

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

SIMONY DAVET MÜLLER

**ESTUDO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-
INFLAMATÓRIA DE *Cecropia glaziovii* SNETH. E *Cecropia
pachystachya* TRÉCUL**

DOUTORADO

FLORIANÓPOLIS
2016

Simony Davet Müller

**ESTUDO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-
INFLAMATÓRIA DE *Cecropia glaziovii* SNETH. E *Cecropia
pachystachya* TRÉCUL.**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto

Coorientador: Prof. Dra. Fabrícia Petronilho.

Florianópolis SC
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Müller, Simony Davet

Estudo das atividades antioxidante e anti-
Inflamatória de *Cecropia glaziovii* sneth. E
Cecropia pachystachya trécul / Simony Davet
Müller; orientador, Flávio Henrique
Reginatto; coorientadora, Fabícia Petronilho.
- Florianópolis, SC, 2016.
193 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde.
Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. C. glaziovi. 3. C.
pachystachya. 4. Atividade antioxidante. 5.
Atividade anti-inflamatória. I. Reginatto,

Flávio

Henrique. II. Petronilho, Fabícia. III.
Universidade Federal de Santa Catarina.

Programa

de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

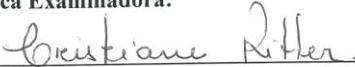
**“ESTUDO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E
ANTI-INFLAMATÓRIA DE Cecropia glaziovii
SNETH. E Cecropia pachystachya TRÉCUL.”**

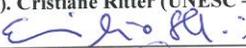
POR

Simony Davet Muller

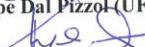
Tese julgada e aprovada em sua
forma final pelo(a) Orientador(a) e
membros da Banca Examinadora,
composta pelos Professores
Doutores:

Banca Examinadora:

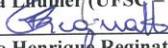

Prof(a). Dr(a). Cristiane Ritter (UNESC – Membro Titular)


Prof(a). Dr(a). Emilio Streck (UNESC – Membro Titular)


Prof(a). Dr(a). Felipe Dal Pizzol (UFSC – Membro Titular)


Prof(a). Dr(a). Angela Machado De Campos (UFSC – Membro Titular)


Prof(a). Dr(a). Cintia Lhuillier (UFSC – Membro Titular)


Prof(a). Dr(a). Flávio Henrique Reginatto (UFSC – Orientador)

Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 08 de julho de 2016.

Dedico este trabalho ao meu esposo José Luis e a nossa filha Júlia. Por todo o incentivo e amor que sempre me deram.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto, que sempre me direcionou e me “aguentou” durante toda esta trajetória desafiadora. Foram muitos acertos e erros inerentes as investigações, porém muito importantes para minha formação, sobretudo por sempre olhar nos meus olhos e com franqueza me direcionar. Obrigado pela paciência, orientação, dedicação e principalmente pela amizade. Foi uma grande honra fazer parte do seu grupo de pesquisa. Os ensinamentos aprendidos com o senhor serão lembrados e aproveitados durante toda minha vida profissional.

À minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Fabrícia Petronilho que abriu as portas de seu laboratório e permitiu que grande parte do trabalho fosse realizado lá com sua equipe eficiente e amiga. Obrigada pelos ensinamentos, pelos momentos de descontração, pela amizade sincera e por fazer parte da família FICEXP/UNISUL;

Ao Prof. Dr Eloir Paulo Shenkel, que me recebeu prontamente no Programa de Pós-Graduação em Farmácia e me direcionou ao meu orientador Dr Flávio;

À Luci, Drielly, Andrielli, Monique, amigas maravilhosas, companheiras de trabalho no laboratório, a ajuda de vocês foi imprescindível neste trabalho! Adoro vocês e estarei sempre à disposição para ajudá-las!

À Carol, que além de companheira de trabalho no laboratório foi e é também uma amiga querida fora dele, sempre me ajudando quando não pude estar presente em Florianópolis, me dando auxílio e atenção;

À Larissa, amiga querida atenciosa que me auxiliou muito na interpretação dos resultados e me fez entender muitas coisas, que abrangem um doutorado;

Ao Vitor e ao Carlos, amigos queridos e sempre atenciosos!

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo carinho, atenção e compartilharem seus conhecimentos. Em especial aquela que foi minha orientadora do mestrado: Maique!

A todos os meus amigos que adquiri ao longo dos anos em que vivi em Florianópolis;

Ao meu esposo José Luis, por todo carinho, cumplicidade, apoio, dedicação e principalmente paciência. Te amo! Sou muito feliz ao seu lado, junto com nossa filha, a maravilhosa Júlia!

*"Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos."
(Fernando Pessoa).*

RESUMO

O gênero *Cecropia* (Urticaceae) é composto por cerca de 60 espécies, sendo *C. glaziovii* Sneth e *C. pachystachya* Trécul. consideradas as de maior ocorrência na região Sul e Sudeste do país, em especial na zona da Mata Atlântica. Conhecidas popularmente como ‘embaúba’ e amplamente utilizadas na medicina popular para o tratamento da tosse, asma, bronquite, pressão alta, inflamação e problemas cardíacos. Na composição química destas duas espécies citadas, são descritos compostos fenólicos, como ácido clorogênico e os flavonoides C-glicosilados isoorientina, orientina e isovitexina. O objetivo do estudo foi avaliar as atividades antioxidante (*in vitro*) e anti-inflamatória através do modelo da pleurisia induzida por carragenina em animais, dos extratos aquosos (EA) e suas frações enriquecidas em flavonoides C-glicosídeos (FEF) de *C. pachystachya* e *C. glaziovii*. Folhas secas e moídas de ambas as espécies foram extraídas por infusão para obtenção dos extratos aquosos de *C. glaziovii* (EA-Cg) e *C. pachystachya* (EA-Cp). A partir dos EA foram obtidas suas frações enriquecidas em flavonoides C-glicosídeos (FEF-Cg) e (FEF-Cp), respectivamente. Extratos e frações foram caracterizados qualitativamente e quantitativamente por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE/DAD). Para a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* foi utilizado o ensaio TBARS (Substâncias Reativas ao ácido Tiobarbitúrico) com adição de três geradores: AAPH (2,2'-azobis (2-amidino-propano) dicloreto), FeSO₄ (sulfato ferroso) e H₂O₂ (peróxido de hidrogênio). A atividade anti-inflamatória foi investigada empregando o modelo da pleurisia induzida pela carragenina em ratos, avaliando-se a migração de leucócitos. Além disso, técnicas padronizadas na literatura foram empregadas, com o intuito de verificar os efeitos das amostras de *C. glaziovii* e *C. pachystachya* sobre as concentrações dos metabólitos do óxido nítrico (NO), níveis de lactato desidrogenase (LDH) bem como os níveis das interleucinas IL-1 β e IL-6 e do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) no exsudato pleural dos ratos. A atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO), grupos de proteínas carbolinadas, grupos de proteínas sulfidrilas e TBARS foram avaliados no tecido pulmonar dos animais. Os EA-Cg, EA-Cp e suas frações FEF-Cg e FEF-Cp, demonstraram proteção ao dano lipídico frente aos três geradores de radicais livres utilizados. No modelo da pleurisia, animais tratados com EA-Cg, EA-Cp e FEF-Cp, inibiram a migração leucocitária para a cavidade pleural, os níveis de proteínas, a atividade da LDH, as concentrações de NO, IL-1 β e IL-6,

TNF- α e os parâmetros associados ao dano oxidativo induzido pela carragenina ($P < 0,05$). Os resultados do presente estudo demonstraram que os extratos e frações de *C. glaziovii* e *C. pachystachya* possuem atividades anti-inflamatória e antioxidante, atividades estas, relacionadas a presença de isoorientina, isovitexina e ácido clorogênico como os componentes principais em ambas as espécies.

Palavras chaves: *C. glaziovii*. *C. pachystachya*. Atividade antioxidante. Atividade anti-inflamatória. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

The *Cecropia* genus (Urticaceae) consists of about 60 species, *C. glaziovii* Sneath and *C. pachystachya* Trécul. They are the most frequent in the South and Southeast of the country, especially in the area of the Atlantic Forest. Popularly known as 'embauba' and widely used in popular medicine for the treatment of cough, asthma, bronchitis, high blood pressure, inflammation, and heart disease. In the chemical composition of these two species mentioned, phenolic compounds are described, such as chlorogenic acid and flavonoid C-glycosides isoorientina, orientin and isovitexin. To evaluate the antioxidant activity (*in vitro*), anti-inflammatory through the pleurisy model induced by carrageenin of aqueous (CAE) and fractions enriched flavonoid C-glycosides (EFF) *C. pachystachya* and *C. glaziovii*. Dried leaves and ground of both species were extracted by infusion for obtaining aqueous extracts of *C. glaziovii* (CAE-Cg) and *C. pachystachya* (CAE-Cp). The CAE were obtained from their fractions enriched flavonoid C-glycosides (EFF-Cg) and (EFF-Cp), respectively. Extracts and fractions were characterized qualitatively and quantitatively by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector (HPLC/DAD). For the evaluation of the antioxidant activity (*in vitro*) test was used TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) with addition of three generators: AAPH (2,2'-azobis (2-amidino-propane) dichloride), FeSO₄ (ferrous sulfate) and H₂O₂ (hydrogen peroxide). The anti-inflammatory activity was investigated employing the pleurisy model of evaluating the migration of leukocytes. In order to verify the effects of *C. glaziovii* samples were evaluated and *C. pachystachya* concentrations of nitric oxide metabolites (NO) levels of lactate dehydrogenase (LDH) as well as the interleukins IL-1 β and IL-6, factor α -tumor necrosis factor (TNF- α) into the pleural exudate of rats. The enzymatic activity of the myeloperoxidase (MPO), carbolinas groups of proteins, protein sulfhydryl groups and TBARS were assessed in lung tissue of animals. Results: CAE-Cg, CAE-Cp and its fractions EFF-Cg and EFF-Cp demonstrated the protective lipid damage to the three front free radical generators used. In the model of pleurisy, the animals treated with CAE-Cg, CAE-Cp and EFF-CP, inhibited leukocyte migration into the pleural cavity, protein levels, activity of LDH, NO concentrations, IL-1 β and IL-6, TNF- α and the parameters associated with oxidative damage induced by carrageenan (P <0.05). Conclusion: The results of this study showed that extracts and fractions de *C. glaziovii* *C. pachystachya* have anti-inflammatory and antioxidant activities, activities related to the

presence of isoorientin, isovitexin and chlorogenic acid as the main components in both species.

Key words: *C. glaziovii*. *C. pachystachya*. Antioxidant activity. Anti-inflammatory activity. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Espécies de <i>Cecropia</i> predominantes na Mata Atlântica conhecidas popularmente como ‘embaúba’. Esquerda: <i>C. glaziovii</i> (embaúba vermelha), Direita: <i>C. pachystachya</i> (embaúba prateada)....	36
Figura 2 – Estruturas químicas de compostos fenólicos encontrados com maior frequência em <i>C. glaziovii</i> e <i>C. pachystachya</i>	38
Figura 3 – Sistema antioxidante enzimático: Enzimas envolvidas na geração e na inativação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e as consequências do desequilíbrio das EROs.	54
Figura 4 – Representação esquemática de aldeídos α , β -insaturados induzindo a inflamação.	57
Figura 5 – Exemplos de compostos fenólicos presentes em vegetais ...	58
Figura 6 – Núcleo flavona (2-fenil-benzopirona).....	59
Figura 7 – Oxidação do grupo catecol através de metais	62
Figura 8 – Cromatograma do (a) extrato aquoso (EA-Cg) e (b) da fração metanólica (FEF-Cg) das folhas de <i>C. glaziovii</i>	67
Figura 9 – Cromatograma do (c) extrato aquoso (EA-Cp) e (d) da fração metanólica (FEFp) das folhas de <i>C. pachystachya</i>	68
Figura 10 – Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>C. glaziovii</i> (EA-Cg) na inibição da formação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando os geradores AAPH (A), FeSO ₄ (B) e H ₂ O ₂ (C). ..	70
Figura 11 – Efeito da fração enriquecida em flavonoides C-glicosídeos das folhas de <i>C. glaziovii</i> (FEF-Cg) na inibição da formação das TBARS utilizando os geradores AAPH (D), FeSO ₄ (E) e H ₂ O ₂ (F).	72
Figura 12 – Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>C. pachystachya</i> (EA-Cp) na inibição da formação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando os geradores AAPH (A), FeSO ₄ (B) e H ₂ O ₂ (C).	75
Figura 13 – Efeito da fração enriquecida em flavonoides C-glicosídeos das folhas de <i>C. pachystachya</i> (FEF-Cp) na Inibição da formação das TBARS utilizando os geradores AAPH (A), FeSO ₄ (B) e H ₂ O ₂ (C)....	77
Figura 14 – Produção de EROs pelo neutrófilo ativado.....	93
Figura 15 – Resumo gráfico do efeito anti-inflamatório e antioxidante das espécies <i>Cecropiaglaziovii</i> e <i>Cecropiapachystachya</i>	168

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Flavonoides descritos para <i>Cecropia sp.</i>	37
Quadro 2 – Atividades farmacológicas de extratos e compostos químicos isolados da espécie <i>C. glaziovii.</i>	42
Quadro 3 – Atividades farmacológicas de extratos e compostos químicos isolados da espécie <i>C. pachystachya</i>	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teores dos metabólitos secundários presentes nos EA e FEF de <i>C. glaziovii</i> e <i>C. pachystachya</i>	69
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH – (2,2' -azobis (2-amino-propano) dicloreto)
ANOVA – Análise de variância
ATP – Adenosina trifosfato
C₃-OH – Propanol
C₆H₈N₂O₂S – Sulfanilamida
CAT – Catalase
Cg – Carragenina
CGRP – Peptídeo ligado ao gene calcitonina
CCl₄ – Tetracloroeto de carbono
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE/DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodo
COX – Ciclooxigenase
DBCAs – Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais
DL50 – Dose letal para no mínimo 50% dos indivíduos testados
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DNTPH – Dinitrofenilhidrazina
DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DPPH – 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DTNB – 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico
EA – Extrato aquoso
EA-Cg – Extrato aquoso de *Cecropia glazivooi*
EA-Cp – Extrato aquoso de *Cecropia pachyschathya*
ECA – Enzima conversora de angiotensina
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERN – Espécie reativa de nitrogênio
ERO – Espécie reativa de oxigênio
Fe - Ferro
FeSO₄ – Sulfato ferroso
FrBuOH – Fração butanólica
FEF – Fração enriquecida em flavonoide
FEF-Cg – Fração enriquecida em flavonoide obtida de *C.glazivooi*
FEF-Cp – Fração enriquecida em flavonoide *C.pachystachya*
GPx – Glutathionperoxidase
GR – Glutathionredutase
GSH – Glutathiona
GSSG – Glutathiona oxidada
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HCl – Ácido clorídrico

HNO₂ – Ácido nitroso
HOCl – Ácido hipocloroso
HOO[•] – Radical hidroperóxido
HSV – Herpes vírus
IL – Interleucina
LDH – Lactato desidrogenase
LH – Ácido graxo poli-insaturado
LO[•] – Radical alcoxila
LOO[•] – Radical peroxila
LOOH – Hidroperóxido lipídico
LPO – Lipooxigenase
MDA – Malondialdeído
MPO – Mieloperoxidase
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaOH – Hidróxido de sódio
NF – Fator nuclear
NO – Óxido nítrico
NO₂ – Nitrito
NO₃ – Nitrato
O₂^{•-} – Ânion superóxido
¹O₂ – Oxigênio singlete
OH[•] – Radical hidroxila
ONOO – Nitrogênio peroxinitrito
PAF – Fator ativador de plaquetas
PAS – Pressão arterial sistólica
PBS – Solução salina tamponada com fosfato
PG – Prostaglandinas
p-JNK – Fosfo-Jun-amino-terminal kinase
PMN – Célula polimorfonucleada
SH – Grupo sulfidrila
SNC – Sistema nervoso central
SOD – Superóxido dismutase
TBA – Ácido tiobarbitúrico
TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF- β – Transformadora de fator de crescimento
TMP – Tetrametoxipropano
TNF- α – Fator de necrose tumoral
UV – Espectrofotômetro de ultravioleta
VCl₃ – Cloreto de vanádio

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	29
1 CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: O GÊNERO <i>Cecropia sp.</i>, ASPECTOS ETNOBOTÂNICOS, QUÍMICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE <i>C. pachystachya</i> E <i>C. glaziovii</i>.....	35
1.1 O GÊNERO <i>Cecropia</i>	35
1.2 <i>Cecropia glaziovii</i> SNETH: ASPECTOS BOTÂNICOS, QUÍMICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS	38
1.2.1 Aspectos químicos.....	39
1.2.2 Atividades biológicas.....	39
1.2.2.1 Atividade anti-hipertensiva.....	40
1.2.2.2 Atividade ansiolítica e antidepressiva.....	40
1.2.2.3 Atividade antioxidante e hepatoprotetora	40
1.2.2.4 Atividade antiviral	41
1.2.2.5 Outras atividades farmacológicas	41
1.2.2.6 Toxicidade	42
1.3 <i>Cecropia pachystachya</i> TRÉCUL: ASPECTOS BOTÂNICOS, QUÍMICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS	43
1.3.1 Aspectos químicos.....	43
1.3.2 Atividades biológicas.....	44
1.3.2.1 Atividades anti-inflamatória e antioxidante.....	44
1.3.2.2 Atividades cardiovascular e no sistema nervoso central.....	45
1.3.2.3 Toxicidade	46
2 CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (<i>in vitro</i>) DOS EXTRATOS AQUOSOS E FRAÇÕES ENRIQUECIDAS EM FLAVONOÍDES C-GLICOSÍDEOS DE <i>C. pachystachya</i> E <i>C. glaziovii</i> NA FORMAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS).....	51
2.1 INTRODUÇÃO.....	51
2.1.1 Estresse oxidativo	51
2.1.2 Peroxidação lipídica	55
2.1.3 Compostos fenólicos como antioxidantes	57
2.1.3.1 Flavonoides, ação antioxidante e relação estrutura atividade	58
2.1.3.2 Atividade pró oxidante.....	61

2.2	OBJETIVO	62
2.3	MATERIAIS E MÉTODOS	63
2.3.1	Material vegetal.....	63
2.3.2	Processo extrativo e obtenção das frações enriquecidas das folhas de <i>C. glaziovii</i> e <i>C. pachystachya</i>	63
2.3.3	Análise do perfil químico das folhas de <i>C. glaziovii</i> e <i>C. pachystachya</i>	64
2.3.4	Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) <i>in vitro</i>	64
2.3.5.1	Fonte lipídica	65
2.3.5.2	Indutores de dano	65
2.3.5.3	Preparo das amostras.....	65
2.3.5.4	Procedimento	65
2.3.5.5	Curva padrão de TMP	66
2.3.5	Análise estatística	66
2.4	RESULTADOS	66
2.4.1	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/DAD) dos extratos das folhas (EA) e suas frações enriquecida em flavonoides C-glicosídeos (FEF) de <i>C. glaziovii</i> e <i>C. pachystachya</i> . Análise qualitativa e quantitativa	66
2.4.2	Determinação das TBARS <i>in vitro</i> , do extrato das folhas de <i>C. glaziovii</i> (EA-Cg) e sua fração enriquecida (FEF-Cg) em flavonoides	69
2.4.3	Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) <i>in vitro</i> , do extrato das folhas de <i>C. pachystachya</i> (EA-Cp) e sua fração enriquecida em flavonoides (FEF-Cp).....	74
2.5	DISCUSSÃO	79
2.6	CONCLUSÃO.....	84
3	CAPÍTULO 3. O PROCESSO INFLAMATÓRIO E O ESTRESSE OXIDATIVO: UMA BREVE REVISÃO	89
3.1	INTRODUÇÃO.....	89
3.1.1	O processo inflamatório e o estresse oxidativo	89
3.1.2	A Pleurisia.....	94
3.1.3	Atividade anti-inflamatória de flavonoides.....	95
4	CAPÍTULO 4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE <i>C. glaziovii</i> SNETH. (EMBAÚBA), UTILIZANDO-SE O MODELO	

DA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM RATOS	99
4.1 OBJETIVOS	99
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
4.3 PUBLICAÇÃO	99
5 CAPÍTULO 5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI- INFLAMATÓRIA DO EXTRATO AQUOSO E DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM FLAVONOÍDES C-GLICOSÍDEOS DAS FOLHAS DE <i>C. pachystachya</i> TRÉCUL (EMBAÚBA), UTILIZANDO-SE O MODELO DA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM RATOS.....	111
5.1 OBJETIVOS	111
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	111
5.3 PUBLICAÇÃO	111
6 DISCUSSÃO GERAL	161
7 CONCLUSÃO	167
REFERÊNCIAS	169
APÊNDICE	191
APÊNDICE A – Resumos apresentados em anais de congressos	193

APRESENTAÇÃO

A investigação de produtos naturais com finalidade terapêutica vem evoluindo consideravelmente, visando tanto a descoberta de modelos moleculares para a síntese de novos fármacos quanto a busca de preparações possíveis de serem utilizadas como fitoterápicos. (BAUER; BRÖNSTRUP, 2014). Em um levantamento realizado recentemente, foi demonstrado que entre os 877 protótipos novos introduzidos no mercado mundial como fármacos, de 1981 a 2014, 61% são substâncias naturais ou derivadas de produtos naturais ou, ainda, planejadas a partir deles. (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Dentre as várias espécies vegetais com atividade farmacológica conhecida, destacam-se algumas espécies de *Cecropia* (Urticaceae), gênero que possui cerca de 60 espécies descritas com ampla distribuição na América Latina. No Brasil, onde são conhecidas popularmente como embaúba, imbaúba ou umbaúba, as espécies deste gênero podem ser encontradas nas regiões Norte (Floresta Amazônica), Centro-Oeste, bem como no Sudeste e Sul (Mata Atlântica). (BERG; ROSSELLI, 2005; PIO CORRÊA, 1978).

