L.; WU, C.C.; YEN, M.H.; LEE, C.K.; HOU, M.F.; WU, Y.C.; CHANG, F.R. Phyto-SERM constitutes from *Flemingia macrophylla*. *Int J Mol Sci.*, v.14, p.15578-155794, 2013

LAWRANCE, I. C. What is left when anti-tumour necrosis factor therapy in inflammatory bowel diseases fails? *World J Gastroenterol.* V. 20, n. 5, p. 1248-1258. 2014.

LAWRANCE, I. C. Modifying T-cell trafficking to the intestinal as a potential management for inflammatory bowel disease. *Expert Opin Investig Drugs.* V. 21, p. 975-984. 2012.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; & GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* V. 2, p. 787-795. 2002.

LEWIS, A.; LEVY, A. Anti-inflammatory activities of *Cassia alata* leaf extract in Complete Freund's Adjuvant arthritis in rats. *West Indian Med*, v. 60, p. 615-621, 2011

- LICASTRO, F.; CHIAPPELLI, M.; IANNI, M.; PORCELLINI, E. Tumor necrosis factor- α antagonists: differential clinical effects by different biotechnological molecules. *Int J Immunopathol Pharmacol*, v. 22, p.567-572, 2009
- LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; SOUZA, P. T. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for anti-inflammatory activity. *Phytot. Res.* V. 12, p. 218-220. 1998.
- LINGEN, M. W. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Arch. Pathol. Lab. Med.* V. 125, p. 67–71. 2001.
- LO, C.; LAI, T. Y.; YANG, J. H.; YANG, J. S.; MA, Y. S.; WENG, S. W.; CHEN, Y. Y.; LIN, J. G.; CHUNG, J. G. Gallic acid induces apoptosis in A375.S2 human melanoma cells through caspase-dependent and -independent pathways. *Int J Oncol.* V. 37, n. 2, p. 377-385. 2010.
- LÔBO, L. T.; CASTRO, K. C. F.; ARRUDA, M. S. P.; DA SILVA, M. N.; ARRUDA, A. C.; MÜLLER, A. H.; SKELDING, G. M.; ARRUDA, P.; SANTOS, A. S.; SOUZA FILHO, A. P. S.; . Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (leguminosae). *Quím. Nova*, v.31, 2008
- LOPES,, G. C.. Estado botânico, físico-químico, químico e biológico de cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart, (Leguminosae). Maringá: Universidade Estadual de Maringá. 240p. 2003 (dissertação)
- LOPES, F.; COELHO, F. M.; COSTA, V. V.; VIEIRA, L. M.; SOUSA, L. P.; SILVA, T. A.; VIEIRA, L. Q.; TEIXEIRA, M. M.; PINHO, V. Resolution of neutrophilic inflammation by H₂O₂ in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* V. 63, p. 2651–2660. 2011.
- LV, H.; ZHANG, X.; CHEN, X.; XIE, Z.; HU, C.; WEN, C.; JIANG, K. Phytochemical Compositions and Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Crude Extracts from *Ficus pandurata* H. (Moraceae). *Evid Based Complement Alternat Med.* ID 215036. 2013.
- MACHADO, F. A. V Estudo fitoquímico e avaliação da capacidade antioxidante de extratos das casca de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart, Leguminosae, barbatimão. Araraquara: Universidade Estadual Paulista. 106 p. 2005 (dissertação)
- MADALOSSO, R.C.; OLIVEIRA, G.C.; MARTINS, M.T.; VIEIRA, A.E.D.; BARBOSA, J.; CALIARI, M.V.; CASTILHO, R.O.; TAGLIATI, C.A. *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. as a gastroprotective agent. *Journal of Ethnopharmacology.* V. 139, n. 3, p. 772–779. 2012.
- MANDHANE, S. N.; SHAH, J. H.; THENNATI, R. Allergic rhinitis: an update on disease, present treatments and future prospects. *Int Immunopharmacol* V. 11, p. 1646–1662. 2011.
- MARKHAM, K. R. Ultraviolet-visible absorption spectroscopy. In: Techniques of flavonoid identification. Theherne, J. E. e Rubery, P. H. (ed). London: Academic Press. 1982.
- MARQUÉS, L.; PÉREZ-NIEVAS, B. G.; GÁRATE, I.; GARCÍA-BUENO, B.; MADRIGAL, J. L. M.; MENCHÉN, L.; GARRIDO, G.; LEZA, J. C. Anti-inflammatory

effects of *Mangifera indica* L. extract in a model of colitis. *World J. Gastroenterol.* V. 16, n. 39, p. 4922-4931. 2010.

