



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Bianca Klafke Beck

**Análise do efeito anti-inflamatório de compostos isolados de *Myrocarpus frondosus* (Cabreúva)**

Florianópolis  
2023

Bianca Klafke Beck

**Análise dos efeitos anti-inflamatórios *in vitro* e *in vivo* de compostos isolados de *Myrocarpus frondosus* (Cabreúva)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de TCC II do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Ziliani da Silva Buss

Florianópolis  
2023

Klafke Beck, Bianca

Análise dos efeitos anti-inflamatórios in vitro e in vivo de compostos isolados de *Myrocarpus frondosus* (Cabreúva) / Bianca Klafke Beck ; orientadora, Ziliani da Silva Buss, 2023.

60 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Anti-inflamatório. 3. Diterpeno. 4. In vivo. 5. Cumarina. I. Buss, Ziliani da Silva. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. III. Título.

Bianca Klafke Beck

**Análise dos efeitos anti-inflamatórios *in vitro* e *in vivo* de compostos  
isolados de *Myrocarpus frondosus* (Cabreúva)**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de do grau de Farmacêutico, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 24 de novembro de 2023.



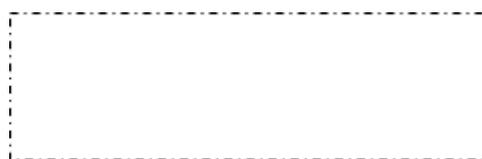
Prof. Me. Valdecir Maria Laura.  
Coordenador do Curso  
Universidade Federal de Santa Catarina

**Banca examinadora**



Profa. Dra. Ziliani da Silva Buss  
Orientadora

Universidade Federal de Santa Catarina



Profa. Dra. Izabel Galhardo Demarchi  
Universidade Federal de Santa Catarina



Ma. Carolina Eto  
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2023.

“Ensinar é um exercício de imortalidade. De alguma forma continuamos a viver naqueles cujos olhos aprenderam a ver o mundo pela magia da nossa palavra. O professor, assim, não morre jamais...”

-Rubem Alves

Dedico a todos os meus professores,  
da universidade e da vida.

## AGRADECIMENTOS

A toda a minha família pelo incentivo desde o início da graduação, em especial à minha mãe, Teresinha, que sempre esteve presente mesmo distante. Ao meu pai, André, que me ajudou com o grande desafio de residir em uma nova cidade e buscar meus sonhos. Também ao meu irmão Lucas e cunhada Anne, por aconselhamos e acolhimento em longas chamadas de vídeo. Agradeço também a minha madrasta Rauza por me apoiar e pelas entusiasmadas conversas científicas. À minha irmã Valentina por trazer brincadeira e leveza de criança para a minha vida.

Aos meus amigos do curso de farmácia, que me acolheram e estão comigo desde o início, Douglas, Maria Claudia, João, Larissa, Gabriela, Tainah, Maria Catarina e Carolina Peixe. Às minhas amigas da escola que sempre estiveram disponíveis quando precisei, Bárbara, Brenda, Ana, Sophia, Joana e Manu. Aos amigos que conheci pela vida na ilha e que me ensinaram a me divertir todo dia, Ronaldo, Ricardo, Digão, Caridá, Victor, Bia, Vitor e Tabata. Também agradeço ao mar, e as amigas que fiz na água, Ana e Debora, e ao meu grande cardume, que ajudaram muito na minha saúde mental nesses anos, todo final de semana foi como tirar férias, obrigada Uga-Buga, Mauricio, Eduardo, Nathalia, Amanda, Ronaldo, Bryan, Vitor K., Fabio, Luiza, Tuany, Natham, Alan, Joana, Michel, Alessandra, Bruna, Vitor R., Pedro e Angela. Agradeço muito também a minha nova parceira de casa, Paula, por facilitar tanto o fim dessa jornada e ao André e Ana Paula que além de amigos, foram terapeutas.

Agradeço imensamente à minha orientadora Ziliani que me recebeu de braços abertos, esteve presente, disponível, foi atenciosa e sempre de bom humor, obrigada pela oportunidade e por todos os conhecimentos passados. Também agradeço ao laboratório de pesquisa em imunologia, LAPI, por me mostrarem outra forma de fazer ciência. Aos professores Eduardo, Izabel, Iara. À colega de laboratório Paula, que sempre é uma boa companhia e muito prestativa, assim como a minha parceira Tainá, por toda a paciência e suporte, foi um prazer fazer ciência com você!

Também agradeço muito ao Laboratório de Imunobiologia, LIDI, onde tive meu primeiro contato com a iniciação científica e lugar onde mais aprendi na graduação. Obrigada a minha eterna mãe de laboratório, Carol, à rainha dos ELISAs Nicoli, a minha parceira na pandemia, Eduarda, ao Daniel Mendes pelos conhecimentos e apoio, ao professor André Báfica por ter me guiado e me mostrado como a imunologia é apaixonante e a todos membros do laboratório, minha admiração é imensa!

Ao professor parceiro Louis Pergaud Sandjo e Ana Caroline pelo fornecimento dos compostos utilizados neste trabalho.

A Professora Dra<sup>a</sup> Tânia Beatriz Creczynski Pasa do Grupo de Estudos de Interações entre Micro e Macromoléculas (GEIMM) pelo fornecimento da linhagem celular utilizada neste trabalho.

À equipe do Intelab pela disponibilidade do espectrofluorímetro de microplaca Gemini™ XPS utilizado no projeto.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação e trajetória acadêmica, dedicando seu tempo para um ensino de qualidade na universidade pública, meu muito obrigado!

Agradeço a UFSC, universidade pública de excelência. Ao CNPq pelo auxílio financeiro durante minha graduação. E à banca avaliadora pela disponibilidade de avaliar e contribuir com o trabalho.

## RESUMO

A árvore da espécie *Myrocarpus frondosus*, conhecida como cabreúva, já é utilizada popularmente como anti-inflamatório, cicatrizante, expectorante, no tratamento de bronquite e de diversas outras enfermidades. Dentre os metabólitos secundários desta planta estão os terpenos e cumarinas, que vêm sendo estudados quanto a sua ação anti-inflamatória. Neste contexto, três compostos isolados da cabreúva, diterpeno 19, diterpeno 21 e uma cumarina, foram submetidos a testes *in vitro* para avaliar o seu potencial anti-inflamatório. Os compostos passaram por uma triagem *in vitro*, onde foi avaliada a citotoxicidade (viabilidade celular) em macrófagos J774A.1, para que então pudesse ser calculada a concentração mínima necessária para manter 90% das células viáveis (CC<sub>10</sub>) de cada composto. O composto diterpeno 21 e cumarina apresentaram CC<sub>10</sub> abaixo de 100 µg/mL, já o composto diterpeno 19 apresentou maior citotoxicidade, portando, os dois compostos que permitiram a maior viabilidade celular seguiram para as próximas fases da triagem. Em seguida, foi avaliada a capacidade inibitória dos compostos sobre a produção de óxido nítrico em um modelo de inflamação *in vitro* induzido por LPS. A dose mínima necessária para inibir 50% da produção desses metabólitos, quando comparado ao grupo controle sem tratamento, foi calculada e os dois compostos obtiveram uma IC<sub>50</sub> abaixo de 1 µg/mL. Em seguida, os compostos com os melhores resultados, diterpeno 21 e cumarina, passaram para os testes *in vivo*. Foram utilizados camundongos albino *Swiss* para o modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS. Quando administradas diferentes doses da cumarina e do diterpeno 21, observou-se a diminuição, em torno de 70%, da migração leucocitária e neutrofílica, a redução de até 93% de formação de exsudato, a diminuição em torno de 20% de produção de metabólitos de óxido nítrico e redução de até 96% da atividade da mieloperoxidase. Todos esses achados corroboram com a hipótese de que esses compostos têm potencial anti-inflamatório.

**Palavras-chave:** Anti-inflamatório; *In vitro*; *In vivo*; Cumarina; Diterpeno.

## ABSTRACT

The tree of the species *Myrocarpus frondosus*, known as cabreúva, is already popularly used as an anti-inflammatory, healing, expectorant, in the treatment of bronchitis and several other illnesses. Among the secondary metabolites of this plant are terpenes and coumarins, which have been studied for their anti-inflammatory action. In this context, three compounds isolated from cabreúva, diterpene 19, diterpene 21 and a coumarin, were subjected to tests *in vitro* to evaluate their anti-inflammatory potential. The compounds underwent *in vitro* screening, where cytotoxicity (cell viability) in J774A.1 macrophages was evaluated, so that the minimum concentration necessary to maintain 90% of viable cells (CC<sub>10</sub>) of each compound could be calculated. The compound diterpene 21 and coumarin presented CC<sub>10</sub> below 100 µg/mL, while the compound diterpene 19 showed greater cytotoxicity, therefore, the two compounds that allowed greater cell viability continued to the next phases of screening. Next, the inhibitory capacity of the compounds on the production of nitric oxide was evaluated in an *in vitro* inflammation model induced by LPS. The minimum dose necessary to inhibit 50% of the production of these metabolites, when compared to the untreated control group, was calculated and the two compounds obtained an IC<sub>50</sub> below 1 µg/mL. Then, the compounds with the best results, diterpene 21 and coumarin, went to *in vivo* tests. Swiss albino mice were used for the LPS-induced acute lung injury model. When different doses of coumarin and diterpene 21 were administered, a reduction of around 70% in leukocyte and neutrophil migration was observed, a reduction of up to 93% in exudate formation, a reduction of around 20% in the production of nitric oxide metabolites and a reduction of up to 96% in myeloperoxidase activity. All these findings corroborate the hypothesis that these compounds have anti-inflammatory potential.

**Keywords:** Anti-inflammatory; *In vitro*; *In vivo*; Coumarin; Diterpene.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Árvore da espécie *Myrocarpus frondosus*. 15
- Figura 2** - Representação do modelo in vivo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS. 34
- Figura 3** - Desenho experimental de duas etapas para o estudo da atividade anti-inflamatória dos compostos isolados da cabreúva. 37
- Figura 4** - Avaliação da citotoxicidade dos compostos isolados da cabreúva em macrófagos J774A.1. 38
- Figura 5** - Efeito dos compostos isolados da cabreúva sobre os níveis dos metabólitos do óxido nítrico (NOx) em macrófagos J774A.1 estimulados com LPS. 39
- Figura 6** - Efeito dos compostos isolados da cabreúva sobre a contagem total de leucócitos no BALF em inflamação aguda pulmonar (ALI) induzida por LPS, em camundongos. 40
- Figura 7** - Efeito dos compostos isolados da cabreúva sobre a contagem diferencial leucócitos no BALF em inflamação aguda pulmonar (ALI) induzida por LPS, em camundongos. 41
- Figura 8** - Efeito dos compostos isolados da cabreúva sobre a exsudação no BALF em inflamação aguda pulmonar (ALI) induzida por LPS, em camundongos. 42
- Figura 9** - Efeito dos compostos isolados da cabreúva sobre os níveis dos metabólitos do óxido nítrico (NOx) no BALF em inflamação aguda pulmonar (ALI) induzida por LPS, em camundongos. 43
- Figura 10** - Efeito dos compostos isolados da cabreúva sobre as concentrações da mieloperoxidase (MPO) no BALF em inflamação aguda pulmonar (ALI) induzida por LPS, em camundongos. 44

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1** - Dados dos compostos isolados das cascas das raízes da cabreúva. 26

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1	<i>Myrocarpus frondosus</i> - Cabreúva	15
1.1.1	Cumarinas	15
1.1.2	Diterpenos	16
1.2	O processo inflamatório	17
1.3	Estudo da inflamação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> induzidos por LPS	19
1.4	Desenho experimental	20
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
3.1	Objetivo geral	25
3.1	Objetivos específicos	25
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>26</b>
4.1	Compostos isolados da cabreúva	26
4.1.2	Preparação dos compostos para os experimentos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	27
4.2	Estudos <i>In vitro</i>	27
4.2.1	Cultura de macrófagos J774A.1	27
4.2.2	Determinação da viabilidade celular com azul de Tripán	28
4.2.3	Determinação da viabilidade celular com Resazurina	28
4.2.4	Modelo de inflamação <i>in vitro</i>	29
4.2.5	Mensuração dos metabólitos de óxido nítrico (NO <sub>x</sub> )	30
4.3	Estudos <i>in vivo</i>	31
4.3.1	Animais	31
4.3.2	Anestesia e eutanásia	31
4.3.3	Modelo de lesão pulmonar aguda (ALI) induzida por LPS e obtenção do lavado bronco-alveolar	32
4.3.4	Contagem total e diferencial de leucócitos no lavado broncoalveolar	33
4.3.5	Mensuração de exsudato em lavado broncoalveolar	34
4.3.6	Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)	35
4.3.6	Determinação das concentrações de óxido nítrico (NO <sub>x</sub> )	36
4.4	Análise Estatística	36
4.5	Desenho experimental	36

<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>38</b>
5.1	Resultados <i>in vitro</i>	38
5.1.1	Viabilidade celular	38
5.1.2	Mensuração dos metabólitos de óxido nítrico (NOx)	39
5.2	Resultados <i>in vivo</i>	40
5.2.1	Efeito dos compostos na migração celular	40
5.2.2	Efeito do diterpeno 21 e cumarina na exsudação	41
5.2.3	Mensuração dos metabólitos de óxido nítrico (NOx) no BALF	42
5.2.4	Efeito da cumarina e diterpeno 21 sobre a atividade da mieloperoxidase	43
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>49</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>50</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 *Myrocarpus frondosus* - Cabreúva

A Família Leguminosae (Fabaceae) é distribuída em 225 gêneros e conta com 2870 espécies encontradas no Brasil, das quais 1546 são endêmicas (FLORA DO BRASIL, 2020). Dentre essas, se destaca a espécie *Myrocarpus frondosus*, pertencente à sub-família Papilionoideae (Figura 1). Trata-se de uma árvore de ocorrência natural em países como Argentina, Paraguai e Bolívia. No Brasil está presente desde o sul da Bahia ao Rio Grande do Sul. Pode atingir grande dimensões, destacando-se entre as árvores nativas de maior produção comercial de madeira, sendo uma espécie endêmica e ameaçada de extinção (BRENDA, LONGHI, 1998; MORO, 2003; SARTORI, TOZZI, 2004). A sua polinização é feita por abelhas e a dispersão é abiótica, pelo vento (LAUTERJUNG *et al.*, 2021). A espécie *Myrocarpus* foi descrita por Allemão (1847) e seu nome é uma referência à presença de bálsamo no fruto, “Myron” significa óleo perfumado e conhecida popularmente por cabreúva, cabriúva, cabruê, caborentinga, caboré, braúna, braúna-parda, óleo-pardo, pau-bálsamo, bálsamo, pau-de-óleo (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002; MENTZ *et al.*, 1997; SARTORI, TOZZI, 2004; STEARN, 1973).