A importância do gênero em países como o Brasil, México, Argentina e Paraguai não está relacionada somente na sua amplitude de distribuição, mas também pelos seus diversos usos na medicina popular. De maneira geral, espécies do gênero *Cecropia* são utilizadas popularmente para o tratamento de problemas respiratórios, como tosse, asma e bronquite, e também para pressão alta, diabetes, inflamações, além de serem empregadas como diurético e cardiotônico. Nessas preparações são utilizadas principalmente as folhas, além de cascas e brotos. (DI STASI; SEITO; HURUMA-LIMA, 2002; LORENZI; MATOS, 2008; PIO CORRÊA, 1978; SIMÕES et al., 1998).

No gênero *Cecropia*, apenas *C. glaziovii* Sneth. e *C. pachystachya* Trécul. são abundantes na região Sul do país, em especial na zona da Mata Atlântica (BERG; ROSSELLI, 2005). Embora estas espécies estejam entre as mais estudadas do gênero, os relatos sobre a composição química e ações farmacológicas são recentes. Estudos fitoquímicos realizados com estas duas espécies descrevem a presença de ácidos fenólicos, flavonoides C-glicosídeos, além de proantocianidinas como constituintes majoritários. (COSTA et al., 2011; LACAILLE-DUBOIS; FRANCK; WAGNER, 2001; ROCHA; LAPA; DE LIMA, 2002).

No que concerne aos estudos farmacológicos *in vivo* e *in vitro* das espécies do gênero *Cecropia* investigadas no presente trabalho foi

verificado para *Cecropia glaziovii* efeito anti-hipertensivo. (CYSNEIROS, 1996; LIMA-LANDMAN et al., 2007; NINAHUAMAN et al., 2007); inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) (LACAILLE-DUBOIS; FRANCK; WAGNER, 2001); efeito ansiolítico (ROCHA; LAPA; DE LIMA, 2002); efeito antidepressivo (ROCHA et al., 2007); efeito broncodilatador (DELARCINA JÚNIOR et al., 2007); antiulcera (SOUCCAR et al., 2008), anti-HSV-1 (SILVA et al., 2010) e efeito hepatoprotetor (PETRONILHO et al., 2012). Para *Cecropia pachystachya* foram detectadas atividades anti-inflamatória (HIKAWCZUK et al., 1998; SCHINELLA et al., 2008), antioxidante (DUQUE et al., 2016; GAZAL et al., 2015; VELÁZQUEZ et al., 2003), anti-hipertensiva (CONSOLINI; MIGLIORI, 2005), cardiotônica e sedativa (CONSOLINI et al., 2006), hipoglicemiante (ARAGÃO et al., 2010); antimalárica (UCHOA et al., 2009); leishmanicida (CRUZ et al., 2013); anti-inflamatória e antioxidante (PACHECO et al., 2014). Recentemente, foram demonstradas atividades antidepressiva (GAZAL et al., 2014; ORTMANN et al., 2016), prevenção de transtornos bipolares (GAZAL et al., 2015) e na cicatrização de feridas. (DUQUE et al., 2016).

Com base nos dados da literatura acima apresentados, para o presente trabalho foi estabelecido como objetivo principal avaliar as atividades antioxidante (*in vitro*) e anti-inflamatória (*in vivo*) dos extratos aquosos brutos (EA) e suas frações enriquecidas em flavonoides C-glicosídeos (FEF), das espécies *C. pachystachya* e *C. glaziovii*.

Dessa forma os objetivos específicos foram assim estabelecidos:

✓ Caracterizar e quantificar os compostos majoritários, por CLAE-DAD nos extratos aquosos brutos e suas frações enriquecidas em flavonoides C-glicosídeos de *C. pachystachya* e *C. glaziovii*;

✓ Investigar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos aquosos brutos e frações enriquecidas em flavonoides C-glicosídeos de *C. pachystachya* e *C. glaziovii* na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);

✓ Avaliar os efeitos anti-inflamatórios dos extratos aquosos brutos e frações enriquecidas em flavonoides C-glicosídeos de *C. pachystachya* e *C. glaziovii* sobre a migração dos leucócitos no exsudato pleural no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em ratos;

✓ Investigar os efeitos dos extratos aquosos brutos e frações enriquecidas em flavonoides C-glicosídeos sobre os níveis de proteínas totais, atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), sobre as concentrações dos metabólitos do óxido Nítrico (NOx), do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e das interleucinas IL-1 β e IL-6 no

exsudato pleural no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em ratos;

✓ Verificar o efeito dos extratos aquosos brutos e frações enriquecidas em flavonoides C-glicosídeos sobre o dano lipídico, sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e nos níveis dos grupos de proteínas carboniladas e sulfidrilas no tecido pulmonar no modelo da pleurisia.

Considerando os objetivos apresentados, o presente trabalho está organizado em cinco capítulos:

✓ O **primeiro capítulo** apresenta uma breve revisão da literatura sobre o gênero *Crecropia* sp., com foco principal nas espécies *C. glaziovii* e *C. pachystachya*, englobando tópicos sobre taxonomia, aspectos etnobotânicos, químicos e atividades biológicas;

✓ O **segundo capítulo** apresenta os resultados da caracterização química dos compostos majoritários dos extratos e suas frações enriquecidas em flavonoides C-glicosídeos através de CLAE/DAD e também os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante (*in vitro*) frente a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico dos respectivos extratos e suas frações de *C. glaziovii* e *C. pachystachya*;

✓ O **terceiro capítulo** apresenta uma breve revisão da literatura sobre o processo inflamatório e o estresse oxidativo;

✓ O **quarto capítulo** apresenta os dados referentes à atividade anti-inflamatória do extrato aquoso bruto da espécie *C. glaziovii* utilizando-se o modelo da pleurisia induzida pela carragenina em ratos;

✓ O **quinto capítulo** descreve os dados referentes à atividade anti-inflamatória do extrato aquoso bruto e sua fração enriquecida em flavonoides C-glicosídeos de *C. pachystachya* utilizando-se o modelo da pleurisia induzida pela carragenina em ratos.

Ao final, será apresentada a discussão geral dos resultados obtidos e as conclusões.

CAPÍTULO 1

1 CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: O GÊNERO *Cecropia* sp., ASPECTOS ETNOBOTÂNICOS, QUÍMICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *C. pachystachya* E *C. glaziovii*.

1.1 O GÊNERO *Cecropia*

O nome *Cecropia* tem origem grega, *cecrops* que significa “chamar”, “escoar”, referindo-se ao caule e aos ramos ocos das plantas deste gênero, utilizados na fabricação de instrumentos de sopro (DI STASI; SEITO; HURUMA-LIMA, 2002). No território Brasileiro ocorrem cerca de 60 espécies deste gênero sendo encontradas no Norte, principalmente na Floresta Amazônica, parte do Centro-Oeste e também nas regiões Sudeste e Sul (OLIVEIRA et al., 2000; PIO-CORRÊA, 1978;). Outro fato a ser destacado sobre as espécies de *Cecropia*, é que estas estão geralmente associadas com formigas do gênero *Azteca* em uma relação mutualística, em que as formigas habitam os compartimentos ocos dos caules e ramos e alimentam-se, principalmente, dos corpúsculos müllerianos – tricomas produtores de proteínas encontrados em determinadas espécies do gênero. (BERG, 1978; VIANNA-FILHO et al., 2005).

O gênero *Cecropia* foi inicialmente classificado por Berg (1978) como integrante da Família *Cecropiaceae* (ordem *Urticales*). Contudo, estudos apontaram uma nova classificação para o gênero *Cecropia* (SYTSMA et al., 2002) e a incluíram, novamente, na família *Urticaceae*.

O uso etnomedicinal das folhas é citado especialmente para o tratamento de problemas respiratórios, cardiovasculares e diabetes (DI STASI; SEITO; HURUMA-LIMA, 2002; SIMÕES et al., 1998). Apesar de seu amplo uso popular, a maior parte dos estudos químicos e farmacológicos descritos na literatura referem-se a *C. glaziovii*, *C. obtusifolia* e *C. lyratiloba*. (COSTA et al., 2011).

A **figura 1** apresenta as espécies *C. pachystachya* e *C. glaziovii*, objetos de estudos deste trabalho.

Figura 1 – Espécies de *Cecropia* predominantes na Mata Atlântica conhecidas popularmente como ‘embaúba’. Esquerda: *C. glaziovii* (embaúba vermelha), Direita: *C. pachystachya* (embaúba prateada)



Fonte: Lorenzi (1998).

Em relação a constituição química de *Cecropia sp.*, são relatados compostos pertencentes as classes dos terpenoides (ácido ursólico, oleanólico e pomólico) e seus derivados (GOMES, 2003; MACHADO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2000; PINHEIRO, 1999; RIBEIRO, 1999; UCHOA, 2004), mono e sesquiterpenos, ácidos graxos e esteroides (β -sitosterol) (GOMES, 2003; HIKAWCZUK et al., 1998; MACHADO et al., 2008; UCHOA et al., 2009), escopoletina e principalmente compostos fenólicos, como proantocianidinas (LACAILLE-DUBOIS; FRANCK; WAGNER, 2001), ácido clorogênico e flavonóides (HIKAWCZUK, et al., 1998; LACAILLE-DUBOIS; FRANCK; WAGNER, 2001; COSTA et al., 2011).

As proantocianidinas, catequina, epicatequina e procianidinas B2 e C1 foram relatadas para as espécies *C. glaziovii*, *C. hololeuca* e *C. pachystachya*. (LACAILLE-DUBOIS; FRANCK; WAGNER, 2001). Já as procianidinas B3 e B5 foram identificadas em *C. glaziovii* (TANAE et al., 2007) enquanto ácido clorogênico foi relatado para *C. glaziovii*, *C. hololeuca*, *C. pachystachya* e *C. peltada*. (ANDRADE-CETTO;

WIEDENFELD, 2001; LACAILLE-DUBOIS; FRANCK; WAGNER, 2001; NICASIO et al., 2005).

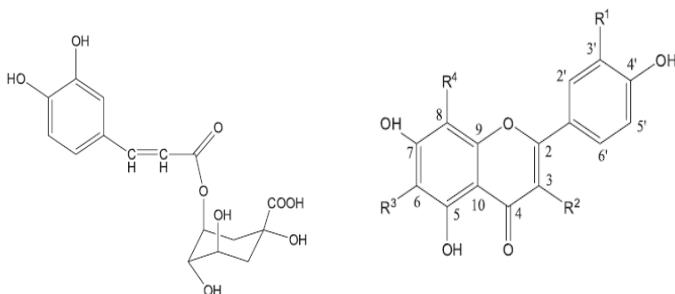
No **quadro 1** são apresentados os flavonoides descritos para espécies de *Cecropia sp.* A **figura 2** apresenta as estruturas destes compostos descritos para *C. glaziovii* e *C. pachystachya*.

Quadro 1 – Flavonoides descritos para *Cecropia sp.*

<i>Cecropia sp</i>	Parte da planta	Favonoides	Referências
<i>C. glaziovii</i>	Estípulas, Folhas	Isoquercitrina, orientina, isoorientina e isovitexina.	(LACAILLE-DUBOIS; FRANCK; WAGNER, 2001); (COSTA et al., 2011).
<i>C. pachystachya</i>	Folhas	Isoquercitrina, isoorientina e isovitexina.	(LACAILLE-DUBOIS; FRANCK; WAGNER, 2001) (ARAGÃO et al., 2010); (COSTA et al., 2011); (ARAGÃO, et al., 2013).
<i>C. hololeuca</i>	Folhas e cascas	Orientina, isoorientina.	(LACAILLE-DUBOIS; FRANCK; WAGNER, 2001).
<i>C. lyratiloba</i>	Folhas	Orientina, isoorientina e isovitexina e a C-glicosilflavona 6-C-galactosil-6''-O-β-galactopiranosila pigenina.	(ROCHA et al., 2007).
<i>C. obtusifolia</i>	Folhas	Isoorientina.	(ANDRADE-CETTO; WIEDENFELD, 2001)

Fonte: Adaptado de Costa et al. (2011).

Figura 2 – Estruturas químicas de compostos fenólicos encontrados com maior frequência em *C. glaziovii* e *C. pachystachya*.



Ácido clorogênico (1)

Flavonoides	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Isoorientina (2)	OH	H	GLU	H
Orientina (3)	OH	H	H	GLU
Isovitexina (4)	H	H	GLU	H
Isoquercetrina (5)	OH	<i>O</i> -GLU	H	H

Fonte: Adaptado de Costa et al. (2011).

1.2 *Cecropia glaziovii* SNETH: ASPECTOS BOTÂNICOS, QUÍMICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

C. glaziovii são árvores com altura de 8-16 metros, tronco ereto e cilíndrico, fistuloso e com formigas agressivas no seu interior, com casca lisa marcadas pelas cicatrizes dos pecíolos e folhas antigas. As folhas são alternas ou verticiladas simples, 7-11 lobadas, discolors e peltadas. Constituídas de infrutescências cilíndricas com muitos frutos de sabor adocicado quando maduros, esta espécie ocorre na mata pluvial da encosta Atlântica e na mata da planície costeira (LORENZI, 1998), podendo ser encontrada também na região norte, abrangendo a Floresta

Amazônica, e também nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul (BERG; ROSSELI, 2005; TANAE et al., 2007). Quanto ao uso popular, são encontrados relatos da utilização da planta para tratamento de doenças do coração, tosse, asma, bronquite, dispnéia, como agente diurético e antidiabético (PIO-CORRÊA, 1978).

1.2.1 Aspectos químicos

Sobre a constituição química de *C. glaziovii* se destacam flavonoides, procianidinas, ácidos fenólicos e catequinas como metabólitos majoritários presentes. A seguir, serão descritos de forma mais detalhada os dados químicos presentes na literatura para esta espécie.

O extrato metanólico de estípulas de *C. glaziovii* foi analisado por CLAE tendo sido identificados os compostos catequina, epicatequina e procianidinas B2 e C1. Já no extrato metanólico das folhas da mesma espécie foi verificada a presença do ácido clorogênico e também epicatequina e as procianidinas B2 e C1. Quanto à caracterização dos flavonoides, isorientina foi identificada como constituinte majoritário em ambos os extratos, enquanto isoquercitrina foi detectado apenas no extrato metanólico das estípulas (LACAILLE-DUBOIS; FRANCK; WAGNER, 2001).

Tanae et al. (2007), através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), identificaram em extratos aquosos das folhas de *C. glaziovii* ácido clorogênico, procianidinas B5, B6 e C1, orientina, isorientina e isovitexina. Os mesmos autores afirmam que 19% da concentração dos compostos identificados nestes extratos correspondem a flavonoides e 12% a catequinas.

Já Costa et al. (2011) desenvolveram e validaram método por CLAE/DAD para caracterização e quantificação simultânea dos compostos majoritários das folhas de *Cecropia* sp. Foram detectados para *C. glaziovii* ácido clorogênico, e os flavonoides C-glicosídeos isorientina, orientina, isovitexina e o flavonoide O-glicosilado isoquercitrina.

1.2.2 Atividades biológicas

Os estudos farmacológicos de *C. glaziovii* descrevem apenas estudos pré-clínicos para distintas atividades, as quais estão resumidas a seguir e sumarizadas no **Quadro 2**:

1.2.2.1 Atividade anti-hipertensiva

A atividade hipotensora do extrato aquoso das folhas foi avaliada por Cysneiros (1996). O extrato nas doses entre 0,15 a 0,50 g/kg (v.o) apresentou atividade hipotensora pelo relaxamento da musculatura lisa, sendo esta estimulada por mecanismos de bloqueio dos canais de cálcio tipo I e por ação em receptores adrenérgicos β -2.

Dez anos após, Lima-Landman et al. (2007), avaliaram a atividade hipotensora do extrato aquoso (0,5 g/Kg/dia) e da sua fração *n*-butanólica (0,1 g/Kg/dia) por via oral. A administração crônica dos extratos induziu hipotensão tanto em ratos normotensos quanto em hipertensos.

Neste mesmo ano, Ninahuaman et al. (2007) avaliaram a capacidade de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) do extrato aquoso padronizado das folhas. O estudo demonstrou que a administração do extrato (1,0 g/Kg) em dose única (v. o), não foi capaz de inibir a enzima. Contudo, a administração crônica (0,5 g/Kg) durante 60 dias reduziu a pressão arterial após 14 dias de tratamento.

1.2.2.2 Atividade ansiolítica e antidepressiva

A atividade tipo ansiolítica do extrato aquoso das folhas (0,25-1,0 g/kg) foi avaliada em ratos sob tratamento agudo e crônico. Os autores atribuíram o efeito ansiolítico detectado, aos flavonóides isoorientina e orientina presentes na fração butanólica, como possíveis responsáveis pela atividade no SNC. (ROCHA; LAPA; DE LIMA, 2002).

O extrato aquoso padronizado das folhas e a sua fração butanólica foram avaliados também no modelo nado forçado. O extrato aquoso e sua fração butanólica, apresentaram atividade tipo antidepressiva devido ao bloqueio da recaptção de monoaminas. Os autores atribuíram este efeito aos compostos catequina, procianidinas B3 e B2. (ROCHA et al., 2007).