MARSZALEK, A.; MARCINIAK, R.; SZKARADKIEWICZ, A.; WASILEWSKA, A.; CHUDZICKA-STRUGALA, I.; ZIUZIAKOWSKA, H.; ZEBROWSKA, M.; MAJEWSKI, P.; BANASIEWICZ, T.; DREWS, M. Inflammatory bowel disease: is there something new in the immunological background? *F. Histochem. Cytob.* V. 49, n. 2, p. 357-362. 2011.

MAROTTE, H.; RUTH, J.H.; CAMPBELL, P.L.; KOCH, A.E.; AHMED, S. Green tea extract inhibits chemokine production, but up-regulates chemokine receptor expression, in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and rat adjuvant-induced arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, v.49, p.467-479, 2010

MATSUKAWA, A., YOSHIMURA, T., MIYAMOTO, K., OHKAWARA, S., YOSHINAGA, M.. Analysis of the inflammatory cytokine network among TNF- α , IL-1 β , IL-1 receptor antagonist, and IL-8 in LPS-induced rabbit arthritis. *Laboratory Investigation* v.76, p.629-678, 1997

MCINNES, I. B.; SCHEFF, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 07, p.429-442, 2007.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell.* V. 140, p. 771–776. 2010.

MEENA, A. K.; NIRANJAN, U. S.; RAO, M. M.; PADHI, M. M. BABU, R. A review of the important chemical constituents and medicinal uses of *Vitex* genus. *Asian Journal of Traditional Medicines*, V. 6, n. 2, p. 54-60. 2011.

MELLO, J. P. P. (a); PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*. V. 41, p. 807-813. 1996.

MELLO, J. P. P. (b); PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Prorobinetinidins From *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*. V. 42, p. 857-862. 1996.

MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NARDHSTEDT, A. A. A dimeric proanthocyanidin from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*, v. 151, p. 1105-1107, 1999

MENDES, F. R.; CARLINI, E. A. Brazilian plants as possible adaptogens: An ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. V. 109, p. 493–500. 2007.

MENG, H.; TONNESEN, M. G.; MARCHESE, M. J.; CLARK, R. A.; BAHOU, W. F.; GRUBER, B. L. Mast cells are potent regulators of endothelial cell adhesion molecule ICAM-1 and VCAM-1 expression. *J. Cell Physiol.* V. 165, p. 40–53. 1995.

MICHEL, M. C. P. Estudo fitoquímico da fração metanólica do extrato etanólico das folhas e avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de *Campomanesia velutina* (Cambess.) O. Berg. Ouro Preto: Universidade Federal de Ouro Preto. 142p. 2011. (dissertação).

MIN, Y. D.; CHOI, C. H.; BARK, H.; SON, H. Y.; PARK, H. H.; LEE, S.; PARK, J. W.; PARK, E. K.; SHIN, H. I.; KIM, S. H. Quercetin inhibits expression of inflammatory

cytokines through attenuation of NF- κ B and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line. *Inflamm Res.* V. 56, p. 210-215. 2007.

MIN, H.K.; KIM, S.M.; BAEK, S.Y.; WOO, J.W.; PARK, J.S.; CHO, M.L.; LEE, J.; KWOK, S.K.; KIM, S.W.; PARK, S.H. Anthocyanin Extracted from Black Soybean Seed Coats Prevents Autoimmune Arthritis by Suppressing the Development of Th17 Cells and Synthesis of Proinflammatory Cytokines by Such Cells, via Inhibition of NF- κ B. *PLoS One*, v.10, p.e0138201, 2015

MITROULIS, I.; ALEXAKI, V. I.; KOURTZELIS, I.; ZIOGAS, A.; HAJISHENGALLIS, G.; CHAVAKIS, T. Leukocyte integrins: role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory diseases. *Pharmacology Therapy* v.147, p.123-135, 2015

MOCHIZUKI, M.; HASEGAWA, N. Anti-inflammatory effect of extract of Terminalia serecea roots in an experimental model of colitis. *Journal of HealthScience*, V. 53, n. 3, p. 329-331. 2007.

MOREAU, N. M.; CHAMP, M. M.; GOUPRY, S. M.; LE BIZEC, B. J.; KREMPF, M.; DUMON, H. J.; MARTIN, L. J. Resistant starch modulates in vivo colonic butyrate uptake and its oxidation in rats with dextran sulfate sodium-induced colitis. *J. Nutr.* V. 134, n. 3, p. 493–500. 2004.