A cabreúva é conhecida pelo seu uso medicinal pelos povos indígenas ancestrais. Na região da Mata Atlântica, o macerado da casca da planta em aguardente é usado externamente como cicatrizante e anti-inflamatório (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002). O povo guarani-chiripá, no litoral de Santa Catarina, chama a árvore de *Yvyra padje* e coletam as cascas para o uso medicinal (OLIVEIRA, 2011). A serragem da madeira, casca e a resina são usadas para tratar feridas e contusões, também são utilizadas como expectorante peitoral, indicado nas lesões do sistema respiratório como bronquite aguda e crônica no tratamento da asma. A resina também é utilizada para tratar cistite, blenorragia e uretrite. Os mesmos efeitos são atribuídos às raízes, enquanto os frutos passam por excitantes e antidispépticos (CORRÊA, 1984; DI STASI, HIRUMA-LIMA; 2002, MENTZ *et al.*, 1997). O chá feito da casca é usado para tratar úlceras, doenças cardiovasculares, fortificação de nervos e para o tratamento de hemorragias pulmonares, asma e bronquite (FRANCO, FONTANA, 2011; KUJAWSKA, 2018).

Dentre os principais metabólitos secundários isolados da cabreúva estão  $\beta$ -pineno, germacreno D, biciclogermacreno, espatulenol, terpenos, cumarinas e flavonoides (CABRERA *et al.*, 2015; PEREZ, 2005).

**Figura 1: Árvore da espécie *Myrcarpus frondosus***



Fonte: “Cabriúva: *Myrcarpus frondosus*. - Portal Embrapa”, 2017

Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1139716/cabriuva-myrcarpus-frondosu>>. Acesso em: 14 set. 2023.

### **1.1.1 Cumarinas**

As cumarinas são compostos orgânicos aromáticos da classe das benzopironas, possuem uma estrutura química derivada da fusão de um anel benzênico com um anel pirano. As cumarinas são muito encontradas no reino vegetal e têm as maiores concentrações em frutas, sementes, raízes e folhas (ANAND, 2012). Estes compostos estão presentes em 61% das madeiras brasileiras, inclusive na casca da árvore da cabreúva (DA SILVA *et al.*, 2009). Entre os benefícios das cumarinas, estão a atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, antineoplásica, anticoagulante e vasodilatadora (AMIN *et al.*, 2011; ANAND, 2012; BANSAL *et al.*, 2012; BERTIN *et al.*, 2014; DA SILVA, 2009; FYLAKTAKIDOU, 2004; THE ANTITHROMBOTIC PROPERTIES OF COUMARIN

DRUGS”, 1961; JAIN, 2012; JAIN, 2023; JOÃO MATOS *et al.*, 2012; KONTOGIORGIS *et al.*, 2015; LOWENTHAL, BIRNBAUM, 1969; MENEZES, DIEDERICH, 2019; NAYELI, 2020; TUAN ANH, 2017; SHI, Y., ZHOU, C.-H., 2011 ;SMYTH T, RAMACHANDRAN, SMYTH W, 2009; ZHOU, 2011).

As atividades anti-inflamatórias das cumarinas vêm sendo demonstradas em estudos *in vitro* e *in vivo* (HASSANEIN *et al.*, 2020). Esses compostos podem atuar na inflamação como inibidores de ciclooxigenases, de lipoxigenase, de prostaglandinas, de leucotrienos, de citocinas pró-inflamatória como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), do óxido nítrico (NO), da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) e da via do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB). As cumarinas podem também modular as proteínas quinase ativada por mitógeno (MAPK) (BANSAL *et al.*, 2012). Além disso, esses compostos podem prevenir inflamação por modular a proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch (Keap1)/ fator nuclear derivado de eritroide 2 (Nrf2) e elemento de resposta antioxidante (ARE) que estão ligadas ao dano oxidativo e ao fator transcricional NF-kB (HASSANEIN *et al.*, 2020). As cumarinas suprimem o estresse oxidativo, eliminando as espécies reativas de oxigênio, ou seja, inibem a geração de ânions superóxido dependente de neutrófilos e a peroxidação lipídica, diminuindo o edema associado à inflamação. (BORGES BUBOLS *et al.*, 2013; FYLAKTAKIDOU, 2004; KOSTOVA *et al.*, 2011; KONTOGIORGIS, HADJIPAVLOU-LITINA, 2008).

Para além de estudos *in vitro* e *in vivo*, foi demonstrado em uma revisão sistemática, com alto nível de evidência, que é possível afirmar que cumarinas têm efeito anti-inflamatório importante em modelo de inflamação pulmonar aguda em camundongos, os parâmetros medidos foram a formação de exsudação e edema e migração leucocitária (OLIVEIRA *et al.*, 2023).

### **1.1.2 Diterpenos**

Os terpenos são compostos de unidades de isopreno, cada unidade de isopreno é composta por cinco átomos de carbono (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>). O fosfato de isopentenilo e difosfato de dimetilalila são precursores na biossíntese dos terpenos, participam da formação destes. Os diferentes rearranjos podem gerar monoterpenos,

sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e tetraterpenos. Estes são biossintetizados pela sua via clássica, a partir do mevalonato ou pela via alternativa, pelo metileritritol (HELFRICH *et al.*, 2019; HILLIER, LATHE, 2019). Os terpenos são o grupo de metabólitos secundários mais abundantes nas árvores da espécie *Myrcarpus* (BARBOSA *et al.*, 2017).

Estudos pré-clínicos mostram evidências que os terpenos possuem potencial farmacológico, sendo capazes de atuar como antioxidantes, antibacterianos, gastroprotetores e anti-inflamatórios. Alguns compostos desta classe foram isolados da casca da árvore da cabreúva e estes ativos demonstraram ter potencial contra câncer de ovário e pulmão (HOUDKOVA *et al.*, 2017; PEREZ, 2005; PORTER, MONU, 2019; SOMENSI *et al.*, 2019; VENZON *et al.*, 2018).

Os diterpenos são uma classe de terpenos que apresentam diversas propriedades biológicas como ação anti-inflamatórias, analgésicas e atividade inibitória em marcadores pró inflamatórios como TNF- $\alpha$  e NO (ALONSO-CASTRO *et al.*, 2019; RUBINGER, VELOSO, STEFANI, 1991). Os diterpenos também apresentam efeito vasodilatador, atividade citotóxica em células cancerígenas, atividade antibacteriana, antidiarreica e antinociceptivo, sem efeito sedativo ou alterações locomotoras em camundongos (ALONSO-CASTRO, A. J. *et al.*, 2017). Estudos têm sido realizados para destacar a ação anti-inflamatória dos diterpenos. O que sugere que estes metabólitos podem ser uma opção para o desenvolvimento de novas terapias para doenças inflamatórias. (BAILLY *et al.*, 2022; RAKSAT *et al.*, 2022).

## 1.2 O processo inflamatório

A inflamação é uma resposta do organismo para restaurar as condições fisiológicas quando os mecanismos de homeostase são insuficientes. O dano às condições fisiológicas pode ser causado por um agente químico, físico ou biológico. Esse processo passa por algumas fases, há o reconhecimento do estímulo, liberação de sinais inflamatórios, resposta celular e resolução, sendo, reparo e cicatrização tecidual (NEWTON, DIXIT, 2012). Os sinais cardinais do processo inflamatório são dor, rubor, calor, edema e se não houver resolução, pode levar a perda de função do órgão (DORWARD *et al.*, 2012).

Dentre os agentes que podem induzir a inflamação e ativar o sistema imune, estão os padrões moleculares de reconhecimento de patógenos (PAMPs) que são derivados ou partes de microrganismos, ácidos nucleicos, bactérias, vírus, flagelina e lipopolissacarídeo (LPS). Estes sinais são reconhecidos pelo sistema imune e sugerem a possível presença de patógenos. Há também os padrões moleculares associados a dano (DAMPs), conhecidos como debris celulares que sinalizam que há dano celular, dentre estes destacam-se proteínas citoplasmáticas, trifosfato de adenosina (ATP) e ácido úrico (DE NARDO, 2015; NEWTON, DIXIT, 2012).

Os PAMPs e DAMPs são reconhecidos por diferentes sensores nas células da imunidade inata, como neutrófilos, monócitos e células dendríticas, e também por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Dentre os PRRs, estão os receptores do tipo *Toll* (TLR) que são proteínas transmembranares que atuam como receptores, expressos como heterodímeros ou homodímeros, reconhecendo principalmente componentes da membrana de microrganismos. O TLR4, que está presente principalmente em monócitos, macrófagos e células dendríticas, reconhece o LPS e desencadeia respostas precoces do sistema imune inato e de inflamação, como a ativação da via do NF- $\kappa$ B (LI e WU, 2021; YANG *et al.*, 2016).

Já os patógenos, podem ser reconhecidos por células apresentadoras de antígenos (APCs), como células dendríticas e macrófagos, que ao fagocitarem esses agentes, processam e expõe peptídeos no complexo maior de histocompatibilidade II (MHC II) para apresentar o antígenos às células do sistema imune adaptativo, para que estas desenvolvam uma resposta dependente de linfócitos T e B (JOFFRE *et al.*, 2009).

Após o reconhecimento de PAMPs, DAMPs ou patógenos, há aumento de mediadores lipídicos sintetizados no local da infecção, como prostaglandinas, leucotrienos, fatores de ativação plaquetária e espécies reativas de oxigênio e nitrogênios. Há também os mediadores protéicos como citocinas, receptores de adenosina, metabólitos do óxido nítrico e moléculas de adesão provenientes de células do sistema imune (RAWKIN, 2014; SUGIMOTO *et al.*, 2019).

O NO é um mediador inflamatório produzido pela iNOS que em baixas concentrações pode ser considerado um mediador pró-inflamatório, pois é capaz de induzir a vasodilatação, o recrutamento de neutrófilos, e em altas concentrações

diminui a adesão de moléculas, suprime a ativação e induz apoptose de células inflamatórias. Pode ainda causar dano celular e participar da progressão de doenças inflamatórias agudas e crônicas (COLEMAN, 2001; DI ROSA *et al.*, 1996).

Após o reconhecimento do agente lesivo e liberação de mediadores pró inflamatórios, há recrutamento de células do sistema imune inato, como neutrófilos e macrófagos, que identificam e eliminam os agentes lesivos. Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares, produzidos na medula óssea e são as células circulantes do sistema imune mais abundante em um organismo em homeostase. Essas células reconhecem PAMPs e DAMPs, têm a capacidade de fagocitar, e liberam espécies reativas de oxigênio e grânulos tóxicos. São as células que chegam primeiro no local de inflamação e conseguem recrutar outros leucócitos pela liberação de mediadores pró e anti-inflamatórios como citocinas, enzimas proteolíticas e leucotrienos. Os neutrófilos produzem alguns tipos de grânulos e dentre esses, estão os grânulos primários (azurófilos), que contém mieloperoxidase (MPO) que apresenta alta atividade pró-inflamatória e pró-oxidativa. Também são capazes de modular respostas do sistema imune inato e adaptativo (ROSALES, 2018; TECCHIO, CASATELLA, 2016; PAPAYANNOPOULOS, 2018).

Os macrófagos residem em tecidos íntegros ou em sítios inflamatórios, ou ainda podem ser recrutados por neutrófilos. Essas células induzem citotoxicidade, produzem mediadores inflamatórios, fagocitam microrganismos, removem restos celulares e células com dano. Além disso, essas células participam ativamente da resolução da inflamação e reparação do tecido (LASKIN *et al.*, 2011; GORDON, PLUDDMANN, MARTÍNEZ ESTRADA, 2014; WATANABE *et al.*, 2019).

### **1.3 Estudo da inflamação *in vitro* e *in vivo* induzidas por LPS.**

Após breve revisão, destaca-se que este projeto conta com estudos *in vitro* e *in vivo*. Para os estudos *in vitro*, foram utilizados macrófagos da linhagem J774A.1, uma linhagem celular derivada de macrófagos murinos, que são frequentemente utilizados em estudos sobre inflamação por terem características funcionais e fenotípicas semelhantes a macrófagos encontrados *in vivo*. São células de fácil cultivo, o que permite a repetição de experimentos e são capazes de responder a estímulos como LPS, produzindo mediadores inflamatórios, NO, citocinas e enzimas

proteolíticas. O LPS é um componente importante da parede celular das bactérias Gram negativas, possui um papel na virulência, e é reconhecido pelo TLR4 como um PAMP, desencadeando uma resposta inflamatória pelo sistema imune. Sendo assim, os macrófagos podem ser utilizados para minimizar os experimentos em animais, na triagem de diversos compostos candidatos a fármacos (MASQUELIER *et al.*, 2018; OMRI *et al.*, 2019).

Os modelos animais são utilizados para explorar os mecanismos de doenças humanas, identificar novos marcadores para diagnóstico, terapias, prognósticos e descobrir novos alvos para o desenvolvimento de novos fármacos. Em estudos em camundongos, a administração intranasal de LPS resulta em lesão pulmonar aguda em 24 horas. Observa-se a presença aumentada de polimorfonucleares, alteração na permeabilidade do revestimento epitelial e edema intersticial difuso, com a formação de exsudato nos espaços alveolares (MATUTE-BELLO, FREVERT, MARTIN, 2008; SIPAHI, ATALAY, 2014). Quando utilizado o LPS em camundongos pela via intranasal, este pode mimetizar quadros de lesão aguda pulmonar (ALI, do inglês *Acute lung injury*), sendo um bom modelo para estudar a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA). Esses dois quadros são caracterizados pelo acúmulo de fluido rico em proteínas no pulmão. A reação ao LPS desencadeia a produção e liberação de mediadores pró inflamatórios e infiltração celular (CHEN, BAI, WANG, 2010; MATTHAY, WARE, ZIMMERMAN, 2012; MIRZAPOIAZOVA *et al.*, 2007).

#### **1.4 Desenho experimental**

Os experimentos desenvolvidos neste trabalho foram planejados para a otimização e redução de uso de animais, de acordo com os 3RS, do inglês *Refinement, Replacement and Reduction*. *Replacement*, que significa substituição, utilizando técnicas *in vitro*. *Refinement*, que traduzindo, significa refinamento, diminuindo a dor, utilizando de técnicas apropriadas para o manuseio e tomando os devidos cuidados com os animais. E o último R, *reduction*, redução do número de animais utilizados (“Princípio dos 3 R’s | Comissão de Ética no Uso de Animais”, [s.d.]).