1.2.2.3 Atividade antioxidante e hepatoprotetora

O extrato hidroetanólico de *C. glaziovii* (2, 20 e 200 μ L/mL) foi avaliado quanto a sua atividade antioxidante *in vitro*. O extrato foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica induzida por três geradores de radicais livres: H₂O₂, FeSO₄, AAPH em todas as concentrações avaliadas. Além disso, o efeito hepatoprotetor do extrato foi investigado através do ensaio de hepatotoxicidade induzida pelo tetracloreto de carbono (CCl₄).

O extrato (5, 20 e 40 mg/Kg) foi capaz de reduzir o dano hepático em ambas as doses testadas, sendo a dose de 20 mg/kg a mais efetiva. (PETRONILHO et al., 2012).

1.2.2.4 Atividade antiviral

A avaliação da atividade antiviral *in vitro* do extrato aquoso das folhas, fração butanólica e uma fração enriquecida em flavonoides C-glicosídeos (MeOH_{AMB}) foi realizada utilizando-se o ensaio de redução de placas de lise frente ao HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333). O extrato e a fração MeOH_{AMB}, rica em flavonoides C-glicosídeos, foram capazes de reduzir a infectividade viral do HSV-2, inibir a penetração dos vírus nas células e também gerar dano ao envelope proteico do HSV-1. (SILVA et al., 2010).

Adicionalmente, o extrato hidroetanólico das folhas apresentou efeito inibidor significativo na replicação do HSV-1 (cepa 29R – resistente a aciclovir) com uma EC₅₀ de 40 µg/mL e um índice de seletividade igual a 50. (PETRONILHO et al., 2012).

1.2.2.5 Outras atividades farmacológicas

Outros estudos ainda são relatados para *C. glaziovii* e descrevem as atividades brocodilatadora e inibitória da secreção de ácido gástrico para extrato hidroalcoólico padronizado e sua fração butanólica.

Os efeitos do extrato aquoso das folhas e sua fração butanólica foram avaliados (*in vivo*) em porcos da índia tratados com histamina para indução do broncoespasmo. O estudo demonstrou que após administração da fração butanólica, a resposta máxima à histamina foi reduzida em até 55%. No experimento *in vivo*, após a administração do extrato aquoso (1,0 g/kg, v.o) e da fração butanólica (0,1 g/kg, v.o), a concentração de histamina necessária para produzir broncoespasmo foi aumentada em cinco vezes para o extrato aquoso e em duas vezes para a fração butanólica. (DELARCINA JÚNIOR et al., 2007).

O extrato aquoso (0,5-2,0 g/kg, v.o) e a fração butanólica (0,05-0,50 g/kg v.o.) das folhas de *C. glaziovii* foram avaliados (*in vivo*) em modelos de inibição da secreção ácida, e de lesão aguda da mucosa gástrica. A administração de ambos os extratos produziu diminuição da secreção de ácido gástrico basal, efeito relacionado com a inibição da bomba de prótons. (SOUCCAR et al., 2008).

1.2.2.6 Toxicidade

A literatura relata dois estudos sobre a toxicidade do extrato de *C. glaziovii*. O extrato hidroalcoólico das folhas de *C. glaziovii* foi administrado diariamente a ratas grávidas 1,0 g/kg, sendo a DL₅₀ observada superior a 5,0 g/kg. Com base nestes resultados foi possível demonstrar que o extrato não afeta significativamente o desenvolvimento físico e comportamental dos animais, conferindo baixa toxicidade para a prole. (GERENUTTI et al., 2008).

Em outro estudo, o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. glaziovii* foi administrado em um período de 24 a 48 horas, nas doses de 300, 600 e 900 mg/Kg, em camundongos. Não foram observados óbitos nas doses testadas durante os dois períodos observados. (STANGE et al., 2009).

O **quadro 2** sumariza os dados da literatura encontrados para *C. glaziovii*.

Quadro 2 – Atividades farmacológicas de extratos e compostos químicos isolados da espécie *C. glaziovii*.

Atividade Farmacológica	Extrato/Fração	Referências
Anti-hipertensiva (<i>in vivo</i>)	Extrato aquoso Fração BuOH	(CYSNEIROS, 1996); (LIMA-LANDMAN et al., 2007).
Inibição da ECA (<i>in vitro</i>)	Extrato EtOH Extrato aquoso Extrato MeOH	(LACAILLE-DUBOIS; FRANCK; WAGNER, 2001); (NINAHUAMAN et al., 2007); (BRAGA et al., 2007).
Ansiolítica (<i>in vivo</i>)	Extrato aquoso Fração BuOH	(ROCHA; LAPA; DE LIMA, 2002).
Antidepressivo (<i>in vivo</i>) recaptação de monoamina (<i>in vitro</i>)	Extrato Fração BuOH Catequina Procianidina B2 Procianidina B3	(ROCHA et al., 2007).
Hepatoprotetora e antioxidante (<i>in vivo</i>)	Extrato EtOH	(PETRONILHO et al., 2012).

<i>vivo</i>)		
Antiviral HSV1 e HSV2 (<i>in vitro</i>)	Fração enriquecida com flavonoides C-glicosilados	(SILVA et al., 2010).
Antiviral HSV-1 (<i>in vitro</i>)	Extrato EtOH	(PETRONILHO et al., 2012).
Antiulcera e antissecretória de ácido gástrico (<i>in vivo</i>)	Extrato aquoso Fração BuOH	(SOUCCAR et al., 2008).
Broncodilatação (<i>in vivo</i>)	Extrato aquoso Fração BuOH	(DELARCINA JÚNIOR et al., 2007).

Fonte: Adaptado de Costa, Schenkel, Reginatto (2011).

1.3 *Cecropia pachystachya* TRÉCUL: ASPECTOS BOTÂNICOS, QUÍMICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Cecropia pachystachya é uma árvore dióica, de 4-7 metros de altura, com tronco de 15-20 centímetros de diâmetro. Possui folhas divididas de 9-10 lobos separados até o pecíolo por espaços de 2-3 centímetros, com a face superior um tanto áspera e a inferior níveo-tormentosa. (LORENZI; MATOS, 2002).

Conhecida popularmente pelos nomes de umbaúba, imbaúba, embaúva, umbaúba-do-brejo, árvore-da-preguiça, umbaubeira, pau-de-lixia, umbaúba branca, árvore-da-preguiça, embaúba prateada, entre outras (HIKAWCZUK et al., 1998), *C. pachystachya* é característica de solos úmidos, típica da borda de matas, clareiras grandes e de estradas. (HERNÁNDEZ-TERRONES et al., 2007).

Quanto ao uso popular, os autores Hernández-Terrones et al. (2007) relatam que a planta é utilizada no tratamento de diabetes, tosse, bronquite e como diurética. Existem relatos também de seu uso popular para o tratamento de micoses e hipercolesterolemia (CRUZ, 2008).

1.3.1 Aspectos químicos

Sobre a composição química de *C. pachystachya* são descritos esteroides, triterpenos, catequinas e flavonoides. Especificamente em relação aos compostos fenólicos, segue a descrição dos estudos químicos relatados na literatura sobre esta espécie.

O extrato metanólico das folhas foi submetido a fracionamento por cromatografia em coluna (Sephadex LH 20) utilizando-se como eluente acetato de etila/etanol/água (2:1:2). As frações obtidas foram analisadas por CLAE sendo caracterizados os compostos fenólicos: protocatequina, ácido clorogênico, catequina, epicatequina, isovitexina, isoquercitrina e isoorientina. (LACAILLE-DUBOIS; FRANCK; WAGNER, 2001). Também, nos estudos de Aragão et al. (2010) e Duque et al. (2016) foram identificados por CLAE/DAD, a presença dos flavonóides C-glicosídeos isoorientina, orientina e o ácido clorogênico.

Costa et al. (2011), desenvolveram e validaram método analítico por CLAE/DAD para caracterização química e quantificação simultânea dos compostos majoritários de extrato aquosos das folhas de *Cecropia* sp. Foram encontrados para espécie *C. pachystachya*: ácido clorogênico, isoorientina, orientina, isovitexina e isoquercitrina, sendo que a isoquercitrina apresentou-se em menor quantidade quando comparado a *C. glaziovii*.

1.3.2 Atividades biológicas

Os estudos farmacológicos encontrados, conforme já mencionado, descrevem apenas estudos pré-clínicos para diversas atividades sumarizadas no **Quadro 3**:

1.3.2.1 Atividades anti-inflamatória e antioxidante

O efeito anti-inflamatório do extrato diclorometano das folhas e do composto isolado ácido pomólico, foram avaliados empregando o modelo de edema de pata induzido por carragenina. Tanto o extrato como o composto isolado reduziram a inflamação, atividades relacionadas a inibição do apoptose das PMN (células polimorfas nucleares). (SCHINELLA et al., 2008).

A atividade anti-inflamatória do extrato metanólico de *C. pachystachya*, foi avaliada através do modelo edema de orelha induzido pelo óleo de cróton. A dose de 300 mg/Kg (via tópica, uma hora após a indução) foi capaz de inibir 85% do edema. (ARAGÃO et al., 2013).

O extrato metanólico de *C. pachystachya* foi avaliado *in vitro* através dos ensaios DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) apresentando uma considerável ação antioxidante. (PACHECO et al., 2014; VELÁZQUEZ et al., 2003). Adicionalmente, o extrato metanólico (0,1; 0,5 e 1 mg) foi avaliado *in vivo* quanto à atividade anti-inflamatória no modelo edema

de orelha induzido pelo óleo de cróton. Os autores concluíram que o extrato metanólico de *C. pachystachya* apresentou relevante efeito antiedematoso tóxico no modelo testado nas 3 doses. (PACHECO et al., 2014).

As atividades do extrato etanólico (0,5g/Kg/dia, v.o.) das folhas de *C. pachystachya*, foram avaliadas em ratos nefrectomizados, no tratamento da hipertensão, inflamação e doença renal progressiva. Os animais nefrectomizados desenvolveram albuminúria progressiva e aumento da PAS (pressão arterial sistólica) que foi menos intenso no grupo tratado com o extrato. No grupo tratado com o extrato, houve redução da PAS e na taxa de filtração glomerular. O tratamento atenuou também alterações histológicas, reduziu a expressão e a atividade da arginase renal, o número de macrófagos e a expressão da enzima p-JNK no córtex renal dos animais. (MAQUIAVELI et al., 2014).

Recentemente, gel contendo extrato acetato de etila das folhas de *C. pachystachya* foi avaliado *in vitro* através dos ensaios DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico); e *in vivo* na cicatrização de feridas. Os resultados apresentados demonstraram uma considerável ação antioxidante e cicatrizante. (DUQUE et al., 2016).

1.3.2.2 Atividades cardiovascular e no sistema nervoso central

Os extratos aquosos de folhas coletadas em diferentes regiões da Argentina foram avaliados quanto a atividade cardiotônica em órgão isolado (*ex vivo*) e quanto aos efeitos no SNC através do teste de campo aberto (*in vivo*). Os extratos das amostras coletadas na região neotropical (Misiones/Argentina) apresentaram atividade hipotensora superior quando comparada com a amostra coletada em uma região de clima temperado (Cordoba/Argentina). No teste do campo aberto, ambos os extratos diminuíram a locomoção espontânea e do comportamento exploratório dos animais nas doses entre 180 e 600 mg/kg, atividade relacionada a liberação do neurotransmissor dopamina induzida pelos extratos. (CONSOLINI et al., 2005).

As atividades antidepressiva e ansiolítica do extrato aquoso de *C. pachystachya* foram avaliadas *in vivo* através do modelo do estresse crônico e do teste do nado forçado. A administração do extrato aquoso (200 e 400 mg/Kg v.o) durante 14 dias promoveu efeito antidepressivo, mas não promoveu o efeito ansiogênico induzido pelo modelo do estresse crônico imprevisível. Os autores atribuem o efeito tipo antidepressivo aos compostos fenólicos majoritários da planta, os

flavonoides C-glicosídeos orientina e isovitexina, O-glicosídeo isoquercitrina e ácido clorogênico. (GAZAL et al., 2014).

Adicionalmente, o extrato aquoso das folhas de *C. pachystachya* foi avaliado *in vivo* quanto ao efeito neuroprotetor e antioxidante, através de um modelo de mania induzido pela cetamina em ratos. Os resultados demonstram que o pré-tratamento dos animais com extrato aquoso (200 e 400 mg/kg v.o, durante 14 dias) impediu os transtornos comportamentais como também os efeitos pró-oxidantes gerados pela cetamina. Os autores sugerem que *C. pachystachya* pode ser uma alternativa para intervenção preventiva em transtorno bipolar, reduzindo a recidiva e os danos oxidativos associados com a fase maníaca da doença. (GAZAL et al., 2015).

Outro estudo recente para esta planta, avaliou uma fração enriquecida em flavonoides a partir do extrato das folhas de *C. pachystachya*, quanto à atividade tipo-antidepressiva em animais submetidos ao protocolo de stresse crônico moderado. Os autores observaram que a fração enriquecida em flavonoides reverteu o comportamento tipo-depressivo e apresentou efeito neuroprotetor atuando no balanço oxidativo em diferentes regiões cerebrais avaliadas. (ORTMANN et al., 2016).

Adicionalmente às atividades apresentadas, foram encontrados outros trabalhos descrevendo atividades hipoglicemiantes Aragão et al. (2010), antimalárica Uchôa et al. (2009), anticociceptiva, citotóxica Aragão et al. (2013) e leishmanicida Cruz et al. (2013) para os extratos metanólicos, etanólicos padronizados e frações de *C. pachystachya*.

1.3.2.3 Toxicidade

Extratos aquosos das folhas de *C. pachystachya* foram administrados por via oral (0,75 g/Kg) durante 16 dias em camundongos. A saúde geral dos animais foi avaliada através do consumo de alimento, avaliação anatômica e histopatológica de órgãos (fígado, rins e pulmão) e contagem de células no lavado bronco alveolar. Para avaliação da ansiedade foi utilizado o teste labirinto em cruz elevado. Não foi observado nenhuma alteração durante o tratamento *in vivo* quando comparado com o grupo controle. Na avaliação *ex vivo*, foi observado aumento de peso significativo dos rins e fígado, embora não tenham sido detectadas alterações histológicas nos órgãos avaliados (BIGLIANI et al., 2010).

Uma compilação das informações acima descritas está apresentada no **Quadro 3**.

Quadro 3 – Atividades farmacológicas de extratos e compostos químicos isolados da espécie *C. pachystachya*

Atividade Farmacológica	Extrato/Fração	Referências
Antinflamatória (<i>in vivo</i>)	Extrato CH ₂ Cl ₂ , Ácido pomólico. Extrato MeOH; Extrato MeOH Extrato EtOH	(SHINELLA et al., 2008). (ARAGÃO et al., 2013). (PACHECO et al., 2014). (MAQUIAVELI et al., 2014).
Antioxidante (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)	Extrato MeOH Extrato MeOH Extrato MeOH Extrato H ₂ O Fração MeOH	(VELÁZQUEZ et al., 2003). (ARAGÃO et al., 2010). (PACHECO et al., 2014). (GAZAL et al., 2014). (GAZAL et al., 2015). ORTMANN et al., 2016).
Antioxidante e cicatrizante (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)	Extrato EtOH	(DUQUE et al., 2016).
Atividade leishmanicida (<i>in vitro</i>)	Fração Acetato, Orientina	(CRUZ et al., 2013).
Antimalárica (<i>in vivo</i>)	*Extrato EtOH β-sitosterol Ácido tormentico	(UCHÔA et al., 2009).
Antinociceptivo (<i>in vivo</i>)	Extrato MeOH	(ARAGÃO et al., 2013).
Antihipertensivo (<i>in vivo</i>) Cardiotônico (<i>ex vivo</i>) Sedativo (<i>in vivo</i>)	Extrato H ₂ O	(CONSOLINI; MIGLIORI, 2005). (CONSOLINI et al., 2006).

Fonte: Adaptado de Costa, Schenkel, Reginatto et al. (2011).

Parte utilizada: * Cascas

CAPÍTULO 2

2 CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (*in vitro*) DOS EXTRATOS AQUOSOS E FRAÇÕES ENRIQUECIDAS EM FLAVONOIDES C-GLICOSÍDEOS DE *C. pachystachya* E *C. glaziovii* NA FORMAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS).

2.1 INTRODUÇÃO

Nesse capítulo serão apresentadas contextualizações sobre estresse oxidativo, ação antioxidante e pró-oxidante de compostos fenólicos com ênfase nos flavonoides. Posteriormente, será descrita a caracterização química e a avaliação antioxidante (*in vitro*) dos extratos aquosos e das frações enriquecidas em flavonoides C-glicosídeos das espécies de *C. glaziovii* e *C. pachystachya*.

2.1.1 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo está relacionado com a origem de várias doenças, entre elas as pulmonares e câncer. (HALLIWELL, 2000; SCHOCK et al., 2001; SUN et al., 2015). Muita ênfase tem sido dada sobre a função do estresse oxidativo nas doenças crônicas, incluindo a doença de Alzheimer e as doenças pulmonares obstrutivas crônicas (DPOC), demonstrando a importância da pesquisa sobre o equilíbrio redox para o surgimento de novos fármacos. (SUN et al., 2015; WEIDINGER; KOZLOV, 2015).

Radical livre é um termo utilizado para designar qualquer átomo ou molécula contendo um ou mais elétrons não pareado nos orbitais externos, sendo considerados compostos altamente reativos, capazes de reagir com qualquer composto situado próximo a sua órbita externa passando a ter uma função oxidante ou redutora. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Nos sistemas biológicos os radicais livres são derivados de moléculas de oxigênio, nitrogênio e enxofre.

As terminologias espécie reativa de oxigênio (ERO), espécie reativa de nitrogênio (ERN) e espécie reativa de enxofre (ERS) incluem as espécies radicais livres e outras moléculas que não possuem elétrons desemparelhados (RIBEIRO et al., 2005). Dentre estas, destacam-se as espécies reativas como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroperoxila (HOO^{\bullet}), o radical hidroxila (OH^{\bullet}), o óxido nítrico (NO) e

outras como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e o peróxido nitrito (ONOO $\bar{}$).

O ânion $O_2^{\bullet-}$, como oxidante direto, é irrelevante, mas em meio aquoso ocorreu a reação de dismutação, resultando em uma molécula de H_2O_2 e uma molécula O_2 . O ânion $O_2^{\bullet-}$ participa de produção do radical OH \bullet , através da redução de quelatos de Fe (III), formando Fe^{+2} através das reações de Haber-Weiss e Fenton. (HALLIWELL, 2006).

Tendo importância vital para as células de defesa, apesar dos efeitos danosos, o $O_2^{\bullet-}$ é gerado *in vivo* pelos fagócitos ou linfócitos e fibroblastos durante o processo inflamatório, sendo um defensor do organismo contra infecções causadas por vírus, bactérias e fungos. É considerado um bactericida fraco, agindo através da inativação de proteínas ferro-sulfurosas das bactérias, porém gera produtos que possuem forte atividade antimicrobiana, tais como o HOCl, H_2O_2 e ONOO $\bar{}$ que são os principais responsáveis pelo combate a corpos estranhos. (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Já o radical OH \bullet é considerado um dos radicais mais reativos e juntamente com o ânion $O_2^{\bullet-}$, são caracterizados como radicais livres de oxigênio. O H_2O_2 , embora não seja um radical livre, é um produto reativo que, com a participação dos metais ferro e cobre e através da reação Haber-Weiss ou da reação de Fenton, pode servir como um importante precursor de radical OH \bullet . Este por sua vez pode oxidar qualquer molécula biológica. (HALLIWELL; ARUOMA, 1991; HALLIWELL, 2000).