MOCHIZUKI, M.; HASEGAWA, N. (-)-Epigallocatechin-3-gallate reduces experimental colon injury in rats by regulating macrophage and mast cell. *Phytother Res.* v.24, p.S120-S122, 2010

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* V. 65, n. 1-2, p. 55-63. 1983.

NAIR, V.; SINGH, S.; GUPTA, Y. K. Anti-arthritic and disease modifying activity of *Terminalia chebula* Retz. in experimental models. *J Pharm Pharmacol.* V. 62, n. 12, p. 1801-1806. 2010.

NAIR, M. P.; MAHAJAN, S.; REYNOLDS, J. L.; AALINKEEL, R.; NAIR, H.; SCHWARTZ, S. A.; KANDASWARNI, C. The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (TNF α) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells in via modulation of the NF- κ B system. *Clin Vaccine Immunol.* V. 6, p. 319–328. 2006.

NAKAGAWA, H.; WACHI, M.; WOO, J.; KATO, M.; KASAI, S.; TAKAHASHI, F.; LEE, I.; NAGAI, K. Fenton reaction is primarily involved in a mechanism of (-)-epigallocatechin 3-gallate to induce osteoclastic cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 292, p. 94-101. 2002.

NAKAYAMA, M.; NIKI, Y.; KAWASAKI, T.; TAKEDA, Y.; HORIUCHI, K.; SASAKI, A.; OKADA, Y.; UMEZAWA, K.; IKEGAMI, H.; TOYAMA, Y.; MIYAMOTO, T. Enhanced susceptibility to lipopolysaccharide-induced arthritis and endotoxin shock in interleukin-31 alpha transgenic mice through induction of tumor necrosis factor alpha. *Arthritis & Therapy* v.14, p.1-11, 2012

- NASCIMENTO, A. M.; GUEDES, P. T.; CASTILHO, R. O.; VIANNA-SOARES, C. D. *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) proanthocyanidins quantitation by RP-HPLC. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* V. 49, n. 3, p. 549-568. 2013.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* V. 75, n. 3, p. 2655-2671. 2012.
- NG, S. C.; LAM, Y.T.; TSOI, K.K.; CHAN, F.K.; SUNG, J.J.; WU, J.C. Systematic review: the efficacy of herbal therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*, v. 38, p.854–863, 2013
- NISHIJIMA, C. M. Caracterização do efeito anti-inflamatório e anti-hemorragico dos extratos e frações enriquecidas de espécies vegetais do projeto temático BIOTA/FAPESP. Botucatu: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 106p. 2010. (dissertação).
- OCCHIONI, E. M. Considerações taxonômicas no gênero *Stryphnodendron* Mart. (Leguminosae Mimosoideae) e distribuição geográfica das espécies. *Acta Bot. Bras.* V. 4, n. 2, p. 153-158. 1990.
- O'DELL, J.R. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.*, v. 350, p. 2591- 2602, 2004.
- OKABE, S.; SUGANUMA, M.; IMAYOSHI, Y.; TANIGUCHI, S.; YOSHIDA, T.; FUJIKI, H. New TNF-alpha releasing inhibitors, geraniin and corilagin, in leaves of *Acer nikoense*, Megusurino-ki. *Biol Pharm Bull.* V. 24, n. 10, p. 1145-1148. 2001.
- ORSI, P. R.; SEITO, L. N.; DI STASI, L. C. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A tropical medicinal plant with intestinal anti-inflammatory activity in TNBS model of intestinal inflammation in rats. *J Ethnopharmacol.* V. 151, n. 1, p. 380-385. 2014.
- ORTIGOSA, L. Concepto actual y aspectos clínicos de la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa. *Colomb. Méd.* V. 36, n. 2, p. 16-24. 2005.
- OSAKABE, N.; YASYDA, A.; NATSUME, M.; SANBONGI, C.; KATO, Y.; OSAWA, T.; YOSHIKAWA, T. Rosmarinic acid, a major polyphenolic component of *Perilla frutescens*, reduces lipopolisaccharide (LPS)-induced liver injury in D-galactosamine (D-GalN)-sensitized mice. *Free adic. Biol. Med.* V. 33, n. 6, p. 798-806. 2002.
- OZ, H.S.; CHEN, T.; DE VILLIERS, W.J. Green Tea Polyphenols and Sulfasalazine have Parallel Anti-Inflammatory Properties in Colitis Models. *Front Immunol.* v,5; p.132, 2013
- PAIVA, L. A. F.; GURGEL, L. A.; SILVA, R. M.; TOMÉ, A. R.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. *Vasc. Pharmacol.* V. 39, p. 303-307. 2003.
- PANDURANGAN AK, MOHEBALI N, NORHAIZAN ME, LOOI CY. Gallic acid attenuates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in BALB/c mice. *Drug Des Devel Ther.*, v.30, p.3923-3934, 2015
- PALLADINO, M. A.; BAHJAT, F. R.; THEODORAKIS, E. A.; MOLDAWER, L. L. Anti-TNF- α therapies: the next generation. *Nat. Rev. Drug Disc.* V. 2, p. 736-746. 2003.