A triagem inicial dos compostos com potencial anti-inflamatório foi realizada *in vitro*, utilizando-se macrófagos murinos J774A.1, estimulados por LPS. Para a confirmação da atividade anti-inflamatória dos compostos escolhidos, foi utilizado o modelo *in vivo*, e nesta etapa, camundongos albino *Swiss* receberam os compostos por via oral e LPS intranasal (DOS SANTOS NASCIMENTO *et al.*, 2019; MOHR *et al.*, 2019; LUBSCHINSKI *et al.*, 2022).

## 2 JUSTIFICATIVA

A inflamação é um processo natural do organismo como resposta a lesões ou infecções, mas quando crônica ou desregulada pode levar a diversas doenças, como artrite, diabetes, câncer e doenças cardiovasculares. Os medicamentos anti-inflamatórios atualmente disponíveis no mercado apresentam efeitos colaterais indesejáveis, o que torna essencial a busca por novos compostos com atividade anti-inflamatória mais seguros e eficazes (BACCHI, 2012; BINDU *et al.*, 2020).

O processo de descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos é longo, complexo e pode levar muitos anos. Desde 1981 até 2014, as áreas mais investigadas dentro da indústria farmacêutica em termos de novos medicamentos aprovados foram as doenças infecciosas, câncer, hipertensão, diabetes e inflamações, sendo somente aprovados aproximadamente 50 novos fármacos. Durante esse mesmo período, foram descobertos 51 novos compostos anti-inflamatórios, sendo 37 de origem sintética, 13 derivados de produtos naturais e uma macromolécula de origem biológica (NEWMAN, CRAGG, 2016).

Existem diversas opções de anti-inflamatórios disponíveis comercialmente, incluindo os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). No entanto, esses medicamentos podem apresentar muitos efeitos adversos gastrointestinais, cardiovasculares e renais, tornando necessário um monitoramento cuidadoso para garantir a segurança do paciente (BACCHI, 2012). Além disso, os AINEs que agem como inibidores seletivos da ciclo-oxigenase-2 (COXIBEs) estão sendo alvo de estudo, devido a preocupações crescentes sobre os efeitos adversos desses medicamentos (BINDU *et al.*, 2020). Inibidores de prostaglandinas também são usados como anti-inflamatórios, mas estes estão associados com diversos efeitos adversos, como complicações gastrointestinais, cardiovasculares, hepáticas, renais, cerebrais e pulmonares (BINDU *et al.*, 2020; HIJOS-MALLADA *et al.*, 2022). Embora esses medicamentos possam ser eficazes no alívio da dor e da inflamação, é importante considerar cuidadosamente os riscos e benefícios antes de prescrevê-los aos pacientes. Dessa forma, a busca por terapias mais seguras e eficazes continua sendo uma prioridade na área de tratamento de doenças inflamatórias (BACCHI, 2012; BINDU *et al.*, 2020; HIJOS-MALLADA *et al.*, 2022).

Ademais é necessário o estudo de novos fármacos para doenças respiratórias agudas, como a SDRA que apresenta uma alta mortalidade e morbidade e até hoje, não há nenhum fármaco específico para o tratamento (BEITLER *et al.*, 2022; THE ARDS DEFINITION TASK FORCE, 2012).

O potencial de plantas como fonte de novas drogas ainda oferece um grande campo para investigação científica, uma vez que há mais de 500.000 espécies conhecidas e apenas uma pequena porcentagem já foi investigada fitoquimicamente e apenas uma fração destas já foi avaliada quanto ao potencial farmacológico (NUNES *et al.*, 2020). Os produtos naturais, especialmente plantas medicinais, representam uma abordagem crítica para a descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos. Os compostos bioativos derivados de plantas medicinais surgem como uma nova alternativa terapêutica para o tratamento de vários distúrbios, esses produtos têm apresentado resultados promissores e com menos efeitos adversos (DUTRA *et al.*, 2016; ESCOBEDO-HINOJOSA *et al.*, 2018; GUO, 2017).

A *Myrocarpus frondosus* é uma árvore com propriedades medicinais reconhecidas pela medicina popular, o macerado da casca da árvore da cabreúva é utilizado como cicatrizante, anti-inflamatório e expectorante peitoral para lesões do sistema respiratório (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002). Além disso, o chá é utilizado para tratar úlceras (KUJAWASKA, 2018) e a resina da casca é usada como xarope para tratar bronquite aguda, crônica, asma, cistite, blenorragia e uretrite (MENTZ *et al.*, 1997). O extrato da planta tem sido estudado por suas atividades antimicrobianas e antioxidantes, sugerindo que compostos isolados desta planta podem ter potencial terapêutico (BOTTAMEDI *et al.*, 2021; SANTI, GATTO, 2017).

Nesse sentido, a análise dos efeitos anti-inflamatórios *in vivo* e *in vitro* de compostos isolados de *M. frondosus* pode contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios mais seguros e eficazes. Além disso, a identificação de compostos com atividade anti-inflamatória pode auxiliar na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na inflamação, abrindo caminho para o desenvolvimento de novas terapias para doenças inflamatórias. Por esses motivos, a realização de uma pesquisa e análise dos efeitos anti-inflamatórios

de compostos isolados de *M. frondosus* é relevante e pode ter impacto significativo na área da saúde.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Investigar a ação anti-inflamatória de compostos isolados de *Myrocarpus frondosus*, *in vitro* e *in vivo*.

#### 3.2 Objetivos específicos

##### *In vitro*

- Analisar o efeito dos compostos sobre a viabilidade celular (citotoxicidade) em macrófagos da linhagem J774A.1;
- Avaliar o efeito dos compostos sobre a produção dos metabólitos do óxido nítrico (NOx) em macrófagos da linhagem J774A.1, estimulados com LPS.

##### *In vivo*

- Investigar o efeito anti-inflamatório do composto diterpeno 21 e do composto cumarina pela avaliação da migração leucocitária no modelo de lesão pulmonar aguda (ALI) em camundongos;
- Verificar os efeitos dos compostos selecionados sobre a exsudação no modelo de inflamação aguda pulmonar em camundongos;
- Mensurar os efeitos dos compostos selecionados sobre a atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e sobre as concentrações de nitrito/nitrato (NOx) em camundongos.

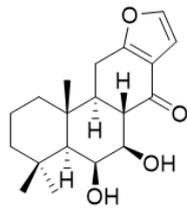
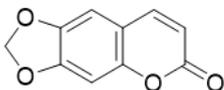
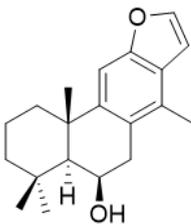
## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Compostos isolados da cabreúva

Os compostos testados neste estudo foram diterpeno 19, diterpeno 21 e cumarina, isolados pela aluna Ana Caroline da Silva, do Programa de Pós-graduação em Química, e cedidos gentilmente pelo professor do Departamento de Química, Dr. Louis Pergaud Sandjo da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

O extrato bruto da cabreúva foi obtido das cascas das raízes, estas foram maceradas em uma mistura de solventes [diclorometano (DCM) e metanol (1:1)]. Para a fração diclorometano foi realizada uma análise em coluna cromatográfica de sílica normal 70-230 MESH e então isolados os três compostos (diterpeno 19, 21 e cumarina), cujos detalhes de sua estrutura estão descritos no quadro 1.

**Quadro 1-** Dados dos compostos isolados das cascas das raízes da cabreúva

Composto	Fórmula molecular	Massa molar (g/mol)	Estrutura molecular
Diterpeno 21	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	318,41	
Cumarina	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	190,15	
Diterpeno 19	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	298,42	

Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.1.2 Preparação dos compostos para os experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Os compostos foram mantidos em temperatura ambiente, em sua forma original e ao abrigo de luz. Para os experimentos *in vitro*, cada composto foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO), a fim de obter as diluições de 1000  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$ . A concentração final de DMSO na maior concentração testada, não foi excedido 5% v/v, uma vez que o DMSO pode ser citotóxico em altas concentrações. As diluições foram realizadas no mesmo dia dos experimentos. Para os ensaios *in vivo*, os compostos escolhidos foram diluídos na solução salina tamponada com fosfato (PBS) com 10% de DMSO. Para a diluição das diferentes concentrações (30 mg/kg, 10 mg/kg, 3 mg/kg) foram levados em consideração o peso dos animais utilizados.

### 4.2 Estudo *in vitro*

#### 4.2.1 Cultura de macrófagos J774A.1

A linhagem celular de macrófagos murinos J774A.1, ATCC (American Type Culture Collection) TIB-67, foi cedida pela Professora Dra<sup>a</sup> Tânia Beatriz Creczynski Pasa do Grupo de Estudos de Interações entre Micro e Macromoléculas (GEIMM) da UFSC. As células foram mantidas em estufa umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C. O meio de cultura utilizado é o *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) com suplementação de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1 % de antibióticos (penicilina e estreptomicina). Os experimentos foram realizados entre a 8<sup>a</sup> e a 10<sup>a</sup> passagem, com confluência de 80%.

As células sofreram passagem e troca de meio com intervalos de 48-36 horas. Para a passagem, as células foram retiradas com o auxílio de EDTA (Versene®) e rodos raspadores de células (*cell scraper*). Os materiais utilizados (ponteiras, raspadores de células, falcons e pipetas) foram devidamente esterilizados e os experimentos foram conduzidos em uma capela de fluxo laminar, isento de microrganismos contaminantes.

#### 4.2.2 Determinação da viabilidade celular com azul de Tripán

Para a realização dos experimentos *in vitro*, primeiro foi determinada a viabilidade celular e feita a contagem prévia das células viáveis. O azul de Tripán é utilizado como um corante de exclusão, penetra somente nas células permeabilizadas, ou seja, as que não apresentam a membrana íntegra (células inviáveis). As células com membrana íntegra (células viáveis) não permitem a passagem do corante e são visualizadas no microscópio sem nenhuma coloração (STROBER, 1997; STROBER, 2015).

As células foram centrifugadas, ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura, então foram retiradas alíquotas (50  $\mu$ L) da suspensão com as células, diluído na proporção 1:1 com o corante azul de Tripán 0,4%, homogeneizado e com o auxílio da micropipeta, colocando 10  $\mu$ L na câmara de Neubauer para realizar a contagem no microscópio, no aumento de 400x. Foram contados os quatro quadrantes laterais para a verificação da viabilidade das células e posterior plaqueamento. A densidade celular foi de 50.000 células por poço para realizar o plaqueamento em placas com 96 poços.

#### 4.2.3 Determinação da viabilidade celular com Resazurina

Para a quantificação da viabilidade celular, foi utilizada a técnica fluorimétrica utilizando a Resazurina. A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) é um corante redox utilizado como indicativo de atividade metabólica em culturas celulares. Quando esse composto é reduzido a resorufina pelas mitocôndrias das células viáveis, assume uma coloração rosa com alta fluorescência em vermelho. Essa fluorescência pode ser então medida por um espectrofotômetro e quantificada para afirmar o potencial citotóxico de cada composto, frente aos macrófagos J774A.1 (ANOOPKUMAR-DUKIE *et al.*, 2005; O'BRIEN, J. *et al.*, 2000).

A densidade celular utilizada foi de 50.000 células/poço em uma placa de 96 poços. As placas foram incubadas por 24 horas em uma temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> para a adesão e proliferação das células até chegarem a uma confluência de 80%. O experimento foi realizado em triplicata, e os poços foram tratados com os

três compostos em concentrações de 1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000  $\mu\text{M}$ . Ainda foram feitos poços tratados com somente DMSO 1%, para controle negativo, denominado como “Branco”. Depois de outra incubação por 24 horas, o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados com PBS duas vezes e então adicionado resazurina em uma concentração de 1,5 mg/mL. A placa foi incubada por 4 horas à temperatura ambiente, homogeneizadas e então foi feita a leitura em fluorescência entre 530/590 nm, em um espectrofluorímetro de microplaca Gemini™ XPS (Molecular Devices, CA, EUA), no laboratório de Tecnologias Integradas (Intelab), da UFSC.

Com os dados obtidos foi possível determinar a concentração citotóxica 10% (CC10) de cada composto, ou seja, a dose mínima necessária para matar 10% das células utilizadas, mantendo assim 90% das células viáveis. Para o modelo de inflamação *in vitro*, esse é o resultado esperado, para que possa dar continuidade aos experimentos (CHAN *et al.*, 2017). Para o cálculo da CC10, foi utilizado uma análise da regressão não linear utilizando o logaritmo da concentração em função da resposta normalizada (porcentagem da viabilidade celular), onde a viabilidade celular do grupo controle branco, tratado com dimetilsulfóxido (DMSO 1%), foi considerado como referência (100% de células viáveis). Para a determinação da CC10 foi utilizado o software GraphPad Prism® versão 8.0 (San Diego, CA, EUA) pelo cálculo linear da linha de tendência.

#### **4.2.4 Modelo de inflamação *in vitro***

No modelo de inflamação *in vitro* foi utilizada a linhagem celular de macrófagos murinos J774A.1, e a inflamação foi induzida pela adição de LPS (*E. Coli*: O111:B4 - Sigma Aldrich) que mimetiza as condições de inflamação (ROSSOL *et al.*, 2011).

As células foram contadas pela técnica de Tripán, em seguida, adicionou-se uma quantidade em torno de 50.000 células por poço em uma placa de 96 poços. As placas foram incubadas por 24 horas em uma temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> para a adesão e proliferação das células até chegarem a uma confluência de 80%. O experimento foi realizado em triplicata, o meio de cultura foi substituído e os poços

tratados com as doses pré definidas dos compostos, a partir do resultado da CC10. Ainda foram feitos poços tratados somente com o veículo, DMSO 1%, para controle negativo, denominado como “Branco”, poços tratados com o fármaco de referência (Dexametasona) concentração de 7  $\mu$ M, diluído em PBS, como controle positivo e ainda tratados com DMSO e induzidos com LPS para o controle inflamado.

Depois de tratadas, as placas foram incubadas por 1 hora e então foi adicionado LPS, 1  $\mu$ g/ mL (exceto o grupo branco), preparado no dia do experimento e diluído em PBS. Após 24 horas de estímulo, o sobrenadante foi coletado para determinar a quantidade de NO produzido pelas células.