A espécie reativa de nitrogênio (ERN) óxido nítrico (NO \bullet), pode ser produzida no organismo pela ação da enzima óxido nítrico sintetase a partir da arginina, do oxigênio, do NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Oxidase) e dos fagócitos. É encontrado em abundância nos sistemas biológicos, possui curta meia vida devido a sua rápida oxidação à nitrito e nitrato, gerando o ácido nitroso (HNO_2). Como exemplo de sua importância nos organismos está sua atuação nas bases do DNA, onde o HNO_2 promove a desaminação, formando a uracila, hipoxantina e xantina (VALKO et al., 2007).

O NO \bullet , não é suficientemente reativo para atacar o DNA diretamente, mas pode reagir com o $O_2^{\bullet-}$ produzido pelos fagócitos, gerando peroxinitrito (ONOO $\bar{}$). Este último pode, por sua vez, sofrer reações secundárias formando agentes capazes de nitrar aminoácidos aromáticos, como por exemplo a tirosina. Assim, é importante salientar que o efeito deletério do NO \bullet , depende da concentração em que está presente e da interação com outras espécies reativas. (SEN; CHAKRABORTY, 2011; VALKO et al., 2007). Apresenta propriedades

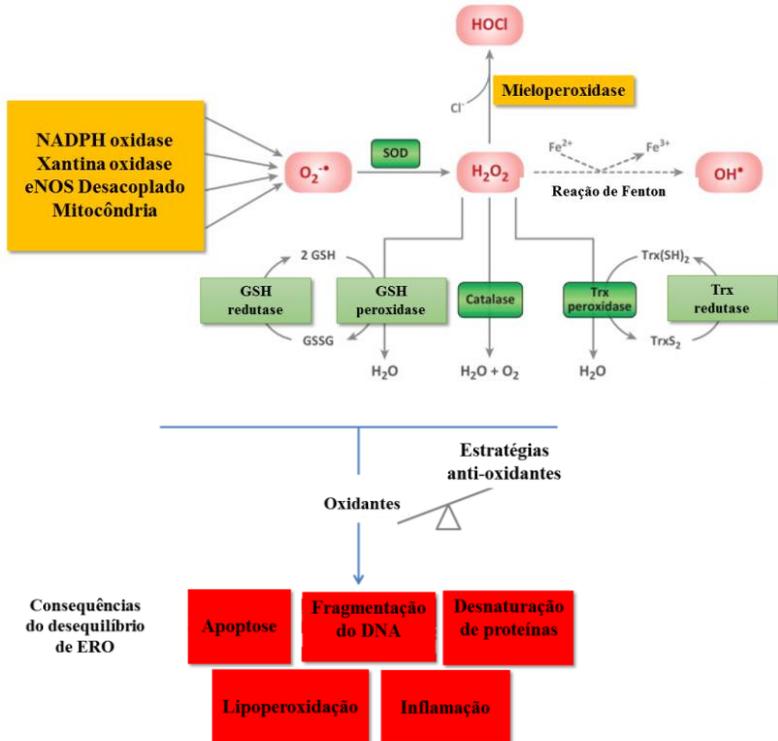
semelhantes às do radical OH^\bullet , espécie responsável por ocasionar danos a inúmeras moléculas biológicas, dentre as quais os lipídios, os grupos sulfidrilas (S-H) das proteínas e estimular a formação de OH^\bullet , independente da presença de metais de transição (VASCONCELOS et al., 2007).

A maior parte da produção das EROs, tem origem na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, especialmente a partir dos complexos I e III. As mitocôndrias desempenham um papel chave no metabolismo celular aeróbio, sendo a principal fonte formadora de ERO. A geração também ocorre nas membranas celulares e citoplasma, sendo que estes mecanismos podem ser favorecidos pelos íons cobre e ferro (HOLZEROVÁ; PROKISCH, 2015).

Através de um sistema enzimático intracelular, as células normalmente possuem capacidade de se defender do dano causado pelas EROs, mantendo a homeostase destas espécies em níveis baixos. No entanto, durante o estresse e disfunção celular, os níveis de EROs podem elevar-se drasticamente e causar dano celular significativo. (HOLZEROVÁ; PROKISCH, 2015).

Os organismos com o objetivo de prevenir ou reduzir o dano oxidativo causado pelas EROs, desenvolveram sistemas de defesas antioxidantes para a prevenção de várias doenças, que incluem a quelação de minerais, atividade *scavenger* dos radicais livres e atividade enzimática para neutralizar estes radicais depois de serem formados. Entre estas defesas endógenas estão as enzimas catalase (CAT), glutationa-peroxidase (GPx) e superóxido-dismutase (SOD) favorecendo a diminuição da concentração da maioria dos oxidantes nocivos e consideradas a primeira linha de defesa (**Figura 03**). Adicionalmente, numa segunda linha de defesa estão os sistemas não enzimáticos, tais como glutationa, ubiquinol, ácido úrico e a transferrina que são moléculas provenientes do metabolismo normal. (LI; HORKE; FÖRSTERMANN, 2013). Outras são exógenas sendo as mais conhecidas as vitaminas C, E, carotenoides e os compostos fenólicos. (CHEN, et al., 2004; HALLIWELL, 1995).

Figura 3 – Sistema antioxidante enzimático: Enzimas envolvidas na geração e na inativação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e as consequências do desequilíbrio das EROs.



Fonte: adaptado de Li, Horke, Förstermann (2013), Shirley, Ord, Work (2014). O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pode ser produzido através da NADPH-oxidase, xantina oxidase, desacoplando a óxido nítrico sintase (eNOS), e a liberação de oxigênio ativado das mitocôndrias durante a respiração oxidativa. O $O_2^{\bullet-}$ pode ser convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 pode sofrer conversão espontânea em radical hidroxila (OH^{\bullet}) através da reação de Fenton. O OH^{\bullet} é extremamente reativo a ataque aos componentes celulares. O H_2O_2 pode ser detoxificado através de glutatona peroxidase (GSH), catalase ou tioredoxina peroxidase (Trx) para H_2O e O_2 . A mieloperoxidase (MPO) pode utilizar H_2O_2 para oxidar o cloreto de ácido hipocloroso, forte agente oxidante (HOCl). O HOCl pode clorar e, assim, inativar várias biomoléculas, incluindo lipoproteínas e o eNOS substrato L-arginina.

2.1.2 Peroxidação lipídica

Ao longo das últimas quatro décadas, um extenso campo de literatura sobre a peroxidação lipídica tem mostrado seu importante papel na biologia celular e na saúde humana. Desde o início da década de 1970, o total de artigos de pesquisa publicados sobre o tema da peroxidação lipídica foi 98 (1970-1974), aumentando quase 135 vezes, com 13.165 artigos publicados (2010-2013) nos últimos anos. (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014).

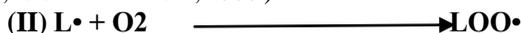
No processo da peroxidação lipídica ocorre uma cascata de reações bioquímicas resultantes da ação das EROs com os lipídios insaturados das membranas celulares levando à alteração da sua estrutura e a transtornos da permeabilidade, tais como alteração do fluxo iônico, fator que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saídas de nutrientes e substâncias tóxicas das células, inativação dos mecanismos de trocas metabólicas, liberação dos conteúdos das organelas, formação de produtos citotóxicos, como o malondialdeído e dienos conjugados, e alterações no DNA levando à morte celular. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A descrição dos mecanismos da peroxidação não enzimática que envolve a participação de ERO, nitrogênio e metais de transição ocorrem em três fases: iniciação, propagação e terminação.

Iniciação: A peroxidação lipídica inicia com o sequestro do hidrogênio do ácido graxo poli-insaturado (LH) da membrana lipídica. Este sequestro pode ser realizado tanto através do radical alcóxila (LO•), quanto do radical hidroxila (OH•), seguido da formação do radical lipídico (L•) e H₂O (I). O radical OH• é reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante desse processo. Este radical formado é estabilizado por um rearranjo molecular formando um dieno conjugado. (HALLIWELL; CLEMENT; LONG, 2000).



Propagação: Em meio aeróbio, o radical alcóxila inicialmente formado se combina com o O₂ formando o radical peróxila (LOO•) (II). Este radical pode abstrair um hidrogênio alélico de um outro ácido graxo (LH), gerando um novo radical de carbono (L•) e promovendo a etapa de propagação. A reação do radical peróxila com o átomo de hidrogênio abstraído gera um hidroperóxido lipídico. (LOOH) (III). (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

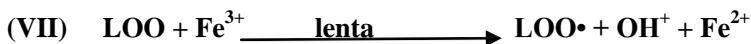




Terminação: A terceira e última etapa da reação, dá-se pela aniquilação dos radicais formados originando produtos não radicalares. Os radicais peroxila e alcoxila também pode sofrer dismutação ou clivagem formando aldeídos; formar uma ligação covalente com resíduos de aminoácidos ou sofrer um rearranjo formando produtos secundários da LPO (derivados hidroxil-, ceto-, cetohidroxil- e epoxi-hidroxil-ácido graxo). Entre estes compostos não radicalares formados está o principal deles que é o malondialdeído, considerado extremamente tóxico. (LIMA; SAES; ABDALLA, 2001).



Em uma outra hipótese, a peroxidação lipídica pode ser catalisada por íons ferro via conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais extremamente reativos tais como peroxila (LOO•) e alcoxila (LO•), os quais dão início a uma nova cadeia de reações, que podem ser lentas ou rápidas, dependendo da valência do ferro (VI e VII). (SILVA; CERCHIARO; HONÓRIO, 2011).



Ressalta-se que aldeídos α,β -insaturados derivados da peroxidação lipídica, tem demonstrado que estas substâncias não radicalares desempenham um papel fisiopatológico importante em diversas doenças. A partir de fontes exógenas e/ou endógenas, são consideradas moléculas eletrofílicas altamente reativas, capazes de modificar proteínas e DNA resultando em toxicidade. Além disso, aldeídos α,β -insaturados podem agir como indutores da inativação de enzimas antioxidantes como a GPx, ativando a via de sinalização de NF- κ B e por conseguinte a estimulação da resposta inflamatória através da ativação das vias de sinalização pró-inflamatórias potencializando o dano oxidativo. (ESTERBAUER, SCHAUR; ZOLLNER, 1991; LEE; PARK, 2013). (**Figura 04**).

Figura 4 – Representação esquemática de aldeídos α , β -insaturados induzindo a inflamação.



Fonte: Adaptado de Lee, Park, (2013).

Aldeídos α , β -insaturados reagem direta ou indiretamente, com vários genes e fatores de transcrição induzem o estresse oxidativo que pode desempenhar um importante papel em doenças inflamatórias.

2.1.3 Compostos fenólicos como antioxidantes

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é uma das suas características mais investigadas, sendo que um amplo espectro de atividades biológicas destes compostos têm sido relatados. (RICE-EVANS, 2001).

Especificamente para os flavonoides inúmeros estudos são encontrados na literatura sobre suas variadas ações biológicas, entre elas a atividade antioxidante. (HARBORNE; WILLIAMS, 2000; RICE-EVANS, 2001; LITVINOV, 2007; NIJVELDT, 2001; SANDHAR et al., 2011). A atividade antioxidante dos flavonoides depende de sua estrutura e pode ser determinada por vários fatores, entre eles: inibição da atividade de enzimas, ação quelante de íons metálicos envolvidos no

processo de geração de ERO, eliminação de ERO e ação sinérgica com outros antioxidantes. (BARREIRO; FRAGA, 2001; HALLIWELL; RAFTER; JENNER, 2005).

Na sequência será apresentada uma breve descrição sobre flavonoides, ação antioxidante e relação estrutura-atividade destes compostos.

Figura 5 – Exemplos de compostos fenólicos presentes em vegetais

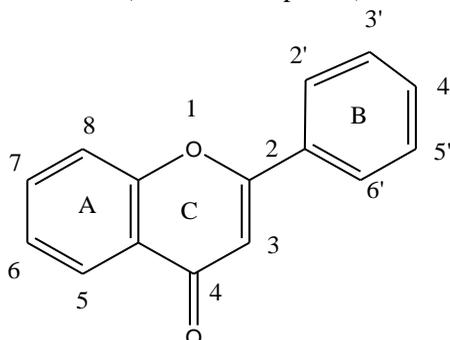


Fonte: Adaptado de Karacaya (2004).

2.1.3.1 Flavonoides, ação antioxidante e relação estrutura atividade

A maioria dos representantes desta classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental distribuído em três anéis, com distribuição do tipo $C_6C_3C_6$ e identificados como anéis A, C e B. O sistema de numeração tem início no heteroátomo de oxigênio e seguindo até os carbonos da estrutura da benzopirona e formando assim a estrutura base da flavona (2-fenil-benzopirona). (HARBORNE, WILLIAMS, 2000; TALHI; SILVA, 2012) (**Figura 06**).

Figura 6 – Núcleo flavona (2-fenil-benzopirona)



Fonte: Talhi, Silva (2012).

Estes compostos têm origem biosintética mista, sendo o anel A formado “via acetato” e os anéis B e C sintetizados via “xiquimato”. Como consequência, de substituição mais frequente é a hidroxilação alternada do anel A, nas posições 5 e 7, e a hidroxilação *para* no anel B, que pode ser do tipo 4'-OH, 3',4'-di-OH ou 3',4',5'-tri-OH. (BRUNETON, 1999).

Embora a biossíntese de flavonoides venha sendo um dos sistemas metabólicos mais intensivamente estudados. (CUNHA, 2010) a biossíntese para a classe dos flavonoides C-glicosídeos ainda não é totalmente clara. Estudos têm demonstrado que a glicosilação dos flavonoides ocorre por meio de enzima específica, chamada C-glicosiltransferase ou O-glicosiltransferase, originando os flavonoides C e O-glicosídeos, respectivamente. (HAMILTON et al., 2009).

Os flavonoides podem ser subdivididos em 9 grupos, com base na oxidação do anel heterocíclico C: chalconas, flavonas, flavonóis, flavanonas, di-hidroflavonóis, flavano-3,4-dióis, catequinas, antocianidinas e isoflavona. Estes compostos possuem particularidades que os diferenciam uns dos outros, principalmente quanto ao número e localização de grupos hidroxila, o que é crucial para suas propriedades farmacológicas. A maioria dos flavonoides contém um grupo hidroxila nas posições C-5 e C-7, no anel A, enquanto as diferenças de hidroxilação aparecem principalmente na unidade de fenilpropano, que normalmente tem uma estrutura de catecol em que o anel B, contém grupos OH nas posições 3' e 4'. (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

Novas propriedades bioativas importantes deste grupo de flavonoides têm sido relatados durante a última década, especialmente

pelo progresso na extração e isolamento dos flavonoides C-glicosídeos de diferentes espécies vegetais. (TALHI; SILVA, 2012). Trabalhos recentes têm revelado o enorme potencial dos flavonoides demonstrando suas propriedades antioxidantes, sendo estas propriedades relacionadas com a estrutura molecular destes compostos, conforme descritas na sequência. (GULCIN, 2012; HEIM, TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; LAGO et al., 2014; PRAVEENA et al., 2013; RICE-EVANS, MILLER; PAGANGA, 1996; SEKHER et al., 2001; TALHI; SILVA, 2012).

- Os grupos hidroxilas no anel B são doadores de elétrons para os radicais. O grupo orto-hidroxi (catecol) no anel C, exibe significativa capacidade de "scavenge" ERO e ERN, também garante estabilidade do radical fenoxila formado. Porém, a posição dos grupos hidroxilas no anel B tem papel na presença da atividade antioxidante, assim a posição *para* é essencial para esta ação e a presença de um segundo grupo hidroxila potencializa a ação;

- A presença de dissubstituição *o*-diidroxi no anel B e da dupla ligação C2-C3, conjugada ao grupo 4-oxo (C4) (como observado nas flavonas) é essencial à atividade antioxidante;

- Grupos hidroxilas em C-3 e em C-5 no anel A próximos ao grupo 4-oxo, geram efeitos máximos de eliminação de radicais livres;

- As propriedades antioxidantes são diminuídas pela presença de grupos metoxi na posição C-3 nos flavonoides, provavelmente como resultado de impedimento estérico;

- A glicosilação na posição C-3 diminui a capacidade antioxidante dos flavonoides. Agliconas são antioxidantes mais poderosos do que as suas formas ligadas glicosídicas. Além da presença e número de açúcares ligados a molécula, a sua posição e estrutura desempenham um papel importante na atividade antioxidante. (HEIM, TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002);

- A glicosilação na posição C-6 aumenta a atividade antioxidante em relação a glicosilação na posição C-1. Além disso, é descrito na literatura que o aumento na cadeia do açúcar ligante aumenta a atividade antioxidante de flavonoides glicosilados. (ZENG et al., 2013)

Assim, o sistema de ligações conjugadas e certos padrões de hidroxilação, como o C₃-OH, são considerados importantes para a atividade antioxidante, pois suprimem a geração de radicais livres, reduzindo os níveis de oxidação através da inibição da formação ou desativação das espécies precursoras de radicais livres. Apesar da

atividade antioxidante de flavonoides estar altamente relacionada a capacidade de doação de elétron, a atividade antioxidante não depende apenas da força de energia de ligação O-H, pois a estabilização das espécies formadas também deve ser considerada. (CAO; SOFIC; PRIOR, 1997).

Além de eliminação e/ou supressão de radicais, os polifenóis em geral são também conhecidos como agentes quelantes de metais. A quelação de metais de transição, tais como Fe^{2+} podem inibir diretamente a reação de Fenton, impedindo, assim, a oxidação causada por radicais hidroxila. (PERRON; BRUMAGHIM, 2009; PIETTA, 2000).

Os flavonoides também são considerados ligantes ideais de radicais peroxil, devido a seus potenciais de redução favoráveis a radicais alquil peroxil, o que os torna eficazes inibidores de peroxidação lipídica (GUO; HSIEH; HU, 2009; RICE-EVANS, MILLER; PAGANGA, 1996; RICE-EVANS, 2001).

2.1.3.2 Atividade pró oxidante

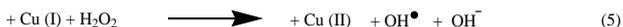
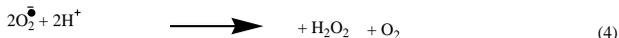
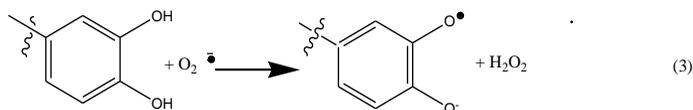
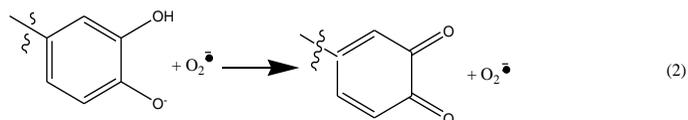
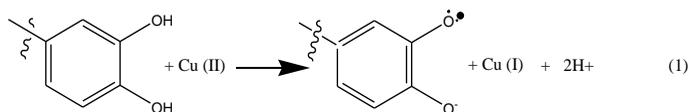
Em contraste com os benefícios que a atividade antioxidante exerce, os compostos fenólicos, mais especificamente alguns flavonoides têm demonstrado efeito mutagênico em ensaios biológicos *in vitro*. Tais efeitos estão relacionados com uma atividade pró-oxidante mais significativa do que a atividade antioxidante. (CAO; SOFIC; PRIOR, 1997).