PALSSON-MCDERMOTT, E. M.; O'NEILL, L. A. Signal transduction by lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* v.113, p.153-162, 2004

PARK, M. K.; PARK, J. S.; CHO, M. L.; OH, H. J.; HEO, Y. J.; WOO, Y. J.; HEO, J. M.; PARK, M. J.; PARK, H. S.; PARK, S. H.; KIM, H. Y.; MIN, J. K. Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) differentially regulates Foxp3⁺ regulatory and IL-17⁺ pathogenic T cell in autoimmune arthritis. *Immunol. Lett*, v. 135, p. 50-58, 2011

PATANKAR, M. S.; OEHNINGER, S.; BARNETT, T.; WILLIAMS, R. L.; CLARK, G. F. A revised structure for fucoid may explain some of its biological activities. *J. Biol. Chem.* V. 268, p. 21770–21776. 1993.

PAUL, A. T.; GOHIL, V. M.; BHUTANI, K. K. Modulating TNF- α signaling with natural products. *Drug Discov. Today*. V. 11, p. 725-732. 2006.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introdução à espectroscopia, 4^a. ed (traduzida). São Paulo: Cengage Learning, 2012

PEREIRA, A. B. D. Contribuição para a padronização química de *Hancornia speciosa* Gomes: desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a quantificação de marcadores químicos. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 150p. 2012. (dissertação).

PEREZ, C.; ALBERT, I.; DEFAY, K.; ZACHARIADES, N.; GOODING, L.; KRIEGLER, M. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell*. V. 63, p. 251-258. 1990.

PERROT, S.; GUILBAUD, G. Pathophysiology of joint pain. *Rev. Rheum. Engl.* V. 63, p. 485–492. 1996.

PHILLIPS, D. C.; DIAS, H. K.; KITAS, G. D.; GRIFFITHS, H. R. Aberrant reactive oxygen and nitrogen species generation in rheumatoid arthritis (RA): causes and consequences for immune function, cell survival, and therapeutic intervention. *Antioxid Redox Signal*. V. 12, p. 743–785. 2010.

PINAZO-DURÁN, M. D.; GALLEGRO-PINAZO, R.; GARCÍA-MEDINA, J. J.; ZANÓN-MORENO, V.; NUCCI, C.; DOLZ-MARCO, R.; MARTÍNEZ-CASTILLO, S.; GALBIS-ESTRADA, C.; MARCO-RAMÍREZ, C.; LÓPEZ-GÁLVEZ, M. I.; GALARRETA, D. J.; DÍAZ-LLÓPIS, M. Oxidative stress and its downstream signaling in aging eyes. *Clin Interv Aging*. V. 9, p. 637-652. 2014.

PODDUBNY, D.; SONG, I.H.; SIEPER, J. A systematic comparison of rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis: non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Clin Exp Rheumatol.*, v.;27, p.148-151

PODREZ, E. A.; ABU-SOUD, H. M.; HAZEN, S. L. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. V. 28, n. 12, p. 1717-1725. 2000.

POTT, A.; POTT, V. J. *Plantas que curam*. Embrapa, 1994.

PULLMAN, W. E.; ELSBURY, S.; KOBAYASHI, M.; HAPPEN, A. J.; DOE, W. F. Enhanced mucosal cytokine production in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol.* V. 102, p. 529-537. 1992.

RAFFEINER, B.; BOTSIOS, C.; OMETTO, F.; BERNARDI, L.; MONTANTE, A.; SFRISO, P.; TODESCO, S.; PUNZI, L. TNF α blockers and infectious risk in rheumatoid arthritis. *Reumatismo*, v.61, p.165-73, 2009

RAMOS, A. C. S. Contribuições à biogeografia do cerrado e da Mata Atlântica: filogeografia e diversidade genética em espécies vicariantes de Jatobá (*Hymenaea courbaril* e *H. stigonocarpa*). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 78 f. 2008. (tese).