#### **4.2.5 Mensuração dos metabólitos de óxido nítrico (NOx)**

A produção de NO foi mensurada indiretamente pela reação de Griess, que quantificará a formação do metabólito nitrito. O princípio dessa reação é que o nitrito presente na amostra reage com sulfanilamida em meio ácido para formar um composto diazo que, em seguida, reage com N-(1-naftil)etilenodiamina em meio ácido para formar um produto de cor rosa. A intensidade dessa cor é proporcional à quantidade de nitrito presente na amostra, que então pode ser lida em um comprimento de onda de 540 nm (GREEN *et al.*, 1982; GRIESS, P., 1879).

Nos ensaios *in vitro*, 50 $\mu$ L do sobrenadante coletado foi transferido para uma placa de 96 poços, adicionado 50 $\mu$ L dos reagentes de Griess (1:1) e incubado durante 40 minutos ao abrigo da luz e temperatura ambiente. A placa foi lida a 540 nm em um leitor de ELISA MB-580 (HEALES, Gouwei Road, SZN, CN).

Pela dosagem de metabólitos de NO foi possível determinar a concentração inibitória 50% (IC<sub>50</sub>) dos compostos, ou seja, a concentração de cada composto capaz de inibir em 50 % os níveis de NOx, quando comparado ao controle inflamado (SEBAUGH, 2011). O valor da IC<sub>50</sub> foi obtido por meio de uma análise de regressão não linear utilizando o logaritmo da concentração em função da resposta normalizada (porcentagem da inibição de NOx), calculados com auxílio do programa GraphPad Prism® versão 8.0 (San Diego, CA, EUA).

### **4.3 Estudo *in vivo***

#### **4.3.1 Animais**

Todos os procedimentos realizados durante este trabalho foram conduzidos segundo a normatização atual do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com aprovação no Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) sob protocolo Nº 1392200323/UFSC. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Imunologia (LAPI) no Departamento de Análises Clínicas da UFSC, de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) Todas as pessoas envolvidas nos experimentos foram treinadas para o manejo adequado dos animais.

Para os experimentos *in vivo*, foram utilizados camundongos albino *Swiss* fêmeas, com um mês de idade, entre 18 e 25 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UFSC. Os animais receberam alimentação adequada, foram acomodados em gaiolas plásticas, com serragem, em ambiente com temperatura controlada ( $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), com ciclos de luz (325 lux), claro/escuro 12/12 horas, umidade de 40 a 60% e ruído  $< 60\text{db}$ . Ao chegarem, os camundongos receberam uma dose terapêutica profilática do vermífugo piperazina, (ACS Científica, Sumaré, São Paulo, Brasil, 1,4-Di-azaciclohexano, Di-etilenodiamina), de acordo com o peso e distribuídos nos grupos de forma aleatória.

#### **4.3.2 Anestesia e eutanasia**

Para realizar o procedimento de instilação de LPS, foi utilizado uma mistura de cetamina a 10% (50 mg/kg) e xilazina a 2% (5 mg/kg) via intraperitoneal. Durante o processo de recuperação da anestesia os animais receberam acompanhamento dos pesquisadores, e bolsas térmicas foram colocadas junto aos seus corpos para a manutenção do calor corporal.

Para o procedimento da eutanasia, também foi utilizado cetamina a 10% e xilazina a 2%, nas concentrações de 300 mg/kg e 30 mg/kg respectivamente. Os animais foram acompanhados durante todo o procedimento e foi confirmada a morte antes de começar o procedimento cirúrgico. Para a confirmação de morte foram

observados: a ausência de movimento respiratório (apneia); ausência de batimentos cardíacos (assistolia); ausência de pulsação; mucosas pálidas e perda do reflexo corneal (BRASIL, 2018)

#### **4.3.3 Modelo de lesão pulmonar aguda (ALI) induzida por LPS e obtenção do lavado bronco-alveolar**

Para estudar o processo inflamatório das vias aéreas e o potencial anti-inflamatório dos compostos selecionados, foi utilizado o modelo de ALI, induzido pela instilação de LPS em camundongos. O uso desse modelo em camundongos é justificado pela capacidade de mimetizar o processo inflamatório das vias aéreas, que ocorre em doenças inflamatórias agudas do pulmão, como a SDRA em humanos. A exposição do organismo ao LPS é um dos fatores que pode causar esse tipo de doença (REUTERSHAN *et al.*, 2005).

O modelo se baseia nos protocolos descritos por Altemeier, Hung e Matute-Bello (2008).

Neste trabalho, os animais receberam tratamento prévio com o composto testado nas doses de 30, 10 e 3 mg/kg e os controles para o teste. O tratamento foi realizado via oral por gavagem, e após uma hora os animais foram anestesiados para a instilação de LPS via intranasal (5 mg/kg em 50 µL de PBS, 10 UE/nanograma de LPS). Após 12 horas, os camundongos foram submetidos a eutanásia por overdose de cetamina e xilasina (50 mg/kg e 5 mg/kg, respectivamente) para a coleta do fluido do lavado bronco alveolar (BALF).

Para os experimentos os animais foram separados aleatoriamente em 4 grupos: 1) Veículo (animais tratados com o veículo salina e DMSO 5% via oral, e salina intranasal); 2) Controle negativo (animais tratado com o veículo salina e DMSO 5% via oral, e LPS intranasal); 3) Controle positivo (animais tratados com o fármaco anti-inflamatório de referência, dexametasona, 5 mg/kg via oral, e LPS intranasal); 4) Grupo teste (animais tratados com concentrações selecionadas dos compostos distintos via oral e LPS intranasal). Cada grupo foi representado por pelo menos seis animais (n=6).

Para realizar a contenção dos camundongos, esses foram pegos pela base da cauda e apoiados sob a grade da gaiola. Com uma mão segura-se a cauda e com a outra apreende-se o dorso do animal com o método de três dedos. Para realizar a gavagem, o animal foi contido e o tratamento é administrado por meio da introdução da agulha de gavagem até o estômago. Após uma hora, os animais foram anestesiados, exceto o grupo veículo, para a instilação de LPS via intranasal, 5 mg/kg em 20 µL de PBS. A instilação foi feita nos animais deitados com a cabeça elevada, com a utilização de uma micropipeta para gotejar a solução nas narinas. Os camundongos permanecerão nessa posição até sua recuperação total da anestesia.

Após 12 horas do tratamento, foi realizada a eutanásia dos animais. Para a coleta do BALF, os animais foram fixados em uma mesa cirúrgica, a traqueia e o pulmão foram expostos. Cuidadosamente é inserida uma cânula na traquéia e então é feita a lavagem dos pulmões três vezes, com 1,5 mL de solução salina. O BALF coletado foi armazenado a -20°C. A representação do modelo de ALI pode ser observada na Figura 2.

#### **4.3.4 Contagem total e diferencial de leucócitos no lavado broncoalveolar**

Para a avaliação da migração celular, a contagem total de leucócitos foi realizada até uma hora depois da obtenção do lavado bronco-alveolar, sem passar por processo de congelamento. Para a diluição foi utilizado o líquido de Türk (1:4). A contagem é realizada na câmara de Neubauer, utilizando o microscópio no aumento de 400 vezes. Foram contados quatro quadrantes e então feito a média. O resultado foi expresso em número total de leucócitos  $\times 10^4$  / mL.

Para a contagem diferencial de leucócitos (polimorfonucleares e mononucleares), também foi utilizado o BALF antes do congelamento. Foi utilizada uma citocentrífuga (Wescor-Cytopro, Logan, Utah, EUA) para o preparo da lâmina, com 50 µL do lavado. As lâminas foram coradas com Panótico® (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil), que é uma mistura de corantes básicos, como o azul de metileno e o violeta de metila, e corantes ácidos, como a eosina. Foram contadas 100 células por lâmina, no aumento de 1000 vezes e o resultados foram expressos em número total de células  $\times 10^5$

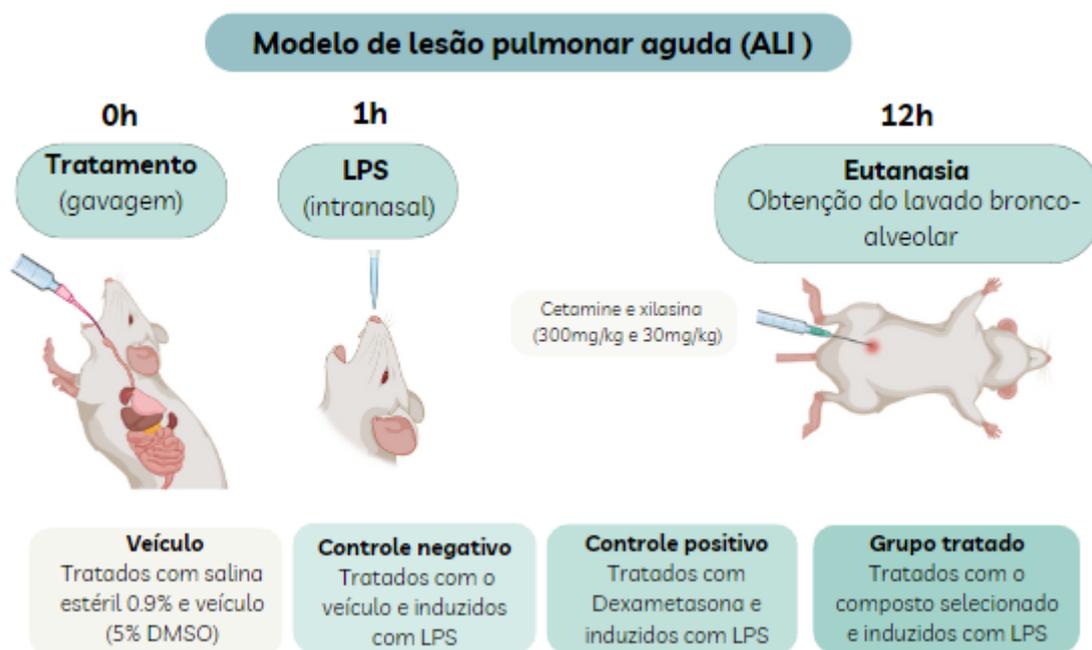


Figura 2: Tratamento dos camundongos realizado por gavagem, uma hora depois foi realizada a indução da inflamação com LPS intranasal. Após 12 horas do tratamento foram administrados anestésicos em doses letais, e depois da eutanásia foi coletado o BALF. Os animais foram divididos em diferentes grupos: veículo (tratados com salina estéril 0,9% e o veículo, 5% DMSO), controle negativo (tratados com o veículo e induzidos com LPS), controle positivo (tratados com Dexametasona e induzidos com LPS) e grupo tratado (tratados com o composto selecionado e induzidos com LPS). Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.3.5 Mensuração de exsudato em lavado broncoalveolar

Para mensurar a exsudação dos pulmões, as proteínas presentes no BALF foram quantificadas pela técnica de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). As amostras foram centrifugadas e uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$ , foi diluída em 95  $\mu\text{L}$  de água destilada e então transferida para uma placa de 96 poços. Em cada poço foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Lowry (25% de CTC: carbonato de sodio:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  - 10%, sulfato de cobre:  $\text{CuSO}_4$  0,1%, tartarato duplo Na/K 0,2%; 25% de SDS a 10%; 20% de NaOH 0,8 N e 30% de água destilada) e a placa foi incubada por 10 minutos. Foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin e 30 minutos depois foi realizada a leitura em

630 nm, com o auxílio de leitora de microplacas (Organon, Tecknica Roseland, New Jersey, EUA). Junto com as amostras, foi feita uma curva padrão com a diluição de albumina para obter uma equação da reta com concentrações conhecidas de proteína.

Na primeira reação, houve a desnaturação de proteínas presentes na amostra e liberação dos grupos amino, pela adição da solução alcalina (NaOH). Com a adição dos reagentes de Lowry, que contém cobre e tartarato de sódio (agentes redutores), ocorre a redução do cobre de  $Cu^{2+}$  para  $Cu^{+}$  e esse complexa com os grupos amino das proteínas. Quando adicionado o reagente de Folin, que é um agente oxidante, este reagiu com o complexo cobre-proteína e produziu a cor azul do produto final. A intensidade da cor azul formada foi proporcional à quantidade de proteínas na amostra (LOWRY *et al.*, 1951).

#### **4.3.6. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)**

A determinação da atividade enzimática da MPO foi realizada em um leitor de placas de ELISA, utilizando para isso uma curva padrão de MPO (0,7 – 140 mU/mL) para a interpolação dos resultados. Os resultados foram expressos em mU/mL (RAO *et al.*, 1993).

As amostras foram centrifugadas e uma alíquota foi transferida para um tubo plástico, onde foi adicionado brometo de cetrimônio 0,5% (HTAB) 1:1, o tubo foi agitado e congelado a uma temperatura de  $-20^{\circ}C$ , em seguida descongelado. Esse processo de congelamento e descongelamento foi repetido três vezes para romper membranas celulares e lisossomos das células, liberando assim as enzimas contidas nelas. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante coletado para a dosagem de MPO. As amostras foram transferidas para uma placa de 96 poços, foi adicionado o meio de reação contendo tampão fosfato, peróxido de hidrogênio 0,1%, O-dianisidina e água destilada, incubado por 15 minutos a  $37^{\circ}C$ , e por fim adicionado a azida 1% para parar a reação. Depois de 10 minutos foi feita a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm.

#### 4.3.7 Determinação das concentrações de óxido nítrico (NO<sub>x</sub>)

A quantidade de óxido nítrico (NO) presente em cada amostra foi mensurada pela presença de seus metabólitos nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), seguindo a reação de Griess (GREEN *et al.*, 1982). Foram realizadas curvas-padrão com concentrações conhecidas de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (0 -150 µM), permitindo a determinação dos valores de NO<sub>x</sub> (µM).

Para determinar as concentrações de óxido nítrico foi realizada a desproteinização das amostras, com a adição de sulfato de zinco a 20% e congelamento *overnight* a -20°C.

#### 4. 4 Análise estatística

Os experimentos *in vitro* foram realizados em triplicata para uma maior confiabilidade dos dados. Os resultados foram analisados pelo software GraphPad Prism® versão 8.0 (San Diego, Califórnia, EUA) e expressos como média ± erro padrão da média. Utilizou-se também ANOVA e Teste de Tukey para a análise estatística. Os resultados com o valor de P < 0,05 foram considerados significativos.