Os flavonoides possuem potencial para atuarem como pró-oxidantes na presença de O_2 e em sistemas contendo altos níveis dos íons de metais de transição como ferro (Fe) e cobre (Cu) favorecendo a formação das EROs e radicais fenoxilas que podem danificar o DNA, lipídios e outras moléculas biológicas. (AREM et al., 2013; GALATI; O'BRIEN, 2004). (**Figura 7**).

A atividade pró-oxidante de flavonoides sobre diferentes sistemas biológicos, incluindo a mitocôndria, tem sido objeto de investigações. Este efeito depende da concentração do antioxidante, da fonte de ERO e da presença de metais de transição que podem ser fatores determinantes que afetam o equilíbrio entre as atividades antioxidante e pró-oxidante. (BOUAYED; BOHN, 2010). Neste contexto, enquanto as características estruturais que determinam a atividade antioxidante de flavonoides são bem estabelecidas pelos critérios de Rice-Evans. (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996), as características estruturais que

determinam a atividade pró-oxidante destes compostos, ainda carecem de estudos.

Figura 7 – Oxidação do grupo catecol através de metais




 Dano ao DNA

Fonte: Adaptado de Sakihama et al. (2002).

Íon Cu^{2+} , gerando uma semiquinona (reação 1); formação de $\text{O}_2^{\bullet -}$ (reação 2); regeneração da semiquinona e formação do H_2O_2 (3); H_2O_2 também pode ser formado pela dismutação de O_2 (reação 4); formação de OH^{\bullet} através da reação de Fenton (reação 5).

2.2 OBJETIVO

✓ Investigar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos aquosos e frações enriquecidas em flavonoides C-glicosídeos das espécies de *C. pachystachya* e *C. glaziovii* na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Material vegetal

Folhas de *Cecropia glaziovii* Sneth. foram coletadas no município de Florianópolis, Estado de Santa Catarina. Já as folhas de *C. pachystachya* Trécul. foram coletadas no município de Torres, Estado do Rio Grande do Sul. As exsiccatas estão depositadas no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina e catalogadas sob os registros FLOR 37143 (*Cecropia glaziovii* Sneth.) e Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul ICN 150025 (*Cecropia pachystachya* Trécul.).

Após a coleta, as folhas foram secas separadamente em estufa de ar circulante (35-40°C) durante sete dias, moídas em moinho de facas e posteriormente acondicionadas em recipiente fechado sob abrigo da luz até a realização do processo de extração.

2.3.2 Processo extrativo e obtenção das frações enriquecidas das folhas de *C. glaziovii* e *C. pachystachya*

Os extratos brutos aquosos de *C. glaziovii* (EA-Cg) e *C. pachystachya* (EA-Cp) foram obtidos por infusão, na proporção 1:10 (m/v), durante 30 minutos. Os extratos foram filtrados, o solvente eliminado em evaporador rotatório a 40°C e armazenado a -20°C até o momento da realização dos experimentos.

Os extratos aquosos brutos secos, (600 mL de cada) foram submetidos ao fracionamento para a obtenção das frações enriquecidas em flavonoides C-glicosídeos, através do seguinte procedimento: os extratos foram retomados com água, particionados com os solventes em ordem crescente de polaridade, acetato de etila (3 x de 200mL) e *n*-butanol (2 x de 200mL), que foram posteriormente eliminados em evaporador rotatório a 40 °C, obtendo-se as frações acetato de etila e butanólica. Posteriormente, a fração butanólica foi resolubilizada em água, tratada com resina de troca iônica Amberlite® XAD-16 na proporção de 1:10:100 (m/m/v) durante 30 minutos, sob agitação. Após filtração, os compostos adsorvidos na resina foram extraídos com metanol durante uma hora, o solvente orgânico eliminado em evaporador rotatório e as frações enriquecidas em flavonoides C-glicosídeos, identificadas, respectivamente, como FEF-Cg e FEF-Cp. (ORTMANN et al., 2016).

2.3.3 Análise do perfil químico das folhas de *C. glaziovii* e *C. pachystachya*

A análise do perfil químico qualitativo e quantitativo das espécies em estudo, foi realizada através de metodologia desenvolvida e validada por Costa et al. (2011), em CLAE/DAD.

Para as análises foi utilizado cromatógrafo Perkin Elmer Série 200 equipado com detector de arranjo de diodos, bomba quaternária, desgaseificador e autoamostrador. Os dados foram processados pelo software Chromera® (Version 3.2.0.4847).

Como fase estacionária foi utilizada uma coluna Brownlee® Choice C-18 (150 × 4,6 mm i.d.; 5µm) e a fase móvel consistiu em um gradiente de acetonitrila (A) e solução aquosa de ácido acético 1% (pH= 3) (B) nas seguintes condições: 0-30 minutos gradiente linear de A-B (5:95 v/v) para A-B (20:80 v/v); 30-40 minutos, isocrático A-B (20:80), com fluxo constante de 1,0 mL.min⁻¹. O volume de injeção foi de 10 µL. A fase móvel foi preparada diariamente e desgaseificada através de sonicação antes da utilização.

Os cromatogramas foram adquiridos no comprimento de onda de 340 nm enquanto os espectros de UV foram monitorados na faixa de 200 – 400nm. Os extratos aquosos brutos (EA-Cg e EA-Cp) e as frações enriquecidas (FEF-Cg e FEF-Cp) foram analisados nas concentrações de 1,0 mg.mL⁻¹ para todas as amostras.

Como amostras de referência foram utilizados padrões Sigma-Aldrich®. Para verificação do perfil quantitativo dos EA e FEF foram utilizados três marcadores: ácido clorogênico, isoorientina e isovitexina. Para isto, foram realizadas curvas de calibração nas faixas de 0,5-100 µg/mL para os flavonoides e 0,5-50 µg/mL para o ácido fenólico, com valores de coeficiente linear (r^2) acima de 0,99. Os teores foram expressos em miligramas do composto por grama de extrato (mg/g). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.3.4 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) *in vitro*

O TBARS é um método bastante empregado para analisar a capacidade de uma amostra em prevenir o dano a lipídios (peroxidação lipídica). Para avaliar e quantificar a presença desta propriedade nos extratos e frações enriquecidas de *C. glaziovii* e *C. pachystachya*, utilizou-se uma adaptação do método *in vitro* empregando gema de ovo

como fonte lipídica. (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991; PETRONILHO et al., 2012).

2.3.5.1 Fonte lipídica

A fonte lipídica foi obtida a partir de gema de ovo, e homogeneizada com 500 μL em tampão fosfato 1% (pH 7,4). À mistura foram adicionados 500 μL de ácido tricloroacético (10 %) e centrifugados a 1.200 rpm (10 min). A solução de lipídio foi preparada imediatamente antes ao uso e recebeu o nome de “substrato lipídico”.

2.3.5.2 Indutores de dano

Para verificar o comportamento dos extratos e suas frações enriquecidas frente à proteção contra peroxidação lipídica foram utilizados como indutores de radicais soluções de AAPH (2,2'-azobis (2-amidino-propano) dicloreto) (0,5 M); FeSO_4 (0,145 mM) ou H_2O_2 (0,4 M).

2.3.5.3 Preparo das amostras

Os extratos avaliados (EA-Cg e EA-Cp) e suas frações enriquecidas em flavonoides C-glicosídeos (FEF-Cg e FEF-Cp) foram solubilizados em água ultrapura nas concentrações 20, 200, 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 20 e 200 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente.

2.3.5.4 Procedimento

À matriz lipídica foram adicionadas os extratos e frações enriquecidas nas diferentes concentrações juntamente com soluções dos geradores de radicais livres: AAPH (2,2'-azobis (2-amidino-propano) dicloreto) (0,5M) ou FeSO_4 (0,145 mM) ou H_2O_2 (0,4 M) para a indução da peroxidação lipídica.

Os tubos foram mantidos a temperatura ambiente por 15 min e posteriormente foram adicionados 500 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA – 0,67%) seguido de aquecimento (100 °C) por 30 min. Os grupos controle foram preparados adicionando-se água purificada com ou sem gerador de radicais livres realizados simultaneamente aos grupos testes. As análises foram realizadas em espectrofotômetro a 532nm e os resultados expressos como o equivalente de malondialdeído formado em nmol (MDA).mL de substrato⁻¹.

2.3.5.5 Curva padrão de TMP

A quantificação das espécies reativas ao TBA foi realizada através de uma curva de tetrametoxipropano (TMP) construída entre 0,02 e 1,0 nmol ($R^2 = 0,9902$). Em diferentes alíquotas de TMP 2 mM foram adicionados volumes de água ultrapura q.s.p. para 500 μL e 500 μL de TBA 0,67 %. Os demais procedimentos foram realizados conforme descrito no item 2.3.5.3.

2.3.5 Análise estatística

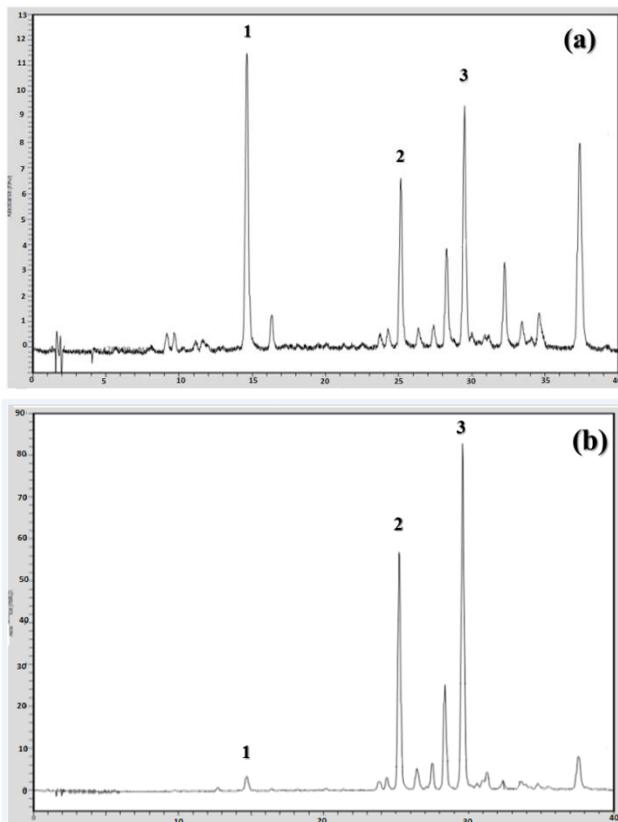
Os resultados foram expressos como média \pm DP e valores de p foram considerados significantes quando $p < 0,05$. Diferenças entre os grupos foram determinadas por ANOVA. A comparação entre as médias foi realizada utilizando o pós teste *Tukey*.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/DAD) dos extratos das folhas (EA) e suas frações enriquecida em flavonoides C-glicosídeos (FEF) de *C. glaziovii* e *C. pachystachya*. Análise qualitativa e quantitativa

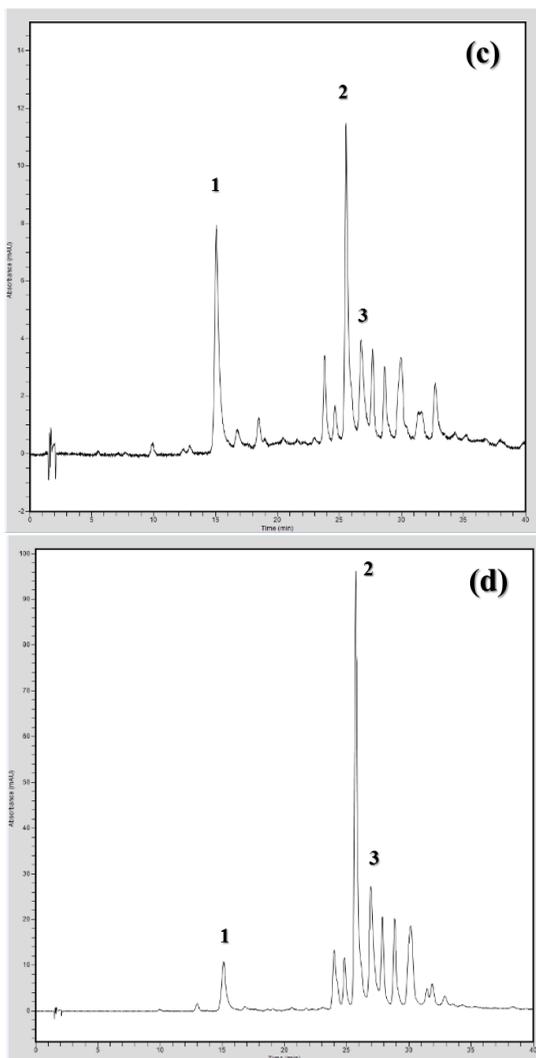
Após a preparação dos extratos e frações, os perfis cromatográficos das amostras foram avaliados por CLAE/DAD conforme descrito por Costa et al. (2011). Foram identificados os metabólitos majoritários nos extratos e em suas frações nas duas espécies estudadas pela técnica de co-injeção com padrão, tempo de retenção e espectro de UV nas amostras analisadas. Conforme demonstrado nos cromatogramas, é possível observar ácido clorogênico nos primeiros 20 min de análise, e os flavonoides C-glicosídeos isoorientina e isovitexina entre 20 e 30 min em ambas as espécies. (Figuras 8 e 9).

Figura 8 – Cromatograma do (a) extrato aquoso (EA-Cg) e (b) da fração metanólica (FEF-Cg) das folhas de *C. glaziovii*



EA-Cg (a) e FEF-Cg (b) (1,0 mg/mL) em $\lambda = 340$ nm (condições cromatográficas item 2.3.4) 1. Ácido clorogênico; 2. Isoorientina; 3. Isovitexina.

Figura 9 – Cromatograma do (c) extrato aquoso (EA-Cp) e (d) da fração metanólica (FEFp) das folhas de *C. pachystachya*



EA-Cp (c) e FEFp (d) (1,0 mg/mL) em $\lambda = 340$ nm (condições cromatográficas item 2.3.4) 1. Ácido clorogênico; 2. Isoorientina; 3. Isovitexina.

As análises quantitativas foram realizadas para o ácido clorogênico, isoorientina e isovitexina. A curva analítica para estes compostos foi construída em cinco concentrações diferentes. Os teores encontrados para o EA-Cg, FEF-Cg, EA-Cp e FEF-Cp estão demonstrados na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Teores dos metabólitos secundários presentes nos EA e FEF de *C. glaziovii* e *C. pachystachya*.

Composto	EA-Cg*	FEF-Cg*	EA-Cp*	FEF-Cp*
Ácido				
clorogênico	12,14 ± 0,66	9,38 ± 0,38	11,40 ± 1,0	12,21 ± 0,14
Isoorientina	6,4 0 ± 0,41	68,77 ± 048	10,03 ± 0,39	61,23 ± 0,65
Isovitexina	7,70 ± 0,33	86,88 ± 0,95	4,37 ± 0,34	20,11 ± 0,33

*Valores expressos em miligrama por grama de EA/FEF ± desvio padrão. Estas análises foram realizadas em triplicata.

2.4.2 Determinação das TBARS *in vitro*, do extrato das folhas de *C. glaziovii* (EA-Cg) e sua fração enriquecida (FEF-Cg) em flavonoides

Na segunda etapa deste trabalho foi realizada a determinação da inibição da peroxidação lipídica induzida por três diferentes geradores (AAPH, FeSO₄ e H₂O₂) dos extratos aquosos (EA-Cg e EA-Cp) e suas frações enriquecidas em flavonoides C-glicosídeos (FEF-Cg e FEF-Cp).

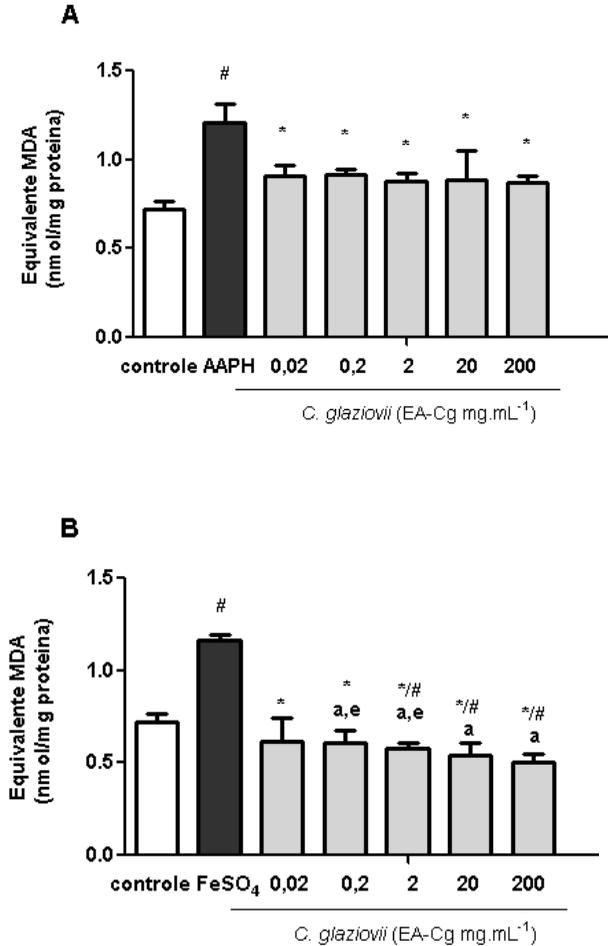
O EA-Cg (0,02; 0,2, 2, 20 e 200 mg.ml⁻¹) reduziu as concentrações de TBARS frente ao gerador AAPH em todas as concentrações avaliadas, quando comparado ao grupo controle (0,02 mg.ml⁻¹: 0,9 ± 0,06; 0,2 mg.ml⁻¹: 0,9 ± 0,06; 2 mg.ml⁻¹: 0,8 ± 0,05; 20 mg.ml⁻¹: 0,8 ± 0,16; 200 mg.ml⁻¹: 0,8 ± 0,03). Contudo, não foram observadas diferenças estatísticas entre as concentrações testadas (P < 0,05). (**Figura 10 A**).

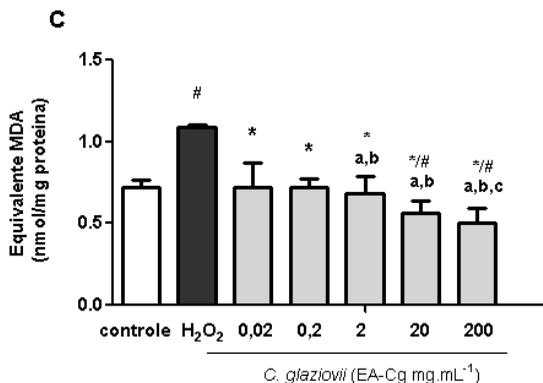
Frente ao gerador FeSO₄, o EA-Cg também demonstrou proteção ao dano lipídico em todas as concentrações avaliadas, quando comparado ao grupo controle. Porém, as concentrações de 20 e 200 mg.ml⁻¹, apresentaram maior proteção ao dano lipídico, quando estas concentrações foram comparadas às demais concentrações avaliadas (20 mg.ml⁻¹: 0,5 ± 0,06 e 200 mg.ml⁻¹: 0,5 ± 0,04). Não houveram diferenças significativas entre estas duas concentrações (**Figura 10 B**).

Já na avaliação com o gerador H₂O₂, os resultados mostraram que a efetividade do EA-Cg foi também detectada nas concentrações de 20 e

200 mg.mL⁻¹ (20 mg.mL⁻¹: 0,56 ± 0,07 e 200 mg.mL⁻¹: 0,5 ± 0,09) quando comparadas com o grupo controle. (**Figura 10 C**).