RATHI, B.; BODHANKAR, S.; MOHAN, V.; THAKURDESAI, P. Ameliorative Effects of a Polyphenolic Fraction of *Cinnamomum zeylanicum* L. Bark in Animal Models of Inflammation and Arthritis. *Sci Pharm.* V. 81, n. 2, p. 567-589. 2013.

RAUH, L. K.; HORINOUCHE, C. D.; LODDI, A. M.; PIETROVSKI, E. F.; NERIS, R.; SOUZA-FONSECA-GUIMARÃES, F.; BUCHI, D. F.; BIAVATTI, M. W.; OTUKI, M. F.; CABRINI, D. A. Effectiveness of *Vernonia scorpioides* ethanolic extract against skin inflammatory processes. *J Ethnopharmacol.* V. 138, n. 2, p. 390-397. 2011.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* V. 20, p. 933-956. 1996.

RISQUES, R. A.; LAI, L. A.; BRETNALL, T. A.; LI, L.; FENG, Z. Ulcerative colitis is a disease of accelerated colon aging: evidence from telomere attrition and DNA damage. *Gastroenterol.* V. 135, p. 410-418. 2008.

ROBINSON, R. R.; FEIRTAG, J.; SLAVIN, J. L. Effects of dietary arabinogalactan on gastrointestinal and blood parameters in healthy human subjects. *J. Am. Coll. Nutr.* V. 20, p. 279-285. 2001.

ROGLER, G.; Is inflammatory bowel disease more severe when it appears at younger ages? *Digestion*, v.81, p.235-236, 2010

ROLLINS, B. J. Chemokines. *Blood* V. 90, p. 909-928. 1997.

SACHS, D.; COELHO, F. M.; COSTA, V. V.; LOPES, F.; PINHO, V.; AMARAL, F. A.; SILVA, T. A.; TEIXEIRA, A. L.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M. Cooperative role of tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β and neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice. *Br J Pharmacol.* V. 162, n. 1, p. 72-83. 2011.

SAEED, S. A.; URFY, M. Z. S.; ALI, T. B.; KHIMANI, F. W.; GILANI, A. Antioxidants: their role in health and disease. *Int. J. Pharmacol.* V. 1, n. 3, p. 226-233. 2005.

SALAŁA, M.; LEWANDOWSKA, U.; SOSNOWSKA, D.; ZAKRZEWSKI, P. K.; CYGANKIEWICZ, A. I.; PIECHOTA-POLAŃCZYK, A.; SOBCZAK, M.; MOSINSKA, P.; CHEN, C.; KRAJEWSKA, W. M.; FICHNA, J. Polyphenol extract from evening primrose pomace alleviates experimental colitis after intracolonic and oral administration in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, v. 387, p. 1069-1078, 2014

SANCHES, A. C. C.; LOPES, G. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. Antioxidant and antifungal activities of extract and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* V. 41, n. 1, p.101-107. 2005.

SANCHES, A. C. C. Estudo anatômico, físico-químico, químico, da atividade antioxidante, antimicrobiana e da ação cicatrizante do extrato das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth. (Leguminosae). Araraquara: Universidade Estadual Paulista. 223p. 2004 (dissertação)

SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; MARTÍN, A.R.; VILLEGAS, I.; DE LA LASTRA, C.A. Rosiglitazone, a PPAR γ ligand, modulates signal transduction pathways during the development of acute TNBS-induced colitis in rats. *Eur J Pharmacol.* v.562, p.247-258, 2007.

SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; VERA, B.; GÁLVEZ, J.; ZARZUELO, A.. Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. *Life Sci.* v.70, p.3097-3108, 2002

SANDBORN, W. J.; TARGAN, S. R.; BYERS, V. S.; RUTTY, D. A.; MU, H.; ZHANG, X.; TANG, T. *Andrographis paniculata* Extract (HMPL-004) for Active Ulcerative Colitis *Am. J. Gastroenterol.* V. 108, n. 1, p. 90-98. 2013.

SANDBORN, W. J.; RUTGEERTS, B. G.; FEAGAN, B. G. et al. Colectomy rate comparisiona after treatment of ulcerative colites with placebo or infliximab. *Gastroenterology* V. 137, n. 4, p. 1250-1260. 2009.

SANGUINETTI, E. E. Plantas que curam. 2ª Ed., 1989.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. *Taninos*. In: SIMÕES, C. M. O.; CHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC, p. 615-616, 2004.

SANTHOSH, S.; ANANDAN, R.; SINI, T. K.; MATHEW, P. T. Protective effect of glucosamine against ibuprofen-induced peptic ulcer in rats. *J. Gastroenterol. Hepatol.* V. 22, p. 949–953. 2007.