#### 4. 5 Desenho experimental

Como já mencionado, esta pesquisa foi projetada visando a utilização do menor número de animais possível. Inicialmente foi realizada a triagem *in vitro*, com o teste de citotoxicidade para determinar a CC10, os compostos que obtiverem os menores valores foram selecionados para o teste de inibição dos metabólitos de óxido nítrico. Os compostos com os menores valores de IC<sub>50</sub> foram submetidos a testes *in vivo* para avaliar a atividade anti-inflamatória. A Figura 3 mostra as etapas de triagem e seleção dos compostos.

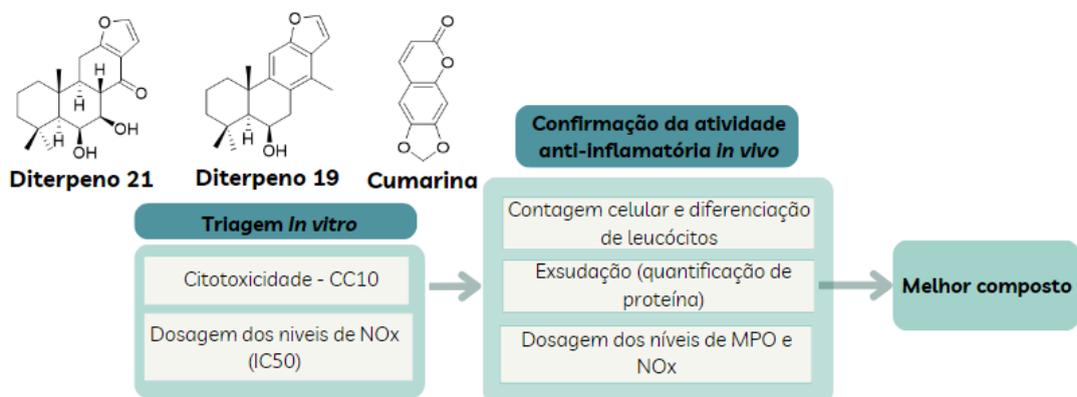


Figura 3: Elaborado pela autora.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Resultados *in vitro*

#### 5.1.1 Viabilidade celular

Os resultados demonstram que quando comparados com o controle negativo (branco), o composto diterpeno 21 (Figura 4A) e o composto cumarina (Figura 4C) apresentaram pouca citotoxicidade nas doses abaixo de 100  $\mu\text{g/mL}$ , ou seja, alta viabilidade celular na linhagem celular dos macrófagos J774A.1 (Figura 4C). Já o composto diterpeno 19 (Figura 4B) apresentou viabilidade celular

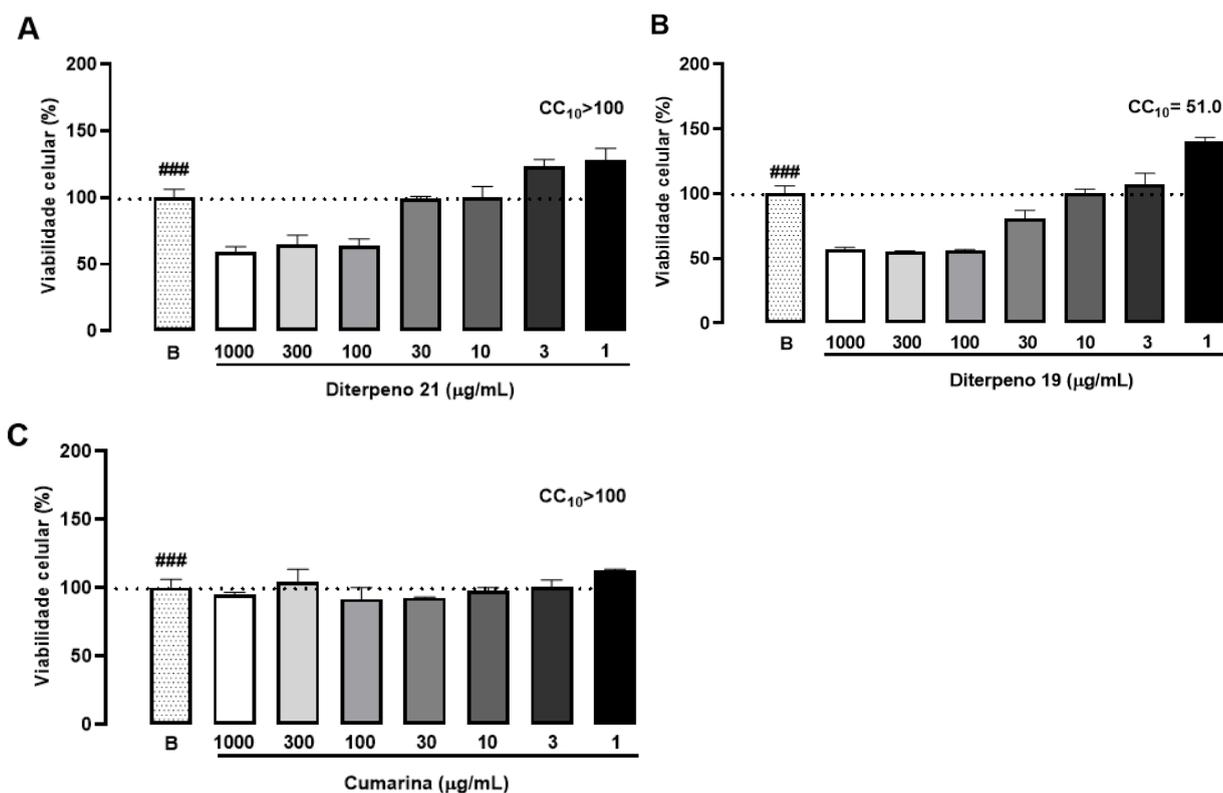


Figura 4: Efeito dos compostos diterpeno 21 (A), diterpeno 19 (B) e cumarina (C) em diferentes concentrações (1000, 300, 100, 30, 10, 3 e 1  $\mu\text{g/mL}$ ) sobre a viabilidade celular da linhagem de macrófagos J774A.1. No eixo X, B = células tratadas somente com o veículo (PBS e DMSO 5%). CC10: concentração mínima necessária para manter 90% das células viáveis. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão em triplicata. ### P < 0,001 LPS versus Branco.

adequada somente nas doses inferiores a 30  $\mu\text{g/mL}$ , e citotóxico nas doses acima de 100  $\mu\text{g/mL}$ , com a  $\text{CC}_{10}$  51  $\mu\text{g/mL}$ . Esses dois compostos que apresentaram valores de  $\text{CC}_{10}$  acima de 100  $\mu\text{g/mL}$ , e foram considerados seguros para os macrófagos J774A.1. Os demais experimentos foram realizados apenas com esses compostos para assegurar a viabilidade celular.

### 5. 1. 2 Mensuração dos metabólitos de óxido nítrico (NOx)

Os resultados demonstraram que o composto cumarina apresentou inibição da produção de NOx de  $26,5 \pm 0,8\%$  na dose de 100  $\mu\text{g/mL}$ ,  $23,4 \pm 8,8\%$  na dose de 30  $\mu\text{g/mL}$ ,  $42,2 \pm 7,6\%$  na dose de 10  $\mu\text{g/mL}$ ,  $46,8 \pm 5,7$  na dose de 3  $\mu\text{g/mL}$  e  $46,9 \pm 6,1\%$  na dose de 1  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 5A). Já o diterpeno 21 na dose de 100  $\mu\text{g/mL}$  apresentou  $58,6 \pm 4,7\%$  de inibição da produção de óxido nítrico quando comparado ao grupo LPS, na dose de 30  $\mu\text{g/mL}$  apresentou  $12,2 \pm 3,8\%$ , na dose de 10  $\mu\text{g/mL}$  foi  $25,2 \pm 3,0\%$ , na dose de 3  $\mu\text{g/mL}$  apresentou  $30,0 \pm 3,1\%$ , e na dose de 1  $\mu\text{g/mL}$  foi  $33,0 \pm 7,7\%$  de inibição (Figura 5B). O grupo tratado com o fármaco de referência, dexametasona, inibiu a produção de NOx (% de inibição:  $54,4 \pm 4,7$ ) ( $P < 0,001$ ). A  $\text{IC}_{50}$  foi calculada para os dois compostos e ambos apresentaram valores menores que 1  $\mu\text{g/mL}$ .

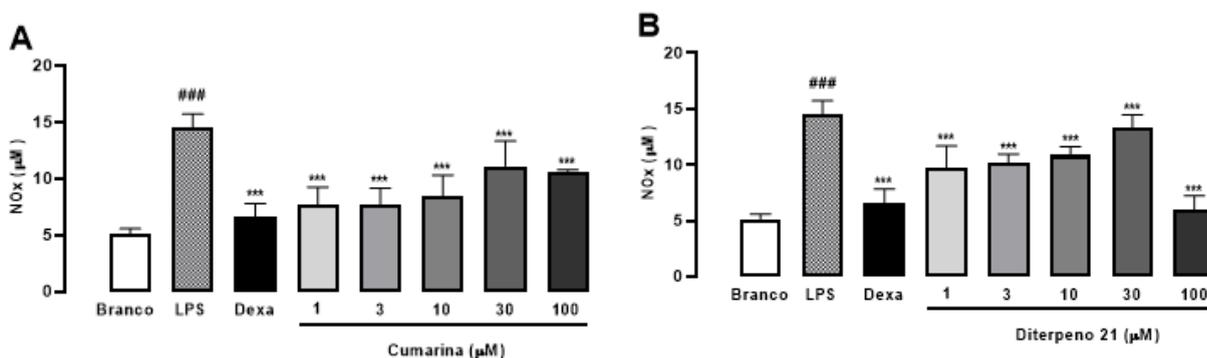


Figura 5: Efeito dos compostos cumarina (A) e diterpeno 21 (B) em diferentes concentrações (1000, 300, 100, 30, 10, 3 e 1  $\mu\text{g/mL}$ ) sobre níveis dos metabólitos do óxido nítrico (NOx) em macrófagos J774A.1 estimulados com LPS. Branco = células tratadas somente com o veículo (PBS e DMSO 5%); LPS = células tratadas apenas com LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ); DEXA = células pré-tratadas com dexametasona (10  $\mu\text{M}$ ); Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão em triplicata. \*  $P < 0,001$ . ###  $P < 0,001$  LPS versus Branco.

## 5. 2 Resultados *in vivo*

### 5. 2. 1 Efeito dos compostos na migração celular

Os dois compostos que seguiram para os testes *in vivo*, cumarina e diterpeno 21, tiveram um bom desempenho quando comparados ao grupo controle inflamado, em todas as doses, diminuindo a migração leucocitária para o local da inflamação. Quando comparado com o grupo controle LPS, que não recebeu tratamento, o composto cumarina teve um potencial de inibição de  $78,8 \pm 3,2\%$  na dose de 30 mg/kg,  $68,5 \pm 2,9\%$  na dose de 10 mg/kg e  $66,1 \pm 2,4\%$  na dose de 3 mg/kg, não demonstrou diferença estatística entre as doses (Figura 6A). O composto diterpeno 21 apresentou resultados semelhantes, com inibição de  $77,0 \pm 2,2\%$  na dose de 30 mg/kg,  $78,2 \pm 2,5\%$  na dose de 10 mg/kg e  $67,9 \pm 2,2\%$  na dose de 3 mg/kg, sem diferença estatística entre as doses (Figura 6B). O fármaco de referência, dexametasona, foi capaz de inibir a migração leucocitária ( $87 \pm 1,5\%$ ), com taxas de inibição semelhantes aos compostos testados ( $P < 0,001$ ).

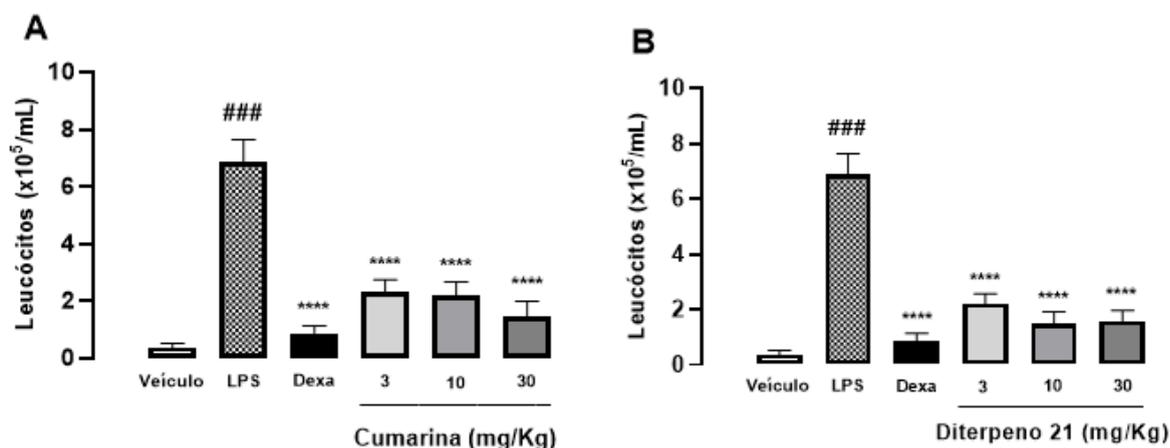


Figura 6: Efeito dos compostos cumarina (A) e diterpeno 21 (B) em diferentes doses (3 a 30 mg/Kg) sobre a contagem total de leucócitos no BALF em inflamação aguda pulmonar (ALI) induzida por LPS, em camundongos. Veículo = animais tratados somente com o veículo (PBS e DMSO 5%); LPS = Animais tratados com LPS (5 mg/kg); Dexa = Animais tratados com o fármaco Dexametasona (5 mg/kg). Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \*  $P < 0,001$ ; ###  $P < 0,001$  LPS versus Veículo; (n = 6 animais).

Ao diminuir a contagem de leucócitos totais, os dois compostos também foram capazes de diminuir a migração neutrofílica em todas as doses testadas. O composto cumarina apresentou a maior inibição na dose de 30 mg/kg (% de inibição  $79,7 \pm 3,4$ ), bem como também inibiu a migração de neutrófilos nas doses de 10 e 3 mg/kg (% de inibição:  $72,7 \pm 2,6$  e  $68,4 \pm 2,4$  respectivamente) (Figura 7A). O diterpeno 21 apresentou uma maior inibição na dose de 30 mg/kg (% de inibição:  $83,29 \pm 2,2$ ), mas também inibiu a migração de neutrófilos nas doses de 10 e 3 mg/kg, de forma dose dependente (% de inibição:  $81,2 \pm 3,6$  e  $67,02 \pm 2,5$  respectivamente), apresentando diferença significativa entre as doses ( $P < 0,001$ ) (Figura 7B). O fármaco de referência, dexametasona, inibiu a migração de neutrófilos ( $99,6 \pm 1\%$ ) ( $P < 0,001$ ).