Figura 10 – Efeito do extrato aquoso das folhas de *C. glaziovii* (EA-Cg) na inibição da formação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando os geradores AAPH (A), FeSO₄ (B) e H₂O₂ (C).





Controle = grupo controle negativo (substrato lipídico), Gerador de ERO = grupo controle positivo (AAPH ou FeSO₄ ou H₂O₂). As colunas verticais representam média ± desvio padrão em relação os grupos controle^(#) ou gerador ERO^(*), respectivamente.

a = diferenças estatísticas em relação a concentração 0,02 mg.mL⁻¹

b = diferenças estatísticas em relação a concentração 0,2 mg.mL⁻¹

c = diferenças estatísticas em relação a concentração 2 mg.mL⁻¹

d = diferenças estatísticas em relação a concentração 20 mg.mL⁻¹

e = diferenças estatísticas em relação a concentração 200 mg.mL⁻¹

Diferenças significativas foram determinadas por ANOVA seguida do pós teste de Tukey com $p < 0,05$. N = 5 tubos.

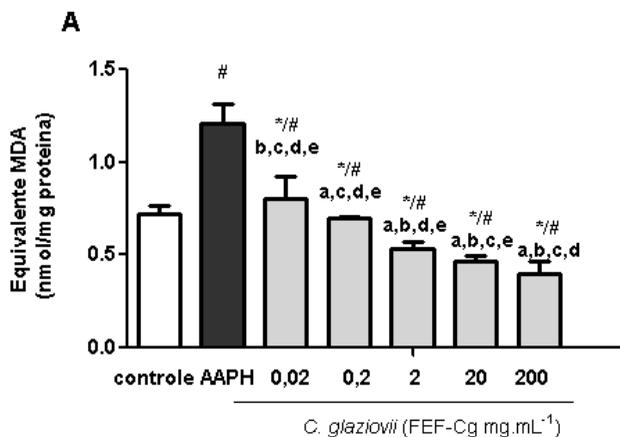
O presente estudo indicou que a FEF-Cg (0,02; 0,2, 2, 20 e 200 mg.mL⁻¹), avaliada frente ao gerador de EROs AAPH, demonstrou maior inibição na formação de TBARS na concentração de 200 mg.mL⁻¹, quando comparada ao grupo controle e as demais concentrações avaliadas. Além disso, com o aumento da concentração da FEF-Cg, diminuíram aos níveis de TBARS (0,02 mg.mL⁻¹: 0,8 ± 0,12; 0,2 mg.mL⁻¹: 0,7 ± 0,01; 2 mg.mL⁻¹: 0,5 ± 0,04; 20 mg.mL⁻¹: 0,46 ± 0,03 e 200 mg.mL⁻¹: 0,4 ± 0,07). (**Figura 11 A**).

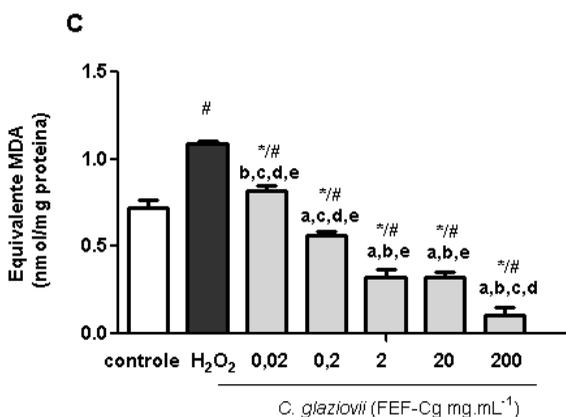
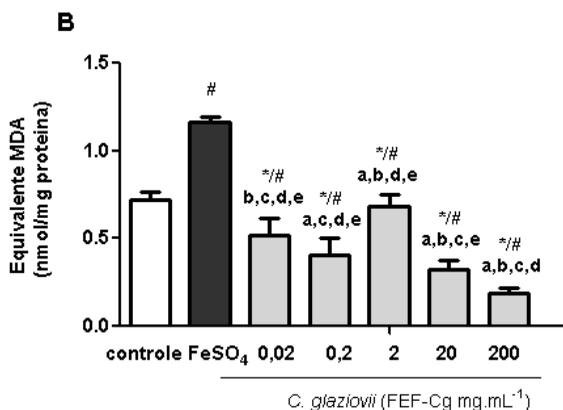
Na avaliação da FEF-Cg frente ao gerador FeSO₄, a fração foi capaz de inibir a formação de TBARS em todas as concentrações avaliadas, sendo a maior atividade detectada na concentração de 200 mg.mL⁻¹ (200 mg.mL⁻¹: 0,19 ± 0,03). (**Figura 11 B**).

Já na avaliação da FEF-Cg, frente ao gerador H₂O₂, as concentrações 2 e 20 mg.mL⁻¹ inibiram a formação de TBARS, porém não foi observado diferenças estatísticas entre estas duas concentrações

avaliadas. Também foi possível observar que a concentração de 200 mg.ml⁻¹ foi a mais efetiva na diminuição dos níveis de TBARS se comparado com o grupo controle e as demais concentrações da fração avaliadas (0,02 mg.ml⁻¹: 0,82 ± 0,03; 0,2 mg.ml⁻¹: 0,6 ± 0,03; 2 mg.ml⁻¹: 0,3 ± 0,05; 20 mg.ml⁻¹: 0,3 ± 0,03 e 200 mg.ml⁻¹: 0,1 ± 0,04). (**Figura 11 C**).

Figura 11 – Efeito da fração enriquecida em flavonoides C-glicosídeos das folhas de *C. glaziovii* (FEF-Cg) na inibição da formação das TBARS utilizando os geradores AAPH (D), FeSO₄ (E) e H₂O₂ (F).





Controle = grupo controle negativo (substrato lipídico), Gerador de ERO = grupo controle positivo (AAPH ou FeSO₄ ou H₂O₂). As colunas verticais representam média ± desvio padrão em relação os grupos controle^(#) ou gerador ERO^(*), respectivamente.

a = diferenças estatísticas em relação a concentração 0,02 mg.mL⁻¹

b = diferenças estatísticas em relação a concentração 0,2 mg.mL⁻¹

c = diferenças estatísticas em relação a concentração 2 mg.mL⁻¹

d = diferenças estatísticas em relação a concentração 20 mg.mL⁻¹

e = diferenças estatísticas em relação a concentração 200 mg.mL⁻¹

Diferenças significativas foram determinadas por ANOVA seguida do pós teste de Tukey com $p < 0,05$. N = 5 tubos.

2.4.3 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) *in vitro*, do extrato das folhas de *C. pachystachya* (EA-Cp) e sua fração enriquecida em flavonoides (FEF-Cp)

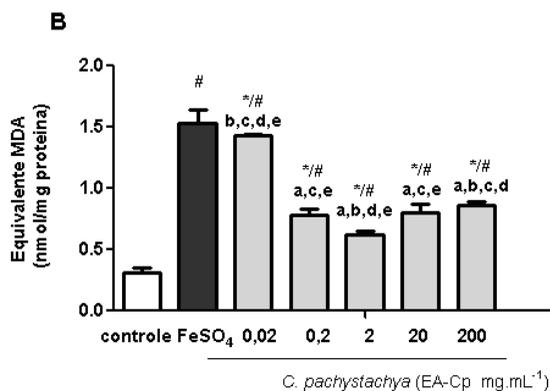
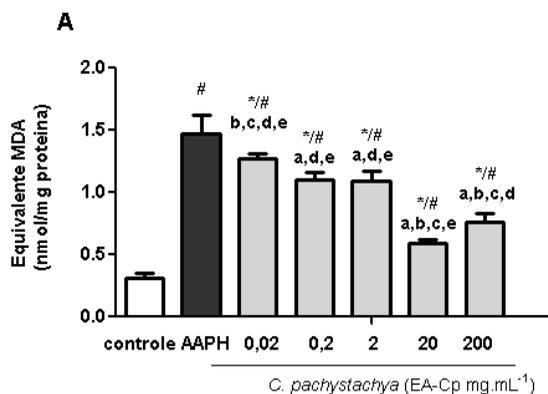
O EA-Cp demonstrou efetividade na redução dos níveis de TBARS frente aos geradores testados, quando comparado com o grupo controle.

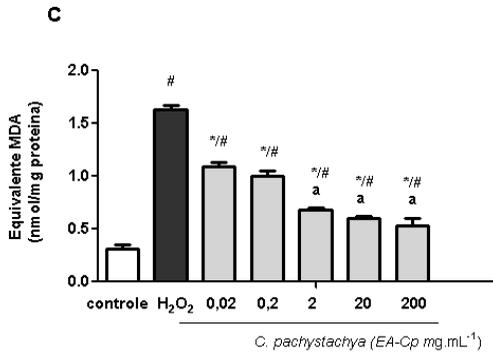
Especificamente frente ao gerador AAPH, o EA-Cp demonstrou melhor atividade nas concentrações de 20 e 200 mg.ml⁻¹, quando comparadas ao grupo controle. Já as concentrações intermediárias (0,2 e 2 mg.ml⁻¹), quando comparadas entre si, não demonstraram diferenças significativas (0,02 mg.ml⁻¹: 1,3 ± 0,04; 0,2 mg.ml⁻¹: 1,1 ± 0,06; 2 mg.ml⁻¹: 1,09 ± 0,08; 20 mg.ml⁻¹: 0,6 ± 0,03 e 200 mg.ml⁻¹: 0,7 ± 0,07). **(Figura 12 A).**

O resultado frente ao gerador FeSO₄, o EA-Cp não demonstrou diferenças significativas entre as concentrações de 0,2 e 20 mg.ml⁻¹. Contudo, foi capaz diminuir os níveis de TBARS nas concentrações avaliadas, quando comparadas ao grupo controle. A concentração de 2 mg.ml⁻¹, foi a que demonstrou maior inibição na formação de TBARS (0,02 mg.ml⁻¹: 1,4 ± 0,01; 0,2 mg.ml⁻¹: 0,8 ± 0,05; 2 mg.ml⁻¹: 0,6 ± 0,03; 20 mg.ml⁻¹: 0,8 ± 0,07 e 200 mg.ml⁻¹: 0,86 ± 0,03). **(Figura 12 B).**

Também, o EA-Cp, avaliado *in vitro*, nas mesmas concentrações e tendo o H₂O₂ como gerador de EROs, foi capaz reverter os níveis de TBARS nas concentrações de 2, 20 e 200 mg.ml⁻¹, não sendo observado diferenças significativas entre estas concentrações. Igualmente não foi observado diferença significativa entre as concentrações de 0,02 e 0,2 mg.ml⁻¹, quando comparadas entre si (0,02 mg.ml⁻¹: 1,09 ± 0,04; 0,2 mg.ml⁻¹: 1,0 ± 0,05; 2 mg.ml⁻¹: 0,67 ± 0,02; 20 mg.ml⁻¹: 0,59 ± 0,03 e 200 mg.ml⁻¹: 0,54 ± 0,07). **(Figura 12 C).**

Figura 12 – Efeito do extrato aquoso das folhas de *C. pachystachya* (EA-Cp) na inibição da formação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando os geradores AAPH (A), FeSO₄ (B) e H₂O₂ (C).





Controle = grupo controle negativo (substrato lipídico), Gerador de ERO = grupo controle positivo (AAPH ou FeSO₄ ou H₂O₂). As colunas verticais representam média ± desvio padrão em relação os grupos controle^(#) ou gerador ERO^(*), respectivamente.

a = diferenças estatísticas em relação a concentração 0,02 mg mL⁻¹

b = diferenças estatísticas em relação a concentração 0,2 mg mL⁻¹

c = diferenças estatísticas em relação a concentração 2 mg mL⁻¹

d = diferenças estatísticas em relação a concentração 20 mg mL⁻¹

e = diferenças estatísticas em relação a concentração 200 mg mL⁻¹

Diferenças significativas foram determinadas por ANOVA seguida do pós teste de Tukey com $p < 0,05$. N = 5 tubos.

A FEF-Cp, também foi efetiva ao reduzir os níveis de TBARS nas mesmas condições do EA-Cp, quando comparadas ao grupo controle.

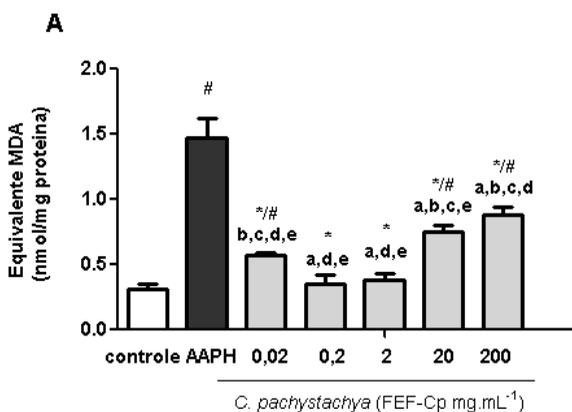
As EROs geradas pelo AAPH, demonstraram menor nível de peroxidação lipídica através da diminuição de formação de TBARS, quando na presença da FEF-Cp. As concentrações 0,2 e 2 mg mL⁻¹ demonstraram ser as mais efetivas, quando comparadas com o grupo controle. Contudo não foram observadas diferenças significativas entre estas concentrações. (0,02 mg mL⁻¹: 0,56 ± 0,02; 0,2 mg mL⁻¹: 0,35 ± 0,07; 2 mg mL⁻¹: 0,37 ± 0,05; 20 mg mL⁻¹: 0,75 ± 0,05 e 200 mg mL⁻¹: 0,87 ± 0,06). (**Figura 13 A**).

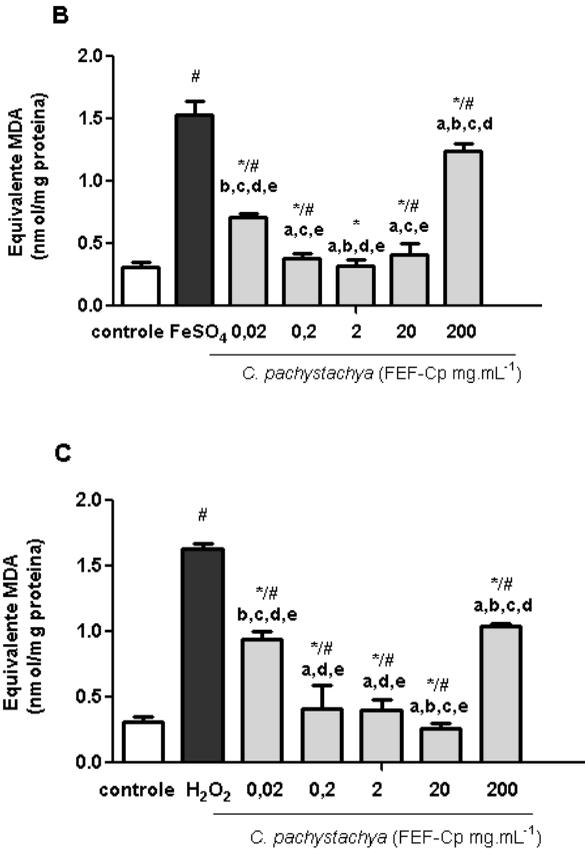
A FEF-Cp quando avaliada frente ao gerador FeSO₄, apresentou as concentrações intermediárias (0,2, 2 e 20 mg mL⁻¹) como as mais efetivas na redução dos níveis de TBARS (2 mg mL⁻¹). Diferenças significativas não foram observadas entre as concentrações de 0,2 e 20 mg mL⁻¹ (0,02 mg mL⁻¹: 0,711 ± 0,03; 0,2 mg mL⁻¹: 0,38 ± 0,04; 2 mg mL⁻¹: 0,32 ± 0,05; 20 mg mL⁻¹: 0,41 ± 0,09 e 200 mg mL⁻¹: 1,24 ± 0,06). Já a

concentração de 200 mg.ml⁻¹ demonstrou ser a menos efetiva na proteção ao dano lipídico, quando comparada a controle. **(Figura 13 B).**

Finalmente a FEF-Cp enriquecida em flavonoides, avaliada frente ao gerador H₂O₂, demonstrou ser igualmente efetiva na inibição da formação das TBARS nas concentrações intermediárias (0,2; 2 e 20 mg.ml⁻¹). Não foi observado diferenças significativas entre as concentrações 0,2 e 2 mg.ml⁻¹. A concentração de 200 mg.ml⁻¹, demonstrou ser a menos efetiva na proteção ao dano lipídico, quando comparada ao controle (0,02 mg.ml⁻¹: 0,94 ± 0,06; 0,2 mg.ml⁻¹: 0,41 ± 0,17; 2 mg.ml⁻¹: 0,39 ± 0,08; 20 mg.ml⁻¹: 0,25 ± 0,05 e 200 mg.ml⁻¹: 1,03 ± 0,02). **(Figura 13 C).**

Figura 13 – Efeito da fração enriquecida em flavonoides C-glicosídeos das folhas de *C. pachystachya* (FEF-Cp) na Inibição da formação das TBARS utilizando os geradores AAPH (A), FeSO₄ (B) e H₂O₂ (C).





Controle = grupo controle negativo (substrato lipídico), Gerador de ERO = grupo controle positivo (AAPH ou FeSO₄ ou H₂O₂). As colunas verticais representam média ± desvio padrão em relação os grupos controle^(#) ou gerador ERO^(*), respectivamente.

a = diferenças estatísticas em relação a concentração 0,02 mg.mL⁻¹

b = diferenças estatísticas em relação a concentração 0,2 mg.mL⁻¹

c = diferenças estatísticas em relação a concentração 2 mg.mL⁻¹

d = diferenças estatísticas em relação a concentração 20 mg.mL⁻¹

e = diferenças estatísticas em relação a concentração 200 mg.mL⁻¹

Diferenças significativas foram determinadas por ANOVA seguida do pós teste de Tukey com $p < 0,05$. N = 5 tubos.

2.5 DISCUSSÃO

O perfil qualitativo dos extratos das folhas e suas frações enriquecidas em flavonoides avaliados por CLAE/DAD, apresentaram o mesmo relatado nos estudos de Costa et al., (2011) para *C. glaziovii* e *C. pachystachya*. Os perfis quantitativos das FEF e dos EA foram avaliados com base nos compostos majoritários conhecidos de ambas as espécies (ácido clorogênico, isoorientina e isovitexina). Foi possível verificar que o perfil quantitativo de compostos fenólicos é diferente entre as espécies estudadas e também difere entre os EA e as FEF utilizados neste estudo.

A relação entre atividade antioxidante de extratos vegetais e compostos fenólicos já é bem consolidada na literatura. (RICE-REVANS et al., 1996). Diversos estudos publicados demonstraram que espécies com flavonóides C-glicosídeos possuem propriedades antioxidantes, as quais podem ser avaliadas utilizando ensaios *in vitro*. (TALHI; SILVA, 2012). De acordo com Halliwell (1995), a atividade antioxidante de um composto ou de uma substância, deve ser avaliada inicialmente *in vitro*, pois o resultado obtido permite verificar o potencial antioxidante da amostra testada.

Os fosfolipídios são considerados componentes estruturais importantes da membrana celular e a sua peroxidação, através do estresse oxidativo, representa uma grave ameaça para a integridade celular implicada na patogênese de várias doenças, incluindo doenças neurodegenerativas, lesão pulmonar aguda, fibrose pulmonar entre outras. (ADIBHATLA; HATCHER, 2010; CATALA, 2009; HEPPLESTON, 1991; PIZZIMENTI et al., 2013).