SARAVANAN, S.; MUTHEESWARAN, S.; SARAVANAN, M.; CHELLAPPANDIAN, M.; PAULRAJ G. M.; RAJ M. K.; IGNACIMUTHU, S.; DURAI PANDIYAN, V. Ameliorative effect of *Drynaria quercifolia* (L.) J. Sm., an ethnomedicinal plant, in arthritic animals. *Food Chem Toxicol.* V. 51, p. 356-363. 2013.

SARTOR, R. B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, v.134, p.577-94, 2008

SCHMIDT, C.A.; MURILLO, R.; BRUHN, T.; BRINGMANN, G.; GOETTERT, M.; HEINZMANN, B.; BRECHT, V.; LAUFER, S.A.; MERFORT, I. Catechin derivatives from *Parapiptadenia rigida* with in vitro wound-healing properties. *J Nat Prod.*, v.73, p.2035-2041, 2010

SCHNOOR, M., 2015. Endothelial actin-binding proteins and actin dynamics in leukocyte transendothelial migration. *Journal of Immunology* v.194, p.3535-3541, 2015

SETHI, G.; SUNG, B.; AGGARWAL, B. B. TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front Biosci* V. 13, p. 5094–5107. 2008.

SEO, J. B.; JEONG, J. Y.; PARK, J. Y.; JUN, E. M.; LEE, S. I.; CHOE, S. S.; PARK, D. Y.; CHOI, E. W.; SEEN, D. S.; LIM, J. S.; LEE, T. G. Anti-Arthritic and Analgesic Effect of NDI10218, a Standardized Extract of *Terminalia chebula*, on Arthritis and Pain Model. *Biomol Ther.* V. 20, n. 1, p. 104-112. 2012.

SEPULVEDA, S. E.; BELTRÁN, C. J.; PERALTA, A.; RIVAS, P.; ROJAS, N.; FIGUEROA, C.; QUERA, R.; HERMOSO, M. A. Inflammatory bowel diseases: an immunological approach. *Rev. Med. Chile.* V. 136, n. 3, p. 367–375. 2008.

SFIKAKIS, P. P. The first decade of biologic TNF antagonists in clinical practice: lessons learned, unresolved issues and future directions. *Curr Dir Autoimmun.* V. 11, p.180-210. 2010.

SHANAHAN, F. Crohn's disease. *Lancet.* V. 359, p. 62-69. 2002.

SHARMA, S.; SAHU, D.; DAS, H.R.; SHARMA, D. Amelioration of collagen-induced arthritis by *Salix nigra* bark extract via suppression of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress. *Food Chem Toxicol.*, v.12, p.3395-3406

SHUKLA, M.; GUPTA, K.; RASHEED, Z.; KHAN, K.A.; HAQQI, T.M. Consumption of hydrolyzable tannins-rich pomegranate extract suppresses inflammation and joint damage in rheumatoid arthritis. *Nutrition.* v.24, p.733-43, 2008

SHIOYA, M.; NISHIDA, A.; YAGI, Y.; OGAWA, A.; TSUJIKAWA, T.; KIM-MITSUYAMA, S.; TAKAYANAGI, A.; SHIMIZU, N.; FUJIYAMA, Y.; ANDO, A. Epithelial overexpression of interleukin-32alpha in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol.* v.149, p.480-486, 2007.

SILMAN A.J.; NEWMAN, J.; MACGREGOR A.J. Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. Results from a nationwide study of disease-discordant twins. *Arthritis Rheum.*, v.39, p.732-735, 1996

SILVA, M. F. Combretaceae do Estado do Rio de Janeiro. Subtribo Terminalinae. *Rodriguésia* 36: 91–104. 1984.

SMOLEN, J.S.; STEINER, G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 2, p.473-488, 2003.

SURESH, E. Recent advances in rheumatoid arthritis. *Postgrad Med J.*, v.86, p.243-250, 2010

TANG, T.; TARGAN, S. R.; LI, Z-S.; XU, C.; BYERS, V. S.; SANDBORN, W. J. Randomised clinical trial: herbal extract HMPL-004 in active ulcerative colitis – a double-blind comparison with sustained release mesalazine. *Aliment. Pharmacol. Ther.* V. 33, p. 194-202. 2011.

TARGAN, S. R. Biology of inflammation in Crohn's disease: mechanisms of action of anti-TNF- α therapy. *Can. J. Gastroenterol.* V. 14, p. 13–16. 2000.