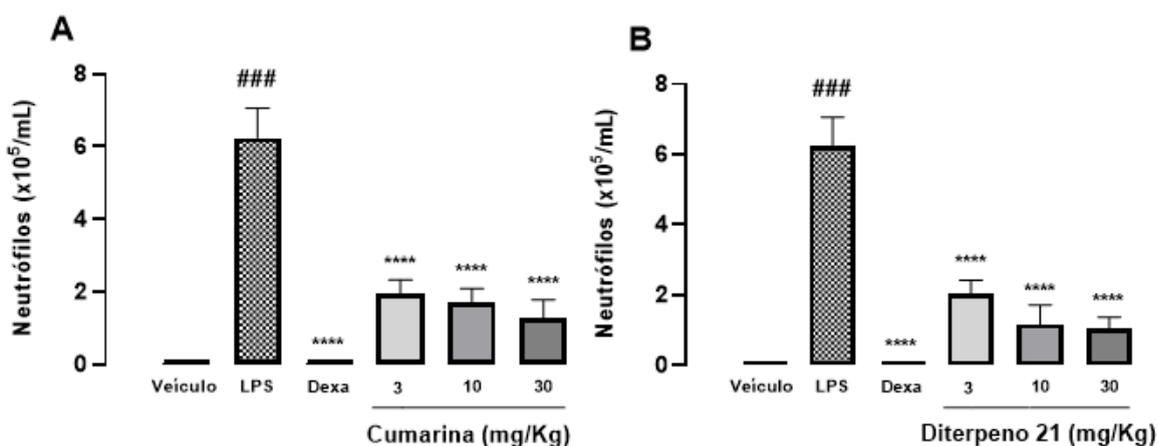


Figura 7: Efeito dos compostos cumarina (A) e diterpeno 21 (B) em diferentes doses (3 a 30 mg/Kg) sobre a contagem diferencial de leucócitos no BALF em inflamação aguda pulmonar (ALI) induzida por LPS, em camundongos. Veículo = animais tratados somente com o veículo (PBS e DMSO 5%); LPS = Animais tratados com LPS (5 mg/kg); Dexa = Animais tratados com o fármaco Dexametasona (5 mg/kg). Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \*  $P < 0,001$ ; ###  $P < 0,001$  LPS versus Veículo; (n = 6 animais).

### 5. 2. 2 Efeito do diterpeno 21 e cumarina na exsudação.

Os dois compostos testados, diterpeno 21 e cumarina foram capazes de reduzir a formação de exsudato em diferentes doses testadas. O composto cumarina apresentou uma maior capacidade de inibir a exsudação na dose de 10 e 3 mg/kg

(% de inibição:  $85,5 \pm 3,3$  e  $93,7 \pm 5,2$ , respectivamente), com uma taxa de inibição maior que o fármaco de referência, dexametasona, já na dose de 30 mg/kg apresentou um percentual de inibição menor,  $9,5 \pm 7,3\%$  ( $P < 0,001$ ) (Figura 8A). O composto diterpeno 21 apresentou a maior inibição na dose de 30 mg/kg ( $61,44 \pm 4,7\%$ ), seguido da dose de 10 mg/kg ( $45,1 \pm 7,4\%$ ) e 3 mg/kg ( $30,2 \pm 9,2\%$ ), mostrando um perfil dose dependente ( $P < 0,001$ ) (Figura 8B). A dexametasona apresentou inibição da formação de de exsudato ( $74,5 \pm 1,6\%$ ) ( $P < 0,001$ ).

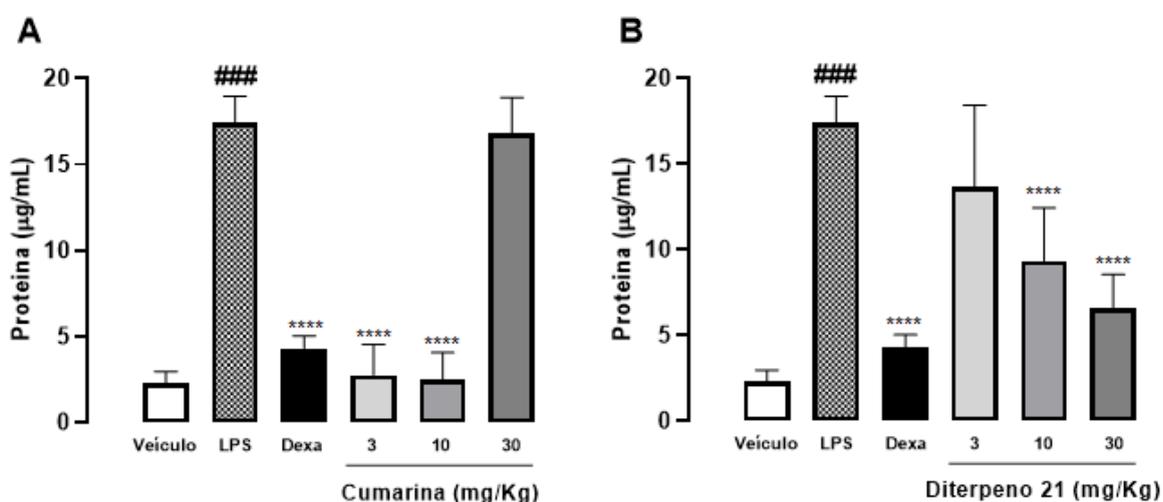


Figura 8: Efeito dos compostos cumarina (A) e diterpeno 21 (B) em diferentes doses (3 a 30 mg/Kg) sobre a exsudação por meio da quantificação de proteínas no BALF em inflamação aguda pulmonar (ALI) induzida por LPS, em camundongos. Veículo = animais tratados somente com o veículo (PBS e DMSO 5%); LPS = Animais tratados com LPS (5 mg/kg); Dexa = Animais tratados com o fármaco Dexametasona (5 mg/kg). Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \*  $P < 0,001$ ; ###  $P < 0,001$  LPS versus Veículo; (n = 6 animais).

### 5. 2. 3 Mensuração dos metabólitos de óxido nítrico (NOx) no BALF.

Os dois compostos testados, diterpeno 21 e cumarina, foram capazes de reduzir os níveis de metabólitos de óxido nítrico no BALF em diferentes doses testadas quando comparados com o controle inflamado. O composto cumarina apresentou níveis de inibição similares nas diferentes doses (% de inibição 30, 10 e 3 mg/kg:  $13,0 \pm 2,3$ ;  $22,0 \pm 3,8$  e  $18,85 \pm 3,3$  respectivamente) ( $P < 0,001$ ) (Figura 9A). O composto diterpeno 21 também apresentou inibição dos metabólitos do óxido nítrico de forma semelhante em todas as doses testadas de

30, 10 e 3 mg/kg (% de inibição  $19,8 \pm 5,2$ ;  $25,0 \pm 1,6$  e  $18,2 \pm 2,5$  respectivamente) (Figura 9B). O fármaco de referência Dexametasona foi capaz de inibir a quantidade de metabólitos do óxido nítrico (% de inibição  $84,7 \pm 0,9$ ) ( $P < 0,001$ ).

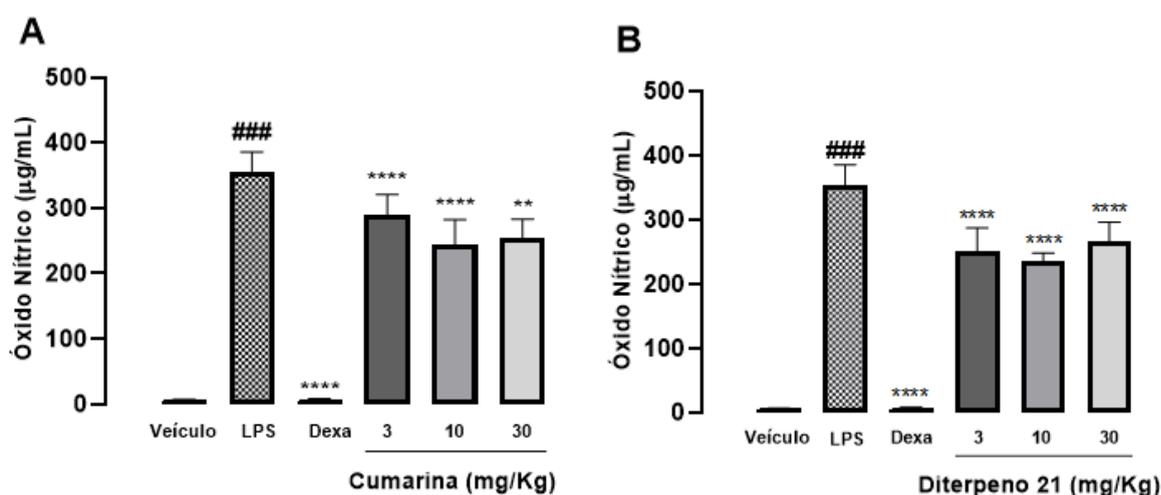


Figura 9: Efeito dos compostos cumarina (A) e diterpeno 21 (B) em diferentes doses (3 a 30 mg/Kg) sobre a os níveis de metabólitos de óxido nítrico (NOx) no BALF em inflamação aguda pulmonar (ALI) induzida por LPS, em camundongos. Veículo = animais tratados somente com o veículo (PBS e DMSO 5%); LPS = Animais tratados com LPS (5 mg/kg); Dexa = Animais tratados com o fármaco Dexametasona (5 mg/kg). Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\* $P < 0,01$ ; ###  $P < 0,001$  LPS versus Veículo; (n = 6 animais)

#### 5. 2. 4 Efeito da cumarina e diterpeno 21 sobre a atividade da mieloperoxidase.

Os dois compostos foram capazes de reduzir a atividade da mieloperoxidase no BALF de animais induzidos com LPS intranasal, quando comparados com o grupo controle inflamado. O composto cumarina, nas doses de 10 e 3 mg/kg apresentou inibição de  $96 \pm 03\%$  e  $96,5 \pm 1,4 \%$ , respectivamente, valores mais altos que os do fármaco de referência. Na dose de 30 mg/kg este composto também reduziu as concentrações de MPO, com um percentual de inibição de  $86,1 \pm 2,6$  ( $P < 0,001$ ) (Figura 10A). O composto diterpeno 21 também demonstrou capacidade de inibir a mieloperoxidase nas três doses estudadas, 30, 10 e 3 mg/kg (% de inibição:  $48,7 \pm 5,9$ ;  $73,1 \pm 2,8$  e  $73,9 \pm 2,7$ , respectivamente) ( $P < 0,001$ ) (Figura 10B). A

dexametasona, fármaco de referência, também inibiu este parâmetro (% de inibição:  $93,8 \pm 0,2$ ) ( $P < 0,001$ ).

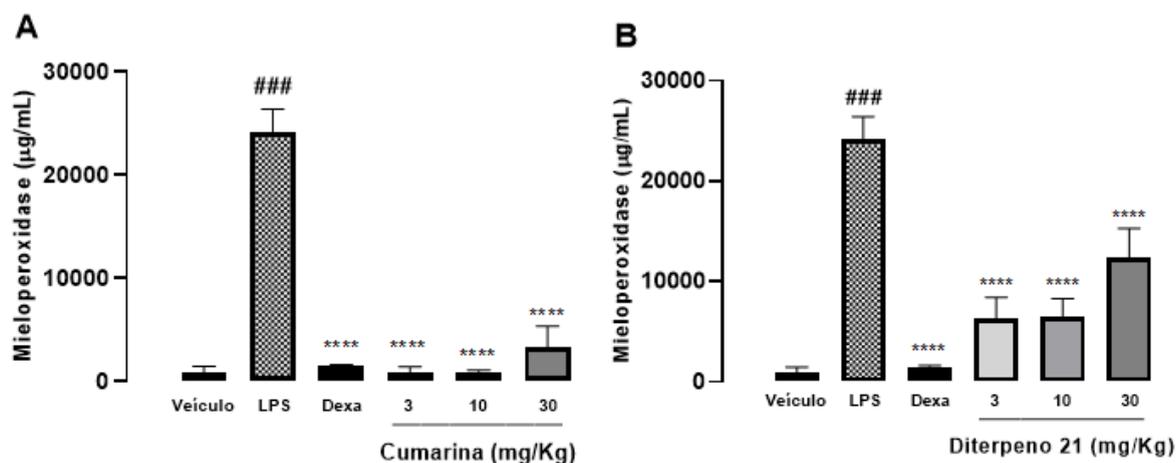


Figura 10: Efeito dos compostos cumarina (A) e diterpeno 21 (B) em diferentes doses (3 a 30 mg/Kg) sobre as concentrações da mieloperoxidase no BALF em inflamação aguda pulmonar (ALI) induzida por LPS, em camundongos. Veículo = animais tratados somente com o veículo (PBS e DMSO 5%); LPS = Animais tratados com LPS (5 mg/kg); Dexa = Animais tratados com o fármaco Dexametasona (5 mg/kg). Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \*\*\*\* $P < 0,001$ ; ###  $P < 0,001$  LPS versus Veículo; (n = 6 animais).

## 6 DISCUSSÃO

Em um estudo recente que utilizou o extrato das cascas da árvore *M. frondosus*, observou-se uma redução na concentração de óxido nítrico quando macrófagos RAW 264.7 foram induzidos com LPS. Além disso, no modelo animal de pleurisia induzida por carragenina em camundongos, o mesmo extrato demonstrou a capacidade de diminuir a migração celular total no fluido pleural pela redução da migração neutrofílica. Adicionalmente, verificou-se no fluido uma redução na liberação de mediadores pró-inflamatórios, incluindo a MPO e NOx. Esses resultados sugerem um potencial efeito anti-inflamatório do extrato no contexto celular e animal estudado que corroboram com os achados deste trabalho (BOTTAMEDI *et al.*, 2021).

Neste estudo, os três compostos isolados da árvore Cabreúva foram investigados quanto às suas atividades anti-inflamatórias. Já que os compostos são inéditos, foi feita uma busca na literatura por compostos das mesmas classes mas isolados de diferentes plantas em busca de comprovações científicas de suas propriedades anti-inflamatórias.