Hidroperóxidos lipídicos são os produtos primários de peroxidação lipídica e também a fonte de produtos secundários altamente tóxicos tais como aldeídos. (CATALA, 2009). Assim, a capacidade de reduzir níveis de hidroperóxidos lipídicos, ou seja, reparar os lipídeos da membrana peroxidada, é de primordial importância na recuperação de células do estresse oxidativo. Numerosos estudos têm investigado lesão e reparação do DNA e proteína, mas existem relativamente poucos estudos sobre a reparação de lipídios oxidados e cujos mecanismos de reparo são mal compreendidos. (LI et al., 2015; FRANÇA et al., 2013).

O MDA é um aldeído de cadeia curta, sendo um dos compostos medidos pela reação TBARS. A formação de MDA ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, em células e tecidos. (BONNES; GUÉRIN, 1992).

O método TBARS é utilizado desde 1950 para estimar a intensidade da peroxidação lipídica na membrana celular em sistemas biológicos. O princípio deste método consiste na formação de produtos da peroxidação lipídica, como o MDA que reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando como produto um cromógeno de cor rosa fluorescente, capaz de ser detectado através de leitura espectrofotométrica. (HALLIWELL, 2000; HODGES et al., 1999).

Considerado um método de fácil execução, o método TBARS não é específico para o MDA, reagindo com uma ampla variedade de compostos como açúcares, aminoácidos, proteínas, aminas e bilirrubina. (GROTTO et al., 2007).

Uma grande variedade de métodos tem sido utilizada para determinar a atividade antioxidante de amostras. Contudo, nenhum ensaio proporciona um método preciso para determinar a capacidade de sequestrar radicais livres e/ou para impedir a oxidação de lipídios, principalmente em um sistema complexo, tais como extratos vegetais. (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

Para estabelecer o modelo de estresse oxidativo, é importante selecionar uma fonte adequada de geradores de radicais livres (HE et al., 2013). No presente trabalho, a peroxidação lipídica foi induzida por três diferentes geradores de EROs, sendo o AAPH, FeSO_4 e H_2O_2 e avaliada (*in vitro*) através dos níveis da redução de TBARS.

A substância 2,2'-azobis (2-amidinopropano) di-hidrocloro (AAPH), utilizada neste estudo, é uma pequena molécula, solúvel em água, amplamente utilizada com a função de geradora de ERO no estudo de peroxidação de lipídios e para a caracterização de antioxidantes. (MACIEL et al., 2014; NOGUCHI et al., 1998). A decomposição de AAPH produz um mol de nitrogênio e dois moles de radicais de carbono. Os radicais de carbono se combinam para produzir produtos estáveis ou reagir com o oxigênio molecular para gerar radicais peroxila. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; TANG; LIU, 2007).

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos aquosos e suas frações das folhas de *C. glaziovii* (EA-Cg e FEF-Cg) e *C. pachystachya* (EA-Cp e FEF-Cp) *in vitro*, apresentaram atividade antioxidante através da proteção ao dano lipídico. Também foi possível observar neste estudo, diferenças quantitativas na formação das TBARS, entre os extratos e suas respectivas frações das espécies estudadas.

Na avaliação da atividade antioxidante do EA-Cg e da FEF-Cg das folhas de *C. glaziovii*, frente ao gerador AAPH, foi observado redução ao dano lipídico em todas as concentrações testadas. Contudo, para o EA-Cg, não se observou diferenças significativas entre as

concentrações avaliadas. Resultados semelhantes foram verificados com os estudos de Petronilho et al, (2012), onde o extrato hidroetanólico padronizado das folhas de *C. glaziovii* foi avaliado quanto a atividade antioxidante *in vitro* através do método TBARS nas concentrações de 2, 20 e 200 µg/mL. Todas as concentrações testadas demonstraram reduzir a peroxidação lipídica induzida frente aos três geradores de radicais livres: AAPH, FeSO₄ e H₂O₂. Adicionalmente, não foi verificada relação entre as diferentes concentrações do extrato com a atividade antioxidante, embora todas as concentrações testadas tenham reduzido o dano lipídico.

Já para a FEF-Cg, nas mesmas condições, foram detectadas diferenças significativas em todas as concentrações avaliadas. Ainda foi possível observar que o aumento da concentração estava relacionado ao aumento da proteção ao dano lipídico causado pelo gerador AAPH.

Para *C. pachystachya*, avaliada frente ao gerador AAPH, também nas mesmas condições, EA-Cp demonstrou sua efetividade em concentrações maiores. Resultados opostos à FEF-Cp que demonstrou maior atividade antioxidante nas concentrações intermediárias. Este fato pode estar relacionado aos diferentes teores de flavonoides C-glicosídeos presentes nas amostras, conforme demonstrados na **Tabela 1**, onde a FEF-Cp possui maiores teores de ácido clorogênico e flavonoides c-glicosídeos quando comparado com o EA-Cp.

A geração de ERO em sistemas vivos é estreitamente ligada a participação de metais ativos dentro do meio celular, tais como ferro, cobre, cromo e cobalto mantidos dentro dos rigorosos limites fisiológicos. Estes metais podem ser submetidos a reações de clivagem e consequentemente participarem da transferência de elétrons entre metais e substratos desempenhando função importante na manutenção de homeostase celular. Porém o rompimento dessa homeostase pode conduzir a formação de ERO que participam nas modificações das bases do DNA e da peroxidação lipídica. (VALKO et al., 2007).

Na avaliação da atividade antioxidante dos EA-Cg e EA-Cp, frente ao gerador FeSO₄, demonstraram proteção ao dano lipídico. Já FEF-Cg demonstrou mais efetividade na proteção ao dano lipídico, mesmo nas menores concentrações avaliadas. A FEF-Cp apresentou efetividade nas concentrações intermediárias. Esses resultados vêm em concordância ao previsto na literatura em outros trabalhos que relatam a forte atividade antioxidante de flavonoides contra peroxidação lipídica induzida por ferro. A remoção de metais de transição livres no meio biológico é fundamental para a proteção antioxidante do organismo, visto que esses catalisam as reações de Fenton e de Haber Weiss,

formadoras do radical HO[•], reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante da peroxidação lipídica. (HALLIWELL, 2006).

Pacheco et al. (2014), avaliaram *in vitro* o potencial antioxidante do extrato metanólico das folhas de *C. pachystachya* através dos ensaios DPPH e TBARS. Também, recentemente em outro estudo, realizado por Duque et al. (2016), extrato de acetato de etila da planta foi avaliado através dos ensaios *in vitro* DPPH e TBARS. Os autores concluem que em ambos os métodos utilizados, os extratos apresentaram uma considerável ação antioxidante. Esses resultados corroboram com nosso estudo, considerando a composição química majoritária em compostos fenólicos da espécie *C. pachystachya*, a capacidade de quelar Fe²⁺ e ligar-se aos radicais livres, torna os flavonoides bons antioxidantes, sendo muitas das ações farmacológicas explicadas por essa propriedade. (HAVSTEEN, 2002; VASQUEZ-MARTINEZ et al., 2007).

Apesar de não ser considerado uma ERO propriamente dita por não possuir um elétron desemparelhado em sua última camada eletrônica, o H₂O₂ pode danificar tecidos pela sua alta capacidade de difusão através das membranas celulares. Além disso, esta molécula também pode danificar as membranas celulares por apresentar intensa reatividade com os fosfolipídios componentes das membranas, proteínas citoplasmáticas e bases nitrogenadas. Em particular, H₂O₂ é uma fonte potencial de radical hidroxila (OH[•]), um dos radicais deletério formado pela Reação de Fenton, na presença de íons de metais de transição, como o ferro. (CAO; SOFIC; PRIOR, 1997; EATON; QIAN, 2002).

Neste estudo foi possível demonstrar que o EA-Cg foi capaz de proteger o dano lipídico gerado pelo H₂O₂. Já a FEF-Cg demonstrou ser capaz de proteger com maior efetividade. Foi possível verificar diferenças significativas relacionadas ao decréscimo dos níveis de TBARS entre as diferentes concentrações da FEF-Cg avaliadas. Resultados semelhantes foram observados para EA-Cp e FEF-Cp, que também tiveram a capacidade de proteger o dano lipídico nas mesmas condições. Porém para o EA-Cp, as concentrações elevadas (20 e 200 mg.mL⁻¹) foram mais eficazes, enquanto que para a FEF-Cp foram as concentrações intermediárias.

Finalmente, os resultados aqui apresentados demonstram que as frações enriquecidas em flavonoides da espécie *C. glaziovii* (FEF-Cg) e *C. pachystachya* (FEFp) apresentaram resultados mais efetivos na proteção ao dano lipídico, se comparado com os extratos aquosos das duas espécies (EA-Cg e EA-Cp), fato que pode ser atribuído aos flavonoides nas frações metanólicas. Porém, outra observação para a atividade da FEF frente aos indutores de EROs utilizados neste

experimento, foi a concentração de 200 mg.mL^{-1} que demonstrou elevar os níveis de TBARS, se comparados com as demais concentrações testadas. Este fato pode estar relacionado com a atividade pró-oxidante de flavonóides. (HALLIWELL, 2008; OHSHIMA et al., 1998; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

Dzoyem e Eloff (2015), afirmam que não há uma relação direta entre atividade antioxidante de extratos vegetais e o teor de compostos fenólicos totais e flavonoides, ou seja, a atividade antioxidante não poderia ser explicada somente com base no teor destes compostos, pois a caracterização estrutural dos mesmos deve ser considerada.

Porém é conhecido que os flavonoides em geral possuem a estrutura molecular com capacidade de agir como antioxidantes. (RICE-EVANS, 2001; NICKAVAR; KAMALINEJAD; IZADPANAH, 2007). Quanto maior o número de hidroxilas, maior é a atividade como agente doador de próton e elétrons, sendo considerados antioxidantes fracos os flavonoides monoidroxilados (CAO; SOFIC; PRIOR, 1997). Já entre os flavonoides dihidroxilados, destacam-se aqueles que possuem o sistema catecol (3, 4^o-dihidroxi) no anel B. (CAO; SOFIC; PRIOR, 1997; YANG et al., 2015).

Os flavonoides glicosilados, possuem características polares, não sendo assimilados pelas membranas biológicas, porém nesta forma eles podem ser armazenados por vesículas, possuindo um tempo maior de permanência no organismo. (ZENG et al., 2013). A hidrofobicidade relativa de flavonoides depende do número de grupos hidroxilas (HENDRICH, 2006) e das glicoses. (ZENG et al., 2013).

Ainda outro fator importante a ser considerado que pode influenciar a atividade antioxidante de flavonoides, é a sua interação com as membranas biológicas, sendo assim a lipofilicidade destes metabólitos secundários é importante na incorporação as membranas biológicas, já que estas são alvos das maiorias das EROs. (TSUCHIYA, 2010). Assim deve-se considerar a necessidade de haver uma concentração mínima de flavonoides por ácido graxo, de modo assegurar a presença das moléculas próximas ao sítio de ataque das EROs. (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Adicionalmente, os efeitos da interação das membranas biológicas e flavonoides são influenciados pela composição lipídica da membrana, o grau de insaturação dos fosfolipídios e o teor de colesterol. (LONDOÑO-LONDOÑO et al., 2010; REVUELTA et al., 2006).

Para integrar o novo conhecimento das atividades farmacológicas e os resultados de relação dos flavonoides C-glicosídeos na medicina humana, pesquisas futuras devem investigar a relação estrutura atividade

precisa destes compostos no que diz respeito a atividade hepatoprotetora, anti-inflamatória, anti-viral, anti-glicação e anti-hiperglicêmica. Além disso, também necessário delinear as diferenças das atividades farmacológicas entre os flavonoides *C*-glicosídeos e os *O*-glicosídeos. (ZENG et al., 2013).

2.6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste capítulo, foi possível concluir que:

- O método utilizado para as análises das amostras por CLAE, demonstrou que os EA das folhas das espécies estudadas, são constituídos por compostos fenólicos, entre eles estão presentes duas classes de metabólitos secundários, os ácidos fenólicos e os flavonoides. Em relação aos ácidos fenólicos, o ácido clorogênico faz parte dos compostos majoritários dos EA de *C. glaziovii* e de *C. pachystachya*. Considerando os flavonoides, estes compostos estão presentes em sua forma conjugada a moléculas de açúcar, destacando-se os compostos majoritários os flavonoides *C*-glicosídeos isovitexina e isoorientina. Estes presentes em maior quantidade nas FEF de *C. glaziovii* e *C. pachystachya*, respectivamente.

- O EA-Cg das folhas de *C. glaziovii*, inibiu a formação de TBARS induzido pelos três indutores do estresse oxidativo, AAPH, FeSO₄ e H₂O₂, aos quais são formadores das ERO peroxila, hidroxila e peróxido de hidrogênio, respectivamente, em todas as concentrações testadas. Porém não demonstrou diferenças significativas se comparado com as demais concentrações avaliadas frente ao gerador AAPH.

- A FEF-Cg das folhas de *C. glaziovii*, inibiu a formação de TBARS induzido pelos três indutores do estresse oxidativo. A concentração de 200 mg/mL, demonstrou ser mais efetiva quando comparada com o grupo controle e as demais concentrações avaliadas;

- O EA-Cp das folhas de *C. pachystachya*, inibiu a formação de TBARS induzido pelos três indutores do estresse oxidativo utilizados, em todas as concentrações testadas, porém apresentou diferenças no que concerne as concentrações do EA-Cp avaliadas e a formação de TBARS pelos diferentes indutores de ERO. Para o indutor AAPH, as concentrações de 20 e 200 mg/mL foram as mais efetivas. Já para o indutor FeSO₄, as concentrações 0,2 e 2 mg/mL demonstraram maior proteção ao dano lipídico e para o H₂O₂ as concentrações 2, 20 e 200 mg/mL foram as mais efetivas;

- A FEFp das folhas de *C. pachystachya* inibiu a formação de TBARS induzido pelos três indutores do estresse oxidativo utilizados, em todas as concentrações testadas. A maior proteção ao dano, foi detectada nas concentrações intermediárias (0,2, 2 e 20 mg/mL). Por outro lado, a concentração maior elevou os níveis de TBARS, quando comparada às demais concentrações;

- Os extratos aquosos e frações, demonstraram possuir ação antioxidante, embora os resultados das frações enriquecidas em flavonoides (FEF-Cg e FEFp) foram mais efetivos, onde menores concentrações foram capazes de exercer maior proteção ao dano lipídico da membrana.

CAPÍTULO 3

3 CAPÍTULO 3. O PROCESSO INFLAMATÓRIO E O ESTRESSE OXIDATIVO: UMA BREVE REVISÃO

3.1 INTRODUÇÃO

Para as espécies *C. glaziovii* e *C. pachystachya*, embora existam alguns estudos químicos e farmacológicos, poucos são os estudos *in vivo* que se referem às ações anti-inflamatória e antioxidante dos extratos aquosos e suas frações enriquecidas em flavonoides C-glicosídeos, como já apresentado no **Capítulo 2**. Buscou-se desse modo, avaliar tais atividades, considerando que durante o processo inflamatório, macrófagos e neutrófilos, bem como as células teciduais lesadas, liberam uma variedade de substâncias oxidantes e enzimas gerando estresse oxidativo. (HENSLEY et al., 2000; HALLIWELL, 2014). Ainda, deve-se considerar que para o tratamento do processo inflamatório, vários fármacos agem através de mecanismos antioxidantes como parte de sua atividade biológica, como a nimesulida (FACINO; CARINI; ALDINI, 1993) e os aminosalicilatos. (MILES; GRISHAM, 1994).

Vários modelos farmacológicos para a avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo* de fármacos e/ou plantas já foram descritos, com destaque para o modelo experimental da pleurisia. Considerando que diversas doenças de caráter inflamatório induzem à formação de edema, a infiltração de leucócitos e a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, o modelo da pleurisia possibilita a avaliação do extravasamento de líquidos, bem como a migração de células, e seus mediadores químicos como citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. (DALMARCO et al., 2009; SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996).

Nesse capítulo será apresentada inicialmente uma breve revisão sobre o processo inflamatório e o estresse oxidativo, posteriormente será descrito o modelo experimental pleurisia seguido da atividade anti-inflamatória de flavonoides.

3.1.1 O processo inflamatório e o estresse oxidativo

O processo inflamatório ocorre como uma resposta do tecido à lesão celular e caracteriza-se por um fenômeno complexo podendo manifestar-se a partir de um agente lesivo físico, químico ou biológico, levando à ocorrência de calor, vermelhidão, dor, inchaço e perda de função. (SONNENBERG; ARTIS, 2015). A resposta inflamatória aguda envolve uma cascata complexa de eventos bioquímicos e celulares,

consistindo em uma reação inata, não imunológica, com eventos vasculares, celulares e uma resposta imune adquirida. (MEDZHITOV, 2010). Considerado um processo necessário para proteção contra a infecção e promoção ao reparo tecidual, a inflamação é benéfica quando ocorre a manutenção da homeostasia tecidual. Porém, na inflamação crônica, o resultado de cada reação inflamatória pode ser prejudicial, contribuindo diretamente para a patogênese e progressão dos vários distúrbios infecciosos, inflamatórios e metabólicos. (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2011; MEDZHITOV, 2010).

O processo inflamatório pode ser dividido em três etapas distintas: a primeira etapa é caracterizada pela vasodilatação arteriolar, com consequente aumento de fluxo sanguíneo local, seguido de uma redução na velocidade do fluxo sanguíneo contribuindo para os sinais de calor e vermelhidão. Esta fase tem como finalidade facilitar a distribuição local de mediadores e células inflamatórias, sendo estes mediadores o óxido nítrico (NO), cininas, histamina, serotonina, leucotrienos, PAF-aceter (fator ativador de plaquetas), fração C5a do sistema complemento, prostaglandinas (PGD₂, PGE₂, PGI₂, PGF₂) e substâncias liberadas localmente das terminações nervosas (taquicinas) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina - (CGRP). (SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

Na segunda etapa, ocorre alteração e a ativação das células endoteliais e leucócitos circulantes, que passarão a expressar moléculas de adesão, permitindo a migração transendotelial de leucócitos com extravasamento para os tecidos. Estas alterações são iniciadas por citocinas (interleucinas, IL) produzidas pelos macrófagos ativados. Nesta fase, neutrófilos e outros leucócitos requerem fatores quimiotáticos para facilitar a migração para o local da injúria ou infecção. Dentre estes fatores quimiotáticos podemos citar produtos bacterianos, componentes do sistema complemento e citocinas (quimiocinas). (GRANGER; SENCHENKOVA, 2010).

Na terceira etapa, a alteração vascular é caracterizada pelo aumento na permeabilidade vascular com exsudação de líquido para os tecidos, resultando em edema, dor e contribuindo para a ativação das proteases, componentes das cascatas enzimáticas proteolíticas, o sistema do complemento, da coagulação, fibrinolítico e o sistema das cininas desencadeando formação de substâncias quimiotáticas que atrairão células e irão estimular e liberação dos mediadores inflamatórios, entre eles a histamina, bradicinina, serotonina, produtos da cascata do ácido araquidônico e ATP. (MEDZHITOV, 2008; MEDZHITOV; HORNG, 2009; NATHAN; DING, 2010).

As principais células envolvidas no processo inflamatório compreendem as mononucleares e polimorfonucleares. As mononucleares, que fazem parte do sistema fagocítico e com funções distintas compreendem os monócitos e macrófagos. Os macrófagos, monócitos teciduais em sua forma madura, ocorrem na inflamação, com três principais funções: a apresentação do antígeno, a fagocitose e produção de imunomodulação através de várias citocinas e fatores de crescimento. Os macrófagos desempenham um papel crítico na iniciação, manutenção e resolução de inflamação. (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005).