TARGAN, S.R.; HANAUER, S.B.; VAN DEVENTER, S.J.; MAYER, L.; PRESENT, D.H.; BRAAKMAN, T.; DEWOODY, K.L.; SCHAIKLE, T.F.; RUTGEERTS, P.J.. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumour necrosis factor alpha for Chron's disease. *NEJM*, v.337, p. 1029-1035, 1997

TALWAR, S.; NAYAK, P. G.; MUDGAL, J.; PAUL, P.; BANSAL, P.; NANDAKUMAR, K. Evaluation of in vitro antioxidant and in vivo analgesic potential of Terminalia paniculata aqueous bark extract. *J Med Food.* V.12, p. 1153-1161. 2013.

THOMAZZI, S. M.; SILVA, C. B.; SILVEIRA, D. C.; VASCONCELLOS, C. L.; LIRA, A. F.; CAMBUI, E. V.; ESTEVAM, C. S.; ANTONIOLLI, A. R. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira). *J Ethnopharmacol.* V. 127, n. 2, p. 451-456. 2010.

TOLEDO, C. E. M. Estudos anatômico, químico e biológico de cascas e extratos obtidos de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.)Coville, Leguminosae], 2002. Araraquara: Universidade Estadual Paulista. 2002. (dissertação).

TRIANAFILLIDIS, J. K.; MERIKAS, E.; GEORGOPOULOS, F. Current and emerging drugs for the treatment of inflammatory bowel disease. *Drug Des. Develop. Ther.* V. 5, p. 185–210. 2011.

TSAI, C.F.; WANG, K.T.; CHEN, L.G.; LEE, C.J.; TSENG, S.H.; WANG, C.C..Anti-inflammatory effects of *Vitis thunbergii* var. taiwaniana on knee damage associated with arthritis. *J Med Food.*, v.17, p.479-486, 2014

UCHIYAMA, Y.; SUZUKI, T.; MOCHIZUKI, K. Dietary supplementation with a low dose of (-)-epigallocatechin 3-gallate reduces pro-inflammatory responses in peripheral leukocytes of non-obese type 2 diabetic GK rats. *J. Nutr. Vitaminol.* V. 59, p. 541-547. 2013.

VALENCIA, X.; STEPHENS, G.; GOLDBACH-MANSKY, R.; WILSON, M.; SHEVACH, E. M.; LIPSKY, P. E. TNF downmodulates the function of human CD4⁺ CD25^{hi} T-regulatory cells. *Blood.* V. 108, p. 253-261. 2006.

VAN VOLLENHOVEN, R.F.; GEBOREK, P.; FORSLIND, K.; ALBERTSSON, K.; ERNESTAM, S.; PETERSSON, I.F.; CHATZIDIONYSIOU, K.; BRATT, J. Conventional combination treatment versus biological treatment in methotrexate-refractory early rheumatoid arthritis: 2 year follow-up of the randomised, non-blinded, parallel-group Swefot trial. *Lancet*, v. 379, p.1712-1720, 2012

VENEZIANI, R. C. S. *Estudo fitoquímico de Mikania glomerata Sprengel*. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo. 1997. (dissertação).

VETAL S.; SUBHASH, L.B.; VISHWARAMAN, M.; PRASAD, A.T. Anti-inflammatory and anti-arthritis activity of type-A procyanidine polyphenols from bark of *Cinnamomum zeylanicum* in rats. *Food Sci Hum Wellness*, v.2, p.59–67, 2013

VIEIRA, A.T.; FAGUNDES, C.T.; ALESSANDRI, A.L.; CASTOR, M.G.; GUABIRABA, R.; BORGES, V.O.; SILVEIRA, K.D.; VIEIRA, E.L.; GONÇALVES, J.L.; SILVA, T.A.; DERUAZ, M.; PROUDFOOT, A.E.; SOUSA, L.P.; TEIXEIRA, M.M. Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis. *Am J Pathol*. v.75, p.2382-2391, 2009.

VILEGAS, W.; ROQUE, N. F.; SALATINO, A.; GIESBRECHT, A. M.; DAVINO, S. Isocoumarin from *Paepalanthus bromelioides* *Phytochemistry*. V. 29, n. 7, p. 2299–2301. 1990.

VILEGAS, W.; SANTOS, L.C.; ALECIO, A.C.; PIZZA, C.; PIACENTE, S.; PAUW, E.; SANO, P.T. Naphthopyranone glycosides from *Paepalanthus bromelioides*. *Phytochemistry*. V. 49, p. 207–210. 1998.