Este estudo iniciou-se por uma triagem *in vitro*, onde primeiro foi avaliado a citotoxicidade, esses testes são essenciais no desenvolvimento de fármacos para evitar toxicidade *in vivo* (BÁCSKAY *et al.*, 2018). Foi avaliada a viabilidade celular em cultura exposta a diferentes doses dos compostos. O composto diterpeno 19 mostrou uma CC<sub>10</sub> de 51 µg/mL, indicando que doses superiores a 51 µg/mL resultam em mais de 10% de células não viáveis, classificando o composto como citotóxico. Essa descoberta está alinhada com estudos anteriores que destacam a alta citotoxicidade de certos diterpenos, sugerindo seu potencial como agentes anticancerígenos. No entanto, é importante ressaltar que nem todos os diterpenos exibem citotoxicidade, o que é consistente com os resultados do diterpeno 21, que demonstrou baixa citotoxicidade (DAI *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2019). Já o composto cumarina revelou baixa citotoxicidade, com uma CC<sub>10</sub> superior a 100 µg/mL, há estudos que demonstram a ausência de citotoxicidade de compostos cumarínicos que corroboram com os resultados obtidos, entretanto, há estudos que demonstram

o potencial que as cumarinas têm de serem agentes citotóxicos, atuando contra tumores (KOSTOVA, 2005; PAWAR *et al.*, 2021; PAYA *et al.*, 1994).

Ao avaliar o potencial anti-inflamatório *in vitro*, por meio da mensuração da produção de metabólitos de óxido nítrico, tanto o composto diterpeno 21 quanto o composto cumarina demonstraram uma notável capacidade de reduzir este marcador inflamatório, quando comparado ao grupo controle inflamado, com valores de IC<sub>50</sub> inferiores a 1 µg/mL. Esses resultados estão em consonância com estudos prévios que destacaram as propriedades anti-inflamatórias de cumarinas, como a esculina, um derivado glicosídico da cumarina que é capaz de atenuar a produção de NO *in vitro* pela inibição da via do NF-κB (LI *et al.*, 2016). Outras pesquisas também demonstraram que as cumarinas são capazes de inibir a produção de NO quando as células são tratadas com esses compostos e estimuladas com LPS (TUAN ANH *et al.*, 2017). Em um artigo recentemente publicado, pesquisadores testaram os efeitos anti-inflamatórios de vários diterpenos de uma outra planta, *Pterolobium*, utilizando células J774A.1 e indução com LPS, e concluíram que estes compostos inibem a produção de metabólitos do óxido nítrico (RAKSAT *et al.*, 2022). Achados que corroboram com os resultados obtidos para o composto diterpeno da cabreúva.

Nos testes *in vivo* do estudo em questão, os dois compostos testados, cumarina e diterpeno 21, demonstraram resultados semelhantes aos encontrados na literatura. Outras pesquisas sugerem que, uma outra cumarina, a Esculina, apresenta inibição da infiltração de leucócitos totais e neutrófilos em modelo de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS em camundongos, e que o possível mecanismo seja pela ativação do fator nuclear eritróide 2- relacionado com o fator 2 (Nrf2) (KIM *et al.*, 2016). Já em outros estudos, com outro modelo de inflamação, como a pleurisia induzida por carragenina, o composto cumarinico IMMLG5521 foi capaz de reduzir a infiltração de neutrófilos pela inibição da translocação nuclear do NF-κB. O Osthol, da classe das cumarinas, teve efeito semelhante no mesmo modelo de pleurisia induzida por carragenina, mas o seu mecanismo de ação ainda é desconhecido (LI *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2011).

Outros diterpenos como o Andrografólido, presente na planta *Andrographis paniculata* demonstraram reduzir a infiltração de neutrófilos e leucócitos totais em

um modelo de lesão pulmonar aguda em camundongos BALB/C induzida por LPS pela inativação da via do NF- $\kappa$ B (ZHU *et al.*, 2013). Em outro modelo, de pleurisia induzida por carragenina em ratos, a Salvinorina, um diterpeno isolado da planta *Salvia divinorum*, diminuiu o infiltrado de leucócitos nos pulmões de ratos resultados esses que confirmam os achados deste estudo (ROSSI *et al.*, 2016) .

O composto cumarinico avaliado nesse estudo foi capaz de reduzir a formação de exsudato, um efeito similar ao observado com as cumarinas Praeruptorina D e E, em um modelo de lesão pulmonar aguda induzida por HCl em camundongos (YU *et al.*, 2013). Além disso, os compostos cumarinicos osthol e IMMLG5521 apresentaram resultados semelhantes em um modelo induzido por carragenina em camundongos (LI *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2011). O composto da classe dos diterpenos, Salvinorina A, contribuiu com a diminuição do acúmulo de exsudato, medido por um radioimunoensaio, em modelo de pleurisia induzido por carragenina em ratos (ROSSI *et al.*, 2016).

O composto Oridonin, da classe dos terpenos, mostrou resultados significativos na redução da inflamação, com a diminuição de NOx em camundongos com fibrose pulmonar e pneumonia, por se ligar covalentemente ao resíduo Thr109 do alvo da iNOS (GAO *et al.*, 2022).

Em outra pesquisa, os autores testaram compostos extraídos da planta *Saposhnikovia Radix*, entre estes compostos algumas cumarinas, foram capazes de diminuir os níveis de metabólitos de NO no BALF, no modelo de inflamação aguda induzida por LPS, em camundongos. Os autores mencionaram que este efeito pode estar relacionado com capacidade das cumarinas inibirem a via de ativação do NF- $\kappa$ B (LIU *et al.*, 2021).

Os compostos da cabreúva testados foram capazes de reduzir a atividade da enzima mieloperoxidase, e este efeito também foi observado em outros estudos com compostos das mesmas classes. No modelo de lesão pulmonar aguda induzido por HCl em camundongos, os compostos cumarinicos Praeruptorina D e E foram capazes de reduzir a produção de MPO. Outras cumarinas, o Osthol e o IMMLG5521 no modelo de lesão pulmonar aguda induzida por carragenina também apresentaram efeito semelhante (LI *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2013). Os diterpenos Salvinorina A e Angrografólido também apresentaram redução dessa

enzima em modelos de lesão pulmonar aguda em ratos e camundongos respectivamente (ROSSI *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2013).

## 7 CONCLUSÃO

Dos três compostos isolados de *Myrocarpus Frondosus*, dois deles demonstraram potencial anti-inflamatório. Tanto o composto cumarina quanto o diterpeno 21 apresentaram resultados satisfatórios e semelhantes quanto ao potencial anti-inflamatório, quando comparados com o grupo controle inflamado, nos parâmetros avaliados, sendo que o composto cumarina apresentou resultados mais promissores.

Após a etapa da triagem *in vitro*, o composto cumarina apresentou baixa citotoxicidade e capacidade de inibir metabólitos de óxido nítrico em células estimuladas com LPS. Na etapa seguinte, em ensaios *in vivo*, estes mesmos compostos também apresentaram resultados significantes quanto aos efeitos anti-inflamatórios. No modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS, utilizado neste estudo, os compostos foram capazes de diminuir a migração leucocitária, especialmente a neurotrófica, no local da inflamação. Ainda observou-se que os camundongos tratados com os compostos tiveram a formação de exsudato diminuída, a redução da produção de metabólitos de óxido nítrico e da atividade da mieloperoxidase.

Este estudo demonstrou que o composto diterpeno 21 e o composto cumarinico apresentam potencial anti-inflamatório, a partir desses achados inéditos, sugere-se uma pesquisa mais extensa para validar essas propriedades e elucidar os seus mecanismos de ação. Dentre os estudos que podem ser feitos estão: ensaios *in silico*, como docking molecular para investigar como os compostos interagem com proteínas associadas a inflamação, prevendo o sítio de ligação do fármaco, avaliações da farmacocinética e farmacodinâmica, estudos comparativos com outros fármacos existentes e investigações de toxicidade aguda e crônica. Esse aprofundamento é crucial para compreender o funcionamento desses compostos e sua potencial aplicação como base para o possível desenvolvimento de um novo fármaco anti-inflamatório.

## REFERÊNCIAS

ALONSO-CASTRO, A. J. *et al.* Antinociceptive Activity of Ent-Dihydrotucumanoic Acid Isolated from *Gymnosperma glutinosum* Spreng Less. **Drug Development Research**, v. 78, n. 7, p. 340–348, 24 jul. 2017.

ALONSO-CASTRO, A. J. *et al.* Anti-inflammatory and diuretic effects of the diterpene ent-dihydrotucumanoic acid. **Drug Development Research**, v. 80, n. 6, p. 800–806, 26 jun. 2019.

AMIN, K. M. *et al.* Design, synthesis and vasorelaxant evaluation of novel coumarin–pyrimidine hybrids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 20, p. 6087–6097, out. 2011.

ANAND, P.; SINGH, B.; SINGH, N. A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 3, p. 1175–1180, fev. 2012.

ANOOPKUMAR-DUKIE, S. *et al.* Resazurin assay of radiation response in cultured cells. **The British journal of radiology**, v. 78, n. 934, p. 945-947, 2005.

BACCHI, S. *et al.* Clinical Pharmacology of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: A Review. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 52–64, 1 set. 2012.

BÁCSKAY, I. *et al.* **Role of cytotoxicity experiments in pharmaceutical development.** [s.l.] IntechOpen, 2017.

BAILLY, C. Yuanhuacin and Related Anti-Inflammatory and Anticancer Daphnane Diterpenes from *Genkwa* Flos—An Overview. **Biomolecules**, v. 12, n. 2, p. 192, 23 jan. 2022.

BANSAL, Y.; SETHI, P.; BANSAL, G. Coumarin: a potential nucleus for anti-inflammatory molecules. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 7, p. 3049–3060, 10 nov. 2012.

BARBOSA, H. M. *et al.* ABORDAGEM FITOQUÍMICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM *Solanum acanthodes* (SOLANACEAE) HOOK. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 4, n. 1, 17 jul. 2017.

BEITLER, J. R. *et al.* Advancing precision medicine for acute respiratory distress syndrome. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 10, n. 1, p. 107–120, jan. 2022.

BERTIN, R. *et al.* Vasodilation and radical-scavenging activity of imperatorin and selected coumarinic and flavonoid compounds from genus *Casimiroa*. **Phytomedicine**, v. 21, n. 5, p. 586–594, abr. 2014.

BINDU, S.; MAZUMDER, S.; BANDYOPADHYAY, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. **Biochemical Pharmacology**, v. 180, n. 1, p. 114147, out. 2020.

BORGES BUBOLS, G. *et al.* The Antioxidant Activity of Coumarins and Flavonoids. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 318–334, 1 mar. 2013.

BOTTAMEDI, M. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory action (in vivo and in vitro) from the trunk barks of *Cabreúva* (*Myrocarpus frondosus* Allemao, Fabaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 267, p. 113545, 1 mar. 2021.

BRASIL, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA. Resolução Normativa nº 37 - de 27/01/18. Disponível em : <https://ceua.ufes.br/conteudo/diretriz-da-pratica-de-eutanasia-do-concea-resolucao-normativa-no-37-de-270118>. Acesso em 23 de março de 2023

BRENA, D.A.; LONGHI, S.J. Inventário florestal da Região da Quarta Colônia de Imigração Italiana do Rio Grande do Sul. Santa Maria: PRODESUS-PEDPNMA/UFDSM, 1998. 213p.

CABRERA, D. C. *et al.* Evaluation of climatic factors on the yield and chemical composition of the essential oil of *Myrocarpus frondosus*. **Natural Product Research**, v. 29, n. 7, p. 667–670, 2015.

**Cabriúva: *Myrocarpus frondosus*. - Portal Embrapa.** Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1139716/cabriuva-myrocarpus-frondosus>>. Acesso em: 14 set. 2023.

CHAN, C. *et al.* Incompatibility of chemical protein synthesis inhibitors with accurate measurement of extended protein degradation rates. **Pharmacology research & perspectives**, v. 5, n. 5, p. e00359, 2017.

CHEN, H.; BAI, C.; WANG, X. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine. **Expert Review of Respiratory Medicine**, v. 4, n. 6, p. 773–783, dez. 2010.

CHEN, J.-J. *et al.* Scutellaria baicalensis Ameliorates Acute Lung Injury by Suppressing Inflammation In Vitro and In Vivo. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 45, n. 1, p. 137–157, 2017.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International immunopharmacology**, v. 1, n. 8, p. 1397-1406, 2001.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: IBDF, Ministério da Agricultura, Imprensa Nacional, 1984. v.I a IV.

DA SILVA, A. A. *et al.* Coumarins and phenolic fingerprints of oak and Brazilian woods extracted by sugarcane spirit. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 21, p. 3681–3691, nov. 2009.

DAI, L.-P. *et al.* Three New Cytotoxic ent-Kaurane Diterpenes from *Isodon excisoides*. *Molecules*, v. 20, n. 9, p. 17544–17556, 22 set. 2015.

DE NARDO, D. Toll-like receptors: activation, signalling and transcriptional modulation. **Cytokine**, v. 74, n. 2, p. 181-189, 2015.

SANTI, I. I. DE *et al.* Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of the Oil and Plant Extract *Myrcarpus frondosus* Allemão. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, n. 7, p. 1560–1571, 13 jun. 2017.

DI ROSA, M. *et al.* Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathways. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 54, n. 4, p. 229–238, abr. 1996.

DI STASI, L.C. and HIRUMA-LIMA, C.A. Plantas medicinais na Amazônia e Mata Atlântica. 2ª Edição, UNESP, São Paulo/SP, 604, 2002

DIRSCH, V.; STUPPNER, H.; VOLLMAR, A. The Griess Assay: Suitable for a Bio-Guided Fractionation of Anti-Inflammatory Plant Extracts? **Planta Medica**, v. 64, n. 05, p. 423–426, jun. 1998

DORWARD, D. A. *et al.* Imaging inflammation: Molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 135, n. 2, p. 182–199, 1 ago. 2012.

dos SANTOS NASCIMENTO, M. V. P. *et al.* New pre-clinical evidence of anti-inflammatory effect and safety of a substituted fluorophenyl imidazole. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 1399-1407, 2019.

DUTRA, R. C. *et al.* Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4–29, 2016.

ERB, R. E.; EHLERS, M. H. Resazurin Reducing Time as an Indicator of Bovine Semen Fertilizing Capacity. **Journal of Dairy Science**, v. 33, n. 12, p. 853–864, dez. 1950.

ESCOBEDO-HINOJOSA, W. I. *et al.* Gastroprotective Mechanism and Ulcer Resolution Effect of *Cyrtocarpa procera* Methanolic Extract on Ethanol-Induced Gastric Injury. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. 1–12, 2018.