VILELA, E. G.; TORRES, H. O. G.; MARTIN, F. P.; FERRARI M. L. A.; ANDRADE, M. M.; DA CUNHA, A. S. Evaluation of inflammatory activity in Crohn's disease and ulcerative colitis. *World Journal of Gastroenterology*. V. 18, n. 9, p. 872–881. 2012.

WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant Drug Analysis*. 2.ed. Verlag / Berlin / Heidelberg / New York:Springer, 1996. 384 p.

WANG, T.; ZHANG, X.; LI, J. J. The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. *Int Immunopharmacol* V. 2, p. 1509–1520. 2002.

WANG, T.; ZHOU, H.; XIE, H.; MU, Y.; XU, Y.; LIU, J.; ZHANG, X. Epigallocatechin-3-gallate inhibits TF and TNF- α expression induced by the anti- β 2GPI/ β 2GPI complex in human THP-1 cells. *Int J Mol Med*. V. 33, n. 4, p. 994, 1002. 2014.

WANGCHUK, P.; KELLER, P.; PYNE, S. A., TAWEECHOTIPATR, M. Inhibition of TNF- α production in LPS-activated THP-1 monocytic cells by the crude extracts of seven Bhutanese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. V. 148. P.1013–1017. 2013.

WEINGES, K.; BAHR, W.; EBERT, W.; GORITZ, K.; MARX, H. D. constitution, Entstehung und Bedeutung der Flavonoid-Gerbstoffe. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, v. 27, p. 159-260, 1969

WICKENS, A. P. Ageing and free radical theory. *Resp. Physiol*. V. 128, p. 379-391. 2001.

- WILLIAMS, C.; PANACCIONE, R.; GHOSH, S.; RIOUX, K. Optimizing clinical use of mesalazine (5-aminosalicylic acid) in inflammatory bowel disease. *Ther. Adv. Gastroenterol.* V. 4, n. 4, p. 237-248. 2011.
- WIRTZ, S.; NEUFERT, C.; WEIGMANN, B.; NEURATH, M.F. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc.*,v.2, p.541-546.
- WITAICENIS, A.; SEITO, L.N.; DI STASI, L.C. .Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Chem Biol Interact.* v.86, p.211-218, 2010
- WU, L-H.; XU, Z-L.; DONG, D.; HE, S-A.; YU, H. Protective effect of anthocyanins extract from blueberry on TNBS-induced model of mice. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* ID 525462. 2011.
- WU, C.H.; WU, C.F.; HUANG, H.S.; JAO, Y.C.; YEN, G.C. Naturally occurring flavonoids attenuate high glucose-induced expression of proinflammatory cytokines in human monocytic THP-1 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* V. 53, p. 984–995. 2009.
- XANGORAI, A.; PAPAPETROPOULOS, A.; MAUROMATIS, A.; ECONOMOU, M.; FOTSIS, T.; ROUSSOS, C. Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, V. 296, p. 181-187. 2001.
- XIE, D. Y.; DIXON, R. A. Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers? *Phytochemistry* V. 66, p. 2127-2144. 2005.
- YAN, B.; PENG, Y.; LI, C. Y. Molecular analysis of genetic instability caused by chronic inflammation. *Methods Mol Biol.* V. 512, p. 15–28. 2009.
- YENDE, S.R.; SANNAPURI, V.D.; VYAWAHARE, N.S.; HARLE, U.N. Antirheumatoid activity of aqueous extract of *Piper longum* on Freund's Adjuvant-induced arthritis in rats. *Int J Pharma Sci Res.*, v.1, p.:129–33, 2010
- ZABEL, B. A.; ROTT, A.; BUTCHER, E. C. Leukocytes chemoattractant receptors in human disease pathogenesis. *Annual Reviews Pathology* v.10, p.51-81, 2015
- ZAWARE, B. B.; NIRMAL, S. A.; BAHETI, D. G.; PATIL, A. N.; MANDAL, S. C. Potential of *Vitex negundo* roots in the treatment of ulcerative colitis in mice. *Pharm Biol.* V. 49, n. 8, p. 874-878. 2011.
- ZUURBIER, K. W.; VAN DEN BERG, J. D.; VAN GELDER, B. F.; MUIJSERS, A. O. Human hemi-myeloperoxidase. Initial chlorinating activity at neutral pH, compound II and III formation, and stability towards hypochlorous acid and high temperature. *Eur J Biochem.* V. 205, n. 2, p. 737-742. 1992.
- ZYWICKI, B.; REEMTSMA, T.; JEKEL, M. Analysis of commercial vegetable tanning agents by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry and its application to wastewater. *Journal of Chromatography A* V. 970, p. 191-200. 2002.