**Flora e Funga do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB115>>. Acesso em: 02 mai. 2023.

FYLAKTAKIDOU, K. *et al.* Natural and Synthetic Coumarin Derivatives with Anti-Inflammatory / Antioxidant Activities. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 30, p. 3813–3833, 1 nov. 2004.

GAO, J. *et al.* Oridonin attenuates lung inflammation and fibrosis in silicosis via covalent targeting iNOS. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 153, p. 113532, 1 set. 2022.

GORDON, S.; PLÜDDEMANN, A.; MARTINEZ ESTRADA, F. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. **Immunological Reviews**, v. 262, n. 1, p. 36–55, 1 nov. 2014.

GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, out. 1982.

GRIESS, P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt, Ueber einige Azoverbindungen". **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 12, n. 1, p. 426–428, jan. 1879.

GUO, Z. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, n. 2, p. 119–136, mar. 2017.

HASSANEIN, E. H. M. *et al.* Coumarins as Modulators of the Keap1/Nrf2/ARE Signaling Pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1–25, 25 abr. 2020.

HELFRICH, E. J. N. *et al.* Bacterial terpene biosynthesis: challenges and opportunities for pathway engineering. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 15, p. 2889–2906, 29 nov. 2019.

HIJOS-MALLADA, G.; SOSTRES, C.; GOMOLLÓN, F. NSAIDs, gastrointestinal toxicity and inflammatory bowel disease. **Gastroenterología y Hepatología** (English Edition), v. 45, n. 3, p. 215–222, mar. 2022.

HILLIER, S. G.; LATHE, R. Terpenes, hormones and life: isoprene rule revisited. **Journal of Endocrinology**, v. 242, n. 2, p. R9–R22, 1 ago. 2019.

HOUDKOVA, M. *et al.* Evaluation of antibacterial potential and toxicity of plant volatile compounds using new broth microdilution volatilization method and modified MTT assay. **Fitoterapia**, v. 118, p. 56–62, abr. 2017.

JAIN, M. *et al.* Antithrombotic Activity of a Newly Synthesized Coumarin Derivative 3-(5-Hydroxy-2,2-dimethyl-chroman-6-yl)-N-{2-[3-(5-hydroxy-2,2-dimethyl-chroman-6-yl)-propionylamino]-ethyl}-propionamide. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 81, n. 4, p. 499–508, 28 mar. 2013.

JOAO MATOS, M. *et al.* Looking for New Targets: Simple Coumarins as Antibacterial Agents. **Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 6, p. 1140–1145, 1 set. 2012.

JOFFRE, O. *et al.* Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. **Immunological reviews**, v. 227, n. 1, p. 234–247, 2009.

KIM, K. H. *et al.* Glycosylation enables aesculin to activate Nrf2. **Scientific Reports**, v. 6, p. 29956, 15 jul. 2016.

KONTOGIORGIS, C. *et al.* Studies on the antiplatelet and antithrombotic profile of anti-inflammatory coumarin derivatives. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 30, n. 6, p. 925–933, 25 mar. 2015.

KONTOGIORGIS, C.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Biological Evaluation of Several Coumarin Derivatives Designed as Possible Anti-inflammatory/Antioxidant Agents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 63–69, jan. 2003.

KOSTOVA, I. Synthetic and Natural Coumarins as Cytotoxic Agents. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**, v. 5, n. 1, p. 29–46, 1 jan. 2005.

KOSTOVA, I. *et al.* Coumarins as Antioxidants. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 25, p. 3929–3951, 1 set. 2011.

KUJAWSKA, M. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Beverage: Nutraceutical Ingredient or Conveyor for the Intake of Medicinal Plants? Evidence from Paraguayan Folk Medicine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. 1–17, 2018.

LASKIN, D. L. *et al.* Macrophages and Tissue Injury: Agents of Defense or Destruction? **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 51, n. 1, p. 267–288, 10 fev. 2011.

LAUTERJUNG, MIGUEL BUSARELLO. Genética de paisagens de espécies arbóreas no estado de Santa Catarina: implicações para a conservação. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, SC, 2021.

LI, D.; WU, M. Pattern recognition receptors in health and diseases. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 6, n. 1, p. 1-24, 2021.

LI, W. *et al.* Esculin attenuates endotoxin shock induced by lipopolysaccharide in mouse and NO production in vitro through inhibition of NF- $\kappa$ B activation. **European Journal of Pharmacology**, v. 791, p. 726–734, 15 nov. 2016.

LI, Z. *et al.* Osthole attenuates the development of carrageenan-induced lung inflammation in rats. **International Immunopharmacology**, v. 20, n. 1, p. 33–36, maio 2014.

LI, Z.-P. *et al.* Effect of compound IMMLG5521, a novel coumarin derivative, on carrageenan-induced pleurisy in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 661, n. 1-3, p. 118–123, 1 jul. 2011.

LIU, Q. *et al.* Anti-inflammatory effect and mechanism of ethanol extract from *Saposhnikovia Radix* in LPS-induced inflammation mouse model. **China Journal of Chinese Materia Medica**, v. 46, n. 18, p. 4800–4807, 1 set. 2021.

LIU, Y.-L. *et al.* Four New ent-Kaurane Diterpene Glycosides from *Isodon henryi*. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 15, p. 2736, 27 jul. 2019.

LOWENTHAL, J.; BIRNBAUM, H. Vitamin K and Coumarin Anticoagulants: Dependence of Anticoagulant Effect on Inhibition of Vitamin K Transport. **Science**, v. 164, n. 3876, p. 181–183, 11 abr. 1969.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUBSCHINSKI, T. L. *et al.* Effect of Aryl-Cyclohexanones and their Derivatives on Macrophage Polarization In Vitro. **Inflammation**, p. 1-19, 2022.

MASQUELIER, J. *et al.* Lysophosphatidylinositols in inflammation and macrophage activation: Altered levels and anti-inflammatory effects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1863, n. 12, p. 1458–1468, dez. 2018.

MATTHAY, M. A.; WARE, L. B.; ZIMMERMAN, G. A. The acute respiratory distress syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 8, p. 2731–2740, 1 ago. 2012.

MATUTE-BELLO, G.; FREVERT, C. W.; MARTIN, T. R. Animal models of acute lung injury. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 295, n. 3, p. L379-L399, 2008.

MENEZES, J. C.; DIEDERICH, M. Translational role of natural coumarins and their derivatives as anticancer agents. **Future Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 9, p. 1057–1082, maio 2019.

MENTZ, L.A., LUTZEMBERGER, L.C., SCHENKEL, E.P.,. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: Notas sobre a obra de D'Ávila. *Caderno de Farmácia* 13, 25-48, 1997.

MIRZAPOIAZOVA, T. *et al.* Suppression of endotoxin-induced inflammation by taxol. **The European Respiratory Journal**, v. 30, n. 3, p. 429–435, 1 set. 2007.

MOHR, E. T. B. *et al.* Evidence that the anti-inflammatory effect of Rubiadin-1-methyl ether has an immunomodulatory context. **Mediators of Inflammation**, v. 2019, 2019.

MORO, CA. Os visitantes e a implantação de trilhas interpretativas no parque nacional do iguaçu, Paraná, Brasil - Um estudo de caso. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção. Florianópolis, SC, 2003

NAYELI, M.-B. *et al.* Anti-inflammatory activity of coumarins isolated from *Tagetes lucida* Cav. **Natural Product Research**, v. 34, n. 22, p. 3244–3248, 1 nov. 2020.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 3, p. a006049, 2012.

NUNES, C. DOS R. *et al.* Plants as Sources of Anti-Inflammatory Agents. **Molecules**, v. 25, n. 16, p. 3726, 15 ago. 2020.

O'BRIEN, J. *et al.* Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421–5426, 2000.

OKAMOTO, T. *et al.* Activation of Human Neutrophil Procollagenase by Nitrogen Dioxide and Peroxynitrite: A Novel Mechanism for Procollagenase Activation Involving Nitric Oxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 342, n. 2, p. 261–274, jun. 1997.

OLIVEIRA, DIOGO DE. Arandu Nhembo'ea: cosmologia, agricultura e xamanismo entre os Guarani-Chiripá no litoral de Santa Catarina. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Filosofia e Ciências Humanas. Programa de Pós-Graduação em Antropologia social. Florianópolis, SC, 2011.

OLIVEIRA, G. *et al.* Anti-inflammatory effects of coumarins on a murine model of acute lung injury (ALI): a brief systematic review. **Advances in Traditional Medicine**, 30 set. 2023.

OMRI, S. *et al.* Propranolol Attenuates Proangiogenic Activity of Mononuclear Phagocytes: Implication in Choroidal Neovascularization. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 60, n. 14, p. 4632, 4 nov. 2019.

P. K. JAIN and H. JOSHI, "Coumarin: chemical and pharmacological profile," **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 6, p. 236–240, 2012.

PAPAYANNOPOULOS, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 2, p. 134-147, 2018.

PAWAR, D. S. *et al.* Synthesis and Evaluation of Cytotoxicity of Novel Coumarin Peptide Alcohol Derivatives. **Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 926–936, 10 set. 2021.

PAYA, M. *et al.* Superoxide scavenging activity in leukocytes and absence of cellular toxicity of a series of coumarins. **Biochemical Pharmacology**, v. 48, n. 3, p. 445–451, 3 ago. 1994.

PEREZ, MAF. Diterpenos de *Myrocarpus frondosus* Allemão : isolamento, determinação estrutural e atividade biológica. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, SP, 2005.

PORTER, J. A.; MONU, E. A. Evaluating the Antimicrobial Efficacy of White Mustard Essential Oil Alone and in Combination with Thymol and Carvacrol Against *Salmonella*. **Journal of Food Protection**, v. 82, n. 12, p. 2038–2043, 6 nov. 2019.

Princípio dos 3 R's | Comissão de Ética no Uso de Animais. Disponível em: <<https://ceua.ufes.br/principio-dos-3-rs>>. Acesso em 09 de abril de 2023

RAKSAT, A. *et al.* Cassane-type diterpenes from roots of *Pterolobium macropterum* and their anti-inflammatory activity. **Phytochemistry**, v. 196, p. 113074, 1 abr. 2022.

RANKIN, J. A. Biological mediators of acute inflammation. **AACN Advanced Critical Care**, v. 15, n. 1, p. 3-17, 2004.

RAO, T. S. *et al.* Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, v. 17, n. 6, p. 723–741, 1993.

REUTERSHAN, J. *et al.* Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 289, n. 5, p. L807-L815, 2005.

ROSALES, C. Neutrophil: a cell with many roles in inflammation or several cell types?. **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 113, 2018.

ROSSI, A. *et al.* The hallucinogenic diterpene salvinorin A inhibits leukotriene synthesis in experimental models of inflammation. **Pharmacological Research**, v. 106, p. 64–71, abr. 2016.

ROSSOL, M *et al.* LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. **Critical Reviews™ in Immunology**, v. 31, n. 5, 2011.

RUBINGER MMM, *et al.* Synthesis of 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -Dihydroxyvouacapan-17 $\beta$ -oic Acid Derivatives. Parte I: Hydroxamic acid and amide derivatives. **J Braz Chem Soc**, v. 2, n. 3, p 124-128. 1991

SARTORI, A.L.B., TOZZI, A.M.G.A., 2004. Revisão taxonômica de *Myrocarpus Allemão* (Leguminosae, Papilionoideae, Sophoreae). **Acta Bot. Bras.** v. 18, p. 521-535, 2004.

SEBAUGH, J. L. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. **Pharmaceutical statistics**, v. 10, n. 2, p. 128-134, 2011.

SHI, Y.; ZHOU, C.-H. Synthesis and evaluation of a class of new coumarin triazole derivatives as potential antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 3, p. 956–960, fev. 2011.

SIPAHI, E. Y.; ATALAY, F. Experimental models of acute lung injury. **Eurasian Journal of Pulmonology**, v. 16, p. 69-77, 2014.

SMYTH, T.; RAMACHANDRAN, V. N.; SMYTH, W. F. A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 5, p. 421–426, maio 2009.

SOMENSI, N. *et al.* Carvacrol suppresses LPS-induced pro-inflammatory activation in RAW 264.7 macrophages through ERK1/2 and NF- $\kappa$ B pathway. **International Immunopharmacology**, v. 75, p. 105743, out. 2019.

STEARN, W. T. Botanical Latin. **Taxon**, v. 14, n. 2, p. 74, fev. 1965.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current protocols in immunology**, v. 111, n. 1, p. A3. B. 1-A3. B. 3, 2015.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current protocols in immunology**, v. 21, n. 1, p. A. 3B. 1-A. 3B. 2, 2001.

SUGIMOTO, M. A. *et al.* Mediators of the resolution of the inflammatory response. **Trends in Immunology**, v. 40, n. 3, p. 212-227, 2019.

TECCHIO, C.; CASSATELLA, M. A. Neutrophil-derived chemokines on the road to immunity. **Seminars in Immunology**, v. 28, n. 2, p. 119–128, abr. 2016.

HE ANTITHROMBOTIC PROPERTIES OF COUMARIN DRUGS. *Annals of Internal Medicine*, v. 54, n. 1, p. 73, 1 jan. 1961.

THE ARDS DEFINITION TASK FORCE. Acute Respiratory Distress Syndrome. **JAMA**, v. 307, n. 23, 20 jun. 2012.

TUAN ANH, H. L. *et al.* Anti-inflammatory coumarins from *Paramignya trimera*. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1195–1201, 1 jan. 2017.

VANNINI, F.; KASHFI, K.; NATH, N. The dual role of iNOS in cancer. **Redox Biology**, v. 6, p. 334–343, 2015.

VENZON, L. *et al.* Essential oil of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) and geraniol, but not citral, promote gastric healing activity in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 98, p. 118–124, fev. 2018.

WATANABE, S. *et al.* The role of macrophages in the resolution of inflammation. **The Journal of clinical investigation**, v. 129, n. 7, p. 2619-2628, 2019.

XUE, Q. *et al.* Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, 29 nov. 2018.

YANG, Y. *et al.* The emerging role of Toll-like receptor 4 in myocardial inflammation. **Cell death & disease**, v. 7, n. 5, p. e2234-e2234, 2016.

YU, P.-J. *et al.* Praeruptorin D and E attenuate lipopolysaccharide/hydrochloric acid induced acute lung injury in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 710, n. 1-3, p. 39–48, 15 jun. 2013.

ZHU, T. *et al.* Andrographolide protects against LPS-induced acute lung injury by inactivation of NF- $\kappa$ B. **PloS One**, v. 8, n. 2, p. e56407, 2013.