As células mononucleares possuem vida longa e algumas podem se proliferar *in situ*. Já as células polimorfonucleares (neutrófilos) possuem vida curta e necessitam ser continuamente produzidas. Estas células possuem função fagocitária, sendo a primeira linha de defesa do sistema imune inato, e quando rapidamente recrutadas para o sítio de infecção pelo hospedeiro e/ou por componentes microbianos se acumulam por horas no local da inflamação aguda. (LUSTER, ALON, VON ANDRIAN, 2005).

Durante o processo inflamatório, macrófagos, neutrófilos e as células epiteliais lesadas, liberam uma variedade de substâncias oxidantes e enzimas, sendo as principais efetoras da imunidade inata e representam a primeira linha de defesa contra os microrganismos patogênicos.

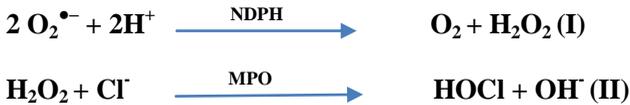
Os neutrófilos possuem quatro compartimentos intracelulares que compreendem os grânulos primários (azurófilos), grânulos secundários (específicos), grânulos terciários e vesículas secretoras, cujos conteúdos podem ser secretados durante a ativação celular. Os principais componentes citotóxicos microbicidas destas células são encontrados nos azurófilos, dentre eles a enzima MPO que, em combinação com H_2O_2 e íons cloretos (Cl^-), constituem um potente sistema antimicrobiano, sendo expressas em grande quantidade nos neutrófilos e, em menor quantidade, nos monócitos e macrófagos. (KLEBANOFF et al., 2013).

A função dos leucócitos nos locais de lesão tecidual é bastante complexa, mas pode ser sumarizada pela ação de endocitose de material estranho e secreção de enzimas intracelulares, como elastase, endopeptidases e MPO. (KLEBANOFF et al., 2013).

A MPO é uma enzima que catalisa a formação de numerosas espécies reativas oxidantes, sendo a reação da MPO com H_2O_2 proveniente das células fagocitárias formando um complexo enzima-substrato com potente capacidade oxidativa, considerável consumo de

O₂ e intensa liberação de proteínas no espaço fagosomal. A MPO faz parte de 5% das proteínas dos neutrófilos e a enzima responsável pelo consumo de oxigênio é um complexo NADH oxidase que através da abertura de canais na membrana da célula fagocítica, possibilita a entrada de O₂ no citoplasma favorecendo uma variedade de compostos como o ânion O₂^{•-} e o H₂O₂. Ainda a MPO oxida halogênios e forma o ácido hipocloroso (HOCl), sendo a única enzima humana capaz de gerar HOCl (KLEBANOFF et al., 2013; NAUSEEF, 2014). (**Figura 14**).

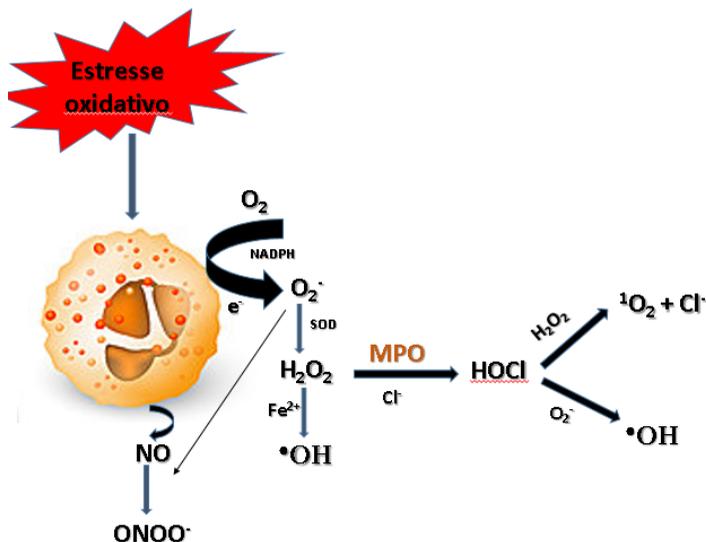
Após a conversão do oxigênio molecular em ânion O₂^{•-}, promovido pela enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH) (I), a enzima SOD converte o O₂^{•-} em H₂O₂, o qual possui ação microbicida. A reação subsequente envolve a ligação da MPO com o H₂O₂ e sua conversão em OH⁻ e HOCl, o qual também possui intensa atividade microbicida (II). (NAUSEEF, 2014).



Além de integrantes da resposta imune inata, evidências têm comprovado a contribuição desses oxidantes para o dano tecidual durante inflamação, pois células como os macrófagos e os polimorfonucleares, liberam EROs, que podem reagir com várias biomoléculas levando à lesão de proteínas, lipídeos e também do ácido desoxirribonucléico (DNA) de células vizinhas no local do processo inflamatório. (DALMARCO et al., 2009).

É provável que a quebra da homeostasia entre os níveis oxidantes e antioxidantes representa um importante mecanismo que relacione o estresse oxidativo fisiológico com doenças inflamatórias (KAMPER et al., 2009).

Figura 14 – Produção de EROs pelo neutrófilo ativado.



Fonte: adaptado de Klebanoff et al. (2013).

A NADPH oxidase e a SOD são responsáveis pela formação de peróxido de hidrogênio, o qual é convertido em ácido hipocloroso pela enzima MPO e tem importante ação microbicida e na resposta imune inata. Cl⁻: cloreto; H⁺: hídron; H₂O: água; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; HOCl: ácido hipocloroso; MPO: mieloperoxidase; NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxigenase; O₂^{•-}: ânion superóxido; O₂: oxigênio molecular; SOD: superóxido dismutase.

Durante o desenvolvimento do processo inflamatório, outros mediadores são importantes. Os macrófagos e os leucócitos polimorfo nucleares recrutados pelos sítios da lesão celular, desempenham função importante na liberação de citocinas (ou interleucinas, IL), destacando-se inicialmente a liberação da interleucina-1β (IL-1β), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α).

As citocinas são um grupo de proteínas solúveis ou proteínas de membrana celular ou glicoproteínas mensageiras, consideradas importantes mediadores no diagnóstico, prognóstico e na terapêutica das doenças humanas. (DINARELLO, 2007). Diversos são os estímulos para a liberação das citocinas, incluindo bactérias, vírus, parasitas, fungos, tumores, traumas, estímulos físicos (queimaduras, irradiações),

necrose tecidual (infarto), células ativadas que participam da resposta imune, entre outros. (CARTA et al., 2009).

Especificamente em relação ao processo inflamatório, são basicamente divididas em: pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β , IL-17A) e anti-inflamatórias (IL-10, IL-4, IL-1Ra). (DINARELLO, 2007).

As citocinas agem especificamente em nível celular mediante ativação de receptores localizados na superfície da célula alvo. Possuem função autócrina agindo na própria célula produtora, parácrina atuando em células próximas e endócrina quando sua ação é à distância. Atuam em concentrações baixíssimas e sua síntese habitualmente ocorre após estimulação antígeno, sendo imprescindível o balanço adequado entre as citocinas pró e anti-inflamatórias na resposta imune do processo inflamatório. (FRÖDE; SOUZA; CALIXTO, 2002; YU et al., 2012).

Durante o processo inflamatório da pleurisia induzida pela carragenina, já é estabelecido que o TNF- α e a IL-1 β . (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996) e IL-6 (FRÖDE; SOUZA; CALIXTO, 2002) exercem função central regulando a resposta inflamatória. A maioria das citocinas funcionam unicamente por ligação a receptores específicos da superfície celular, o que inicia uma cascata de sinais intracelulares que afetam a expressão de genes mediada por factores de transcrição tais como NF-kB e AP-1. (DINARELLO, 2007). A ativação do NF-kB tem sido demonstrado em diversos modelos, dentre eles o modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. (CUZZOCREA et al., 2008).

3.1.2 A Pleurisia

A pleurisia caracteriza-se pela inflamação da pleura, membrana que recobre os pulmões, mediante uma agressão direta ou indireta à cavidade pleural, ocorrendo a ativação das células mesoteliais, e iniciando uma resposta inflamatória imediata. Com a persistência do estímulo, o processo se perpetua em função do recrutamento de mais células inflamatórias, principalmente neutrófilos, modulando a intensidade da resposta inflamatória. (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996).

Na pleurisia, a resposta inflamatória gerada pela carragenina (cg) promove o aumento da migração de leucócitos principalmente de neutrófilos e o extravasamento de proteínas vasculares no sítio inflamatório. O lavado pleural dos animais submetidos a esta inflamação apresenta um aumento na concentração de mediadores pró-

inflamatórios, o que permite a investigação de diferentes tipos de substâncias, como: fármacos, drogas e produtos naturais. (FRÖDE; SOUZA; CALIXTO, 2002).

A cg é um agente usado com frequência no modelo experimental de pleurisia. Esse modelo possibilita a avaliação da exsudação, da migração celular, bem como a participação de diversos mediadores como citocinas e enzimas. É caracterizado pelo aumento de leucócitos do tipo neutrófilos e da exsudação, 4 h após a administração da cg na cavidade pleural. No fluido da cavidade pleural de animais submetidos à inflamação por cg ocorre a liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios como citocinas, EROs, bradicinina, substância P e histamina, entre outros. (FRÖDE; SOUZA; CALIXTO, 2002; SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996).

Considerando que o modelo da pleurisia possui evidências que a partir da coleta do lavado na cavidade pleural é possível analisar e quantificar os componentes celulares e humorais da inflamação através de metodologias já validadas, possibilitando que diferentes agentes flogísticos possam ser comparados e estudados, optou-se por este modelo experimental para a avaliação anti-inflamatória e antioxidante das espécies de *C. glaziovii* e *C. pachystachya*.

3.1.3 Atividade anti-inflamatória de flavonoides

Estudos têm demonstrado significativas atividades farmacológicas atribuídas aos flavonoides, entre elas as atividades anti-inflamatória e antioxidante. (BOBE et al., 2010; LAGO et al., 2014; MIDDLETON et al., 2000).

Os efeitos anti-inflamatórios dos flavonoides estão relacionados a sua capacidade de modular a expressão gênica pró-inflamatória das enzimas ciclooxigenase (COX), lipooxigenase (LPO) e também através da ativação do fator nuclear (NF- κ B). (BASTIANETTO; ZHENG; QUIRION, 2000). O fator nuclear NF- κ B tem sido citado como um dos mais importantes reguladores pró-inflamatórios de expressão gênica sendo responsáveis por mediar a síntese de várias citocinas: TNF- α , IL-1 β , IL-6, e IL-8, bem como a COX-2. (TAK; FIRESTEIN; 2001; LEE et al., 1998).

É descrito também que os flavonoides exercem os efeitos anti-inflamatórios modulando as células inflamatórias, inibindo a proliferação de linfócitos T, das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β), controlando enzimas derivadas do ácido araquidônico e regulando a

formação do NO nos macrófagos. (MIDDLETON, KANDASWAMI, THEOHARIDES, 2000).

Durante a inflamação, os flavonoides neutralizam a formação de EROs e evitam a degradação do tecido conjuntivo. (KIM et al., 2004). Além disso, estes compostos possuem ação sobre a hialuronidase, uma enzima que durante o processo inflamatório participa da degradação de glicosaminoglicanas, componentes fundamentais da derme. (MEDZHITOV, 2010). Embora esta enzima seja importante para iniciar o processo de reparo do tecido, ela rompe a integridade do mesmo favorecendo a invasão de infectantes. Outras metaloenzimas são inibidas pelos flavonoides, como a elastase neutrofílica liberada durante o processo inflamatório. (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000). Vários autores atribuem esta atividade dos flavonoides em interagir com metaloenzimas ligando-se ao seu sítio ativo, à sua capacidade de quelar metais. (KIM et al., 2004; HENDRICH, 2006).

Também são descritas interações dos flavonoides com a enzima fosfolipase A₂, enzima responsável pela hidrólise de fosfolípídeos presentes nas membranas celulares, com a liberação do ácido araquidônico. (TOYAMA et al., 2014). Os produtos das hidrolises de fosfolipases e proteases são segundos mensageiros envolvidos em processos celulares na resposta inflamatória. (CASLAKE; PACKARD, 2005).

Outras enzimas oxigenases e peroxidases da cascata inflamatória como COX, xantina oxidase, MPO podem ser inibidas pelos flavonoides através de vários mecanismos, entre eles capturando seus substratos como EROs, quelando metais Fe²⁺ e Cu²⁺ ou atuando como substrato para enzimas evitando a oxidação de outras moléculas. (BELLIK et al., 2012; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). Os flavonoides podem atuar também na inibição de enzimas envolvidas no processo inflamatório assim como na migração de leucócitos ao sítio da inflamação. (CIZ et al., 2012; SANDHAR et al., 2011). No entanto, os mecanismos envolvidos na inibição destas enzimas, não estão totalmente elucidados. (LAGO et al., 2014).

CAPÍTULO 4

4 CAPÍTULO 4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *C. glaziovii* SNETH. (EMBAÚBA), UTILIZANDO-SE O MODELO DA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM RATOS

4.1 OBJETIVOS

- ✓ Avaliar o efeito anti-inflamatório do EA de *C. glaziovii* Sneth. sobre a migração dos leucócitos no lavado pleural no modelo da inflamação pleural induzido pela carragenina em ratos;
- ✓ Investigar o efeito do EA de *C. glaziovii* Sneth. sobre os níveis de proteínas totais, atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), sobre as concentrações dos metabólitos do óxido Nitrico (NO), do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e das interleucinas 1 β (IL-1 β) e IL-6 no lavado pleural;
- ✓ Verificar o efeito do EA de *C. glaziovii* Sneth sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar.
- ✓ Verificar o efeito do EA de *C. glaziovii* Sneth sobre o dano lipídico no tecido pulmonar e os níveis de grupos de proteínas carboniladas e sulfidrilas no tecido pulmonar;

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo será apresentado na forma de artigo, o qual descreve a caracterização química do EA, a avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, bem como a atividade anti-inflamatória do EA das folhas de *C. glaziovii* Sneth. (Embaúba), utilizando-se o modelo da pleurisia induzida pela carragenina em ratos.

4.3 PUBLICAÇÃO



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jep



Anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract of *Cecropia glaziovileaves*



Simony Davet Müller ^{a,1}, Drielly Florentino ^{b,1}, Caroline Flach Ortmann ^a, Fernanda Amélia Martins ^a, Lucinea Gainski Danielski ^b, Monique Michels ^b, Larissa de Souza Constantino ^a, Fabricia Petronilho ^b, Flavio Henrique Reginatto ^{a,b}

^aLaboratório de Farmacognóia, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC, Florianópolis, SC, Brazil ¹Laboratório de Fitopatologia Clínica e Experimental, Programa de Pós Graduação em Ciência da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina/UNISUL, Tubarão, SC, Brazil

article info

Article history:
Received 1 October 2015
in revised form
4 March 2016
Accepted 5 March 2016
Available online 7 March 2016

Keywords:
Cecropia glaziovii
Phenolic compounds
HPLC
Inflammation
Oxidative damage
abstract

Ethnopharmacological relevance: *Cecropia glaziovii* leaves extract is widely used as a traditional folk medicine in Brazil, especially for the treatment of diabetes, and as an antihypertensive and anti-inflammatory agent.

Aim of the study: To investigate the anti-inflammatory and antioxidant properties of crude aqueous extract (CAE) of *C. glaziovii* leaves.

Materials and methods: The *in vivo* anti-inflammatory and antioxidant effect of the CAE (10–300 mg/kg, intragastrically) was investigated in the animal model of pleurisy. The cell migration, proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6), nitrite/nitrate concentration, myeloperoxidase (MPO) activity, oxidative damage in lipids and proteins, lactate dehydrogenase (LDH) activity and total protein content were also analyzed. Furthermore, the *in vitro* antioxidant activity of CAE was evaluated by the inhibition of formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), induced by free radical generators (H₂O₂, FeSO₄ and AAPH) on a lipid-rich substrate. Hence, the chemical characterization of CAE by HPLC was therefore performed.

The results showed that the inflammatory process caused by the administration of carrageenin (Cg) into the pleural cavity resulted in a substantial increase in inflammatory parameters and oxidative damage. These levels seems to be reversed after CAE treatment in animals with similar results to Dexamethasone (Dex) treatment. Further, the CAE was effective in reducing proinflammatory cytokines, cell infiltrate, MPO activity, nitrite/nitrate concentration, LDH activity, and total protein levels with concomitant attenuation of all parameters associated with oxidative damage induced by Cg. Finally, the CAE presented *in vitro* antioxidant activity induced by free radical generators at all the concentrations investigated. HPLC analysis confirmed the presence of chlorogenic acid and C-glycosylflavonoids (isorientin and isovitexin) as the major compounds of the CAE.

Conclusion: CAE of *C. glaziovii* exerts significant anti-inflammatory and antioxidant activities and this effect can be attributed, at least in part, to the presence of chlorogenic acid and the C-glycosylflavonoids. © 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Prolonged use of anti-inflammatory drugs, particularly in high dosage and prolonged can provoke diminished resistance to infections, aggravation of ulcers, and osteoporosis (Da Silva et al., 2014). In addition, the use of COX-2 selective inhibitors is also associated with increased risk of cardiovascular disease (Recio et al., 2012). In this context, it is important to identify drugs that can promote a reduction in inflammation process.

^{*}Corresponding author.

E-mail address: flavio.reginatto@ufsc.br (F.H. Reginatto).
These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.067> 0378-8741/© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

known as ‘embabaiva-vermelha’ or ‘árvore-da-preguiça’, is traditionally used in Latin American folk medicine to treat heart and lung problems, as well as diuretic, antihypertensive and anti-inflammatory agent (Lopez et al., 2008; Matus, 2008).

Some pre-clinical studies in the literature have confirmed its antihypertensive, bronchodilator, hepatoprotective, anxiolytic and antidepressant effects

Cecropia genus (Urticaceae) is a native tree of Central and South America that comprises 70–80 species (Souccar et al., 2008). It is commonly used in traditional medicine, with a broad range of therapeutic applications (Andrade-Cetto and Heinrich, 2005; Consolmi et al., 2006; Perez-Guerrero et al., 2001; Ramos Almeida et al., 2006; Rejns et al., 2006). *Cecropia glaziovii* Smet., popularly

(Delaroca et al., 2007; Lima-Landman et al., 2007; Petronilho et al., 2012; Rocha et al., 2002; Souccar et al., 2008; Tanae et al., 2007). Regarding its chemical composition, procyanidins, catechins, chlorogenic and caffeic acid, and flavonoids (Costa et al., 2011; Petronilho et al., 2012; Tanae et al., 2007) have been reported as the major compounds of the aqueous extracts.

Polyphenols have traditionally been found to have antioxidant activity and act by two major modes against reactive oxygen species (ROS). The first, consists of a direct ROS-scavenging mechanism, with favorable modulation of the activity of ROS-removing and endogenous antioxidant-synthesizing enzymes. The second mode of antioxidant action consists of direct inhibitory action of polyphenols on the metal-dependent formation of free radicals (i.e., superoxide and hydroxyl), and on ROS-producing enzymes (Sandoval-Acuña et al., 2014; Singh et al., 2014).

Under pathological circumstances related to inflammatory process, excessive production of polymorphonuclear neutrophil derived ROS, such as hydrogen peroxide, superoxide, and hydroxyl radicals determine the secondary formation of other oxygen radicals, which react with biological targets to promote endothelial cell damage and recruit neutrophils at the sites of inflammation, lipid peroxidation, and DNA single-strand damage (MacNee, 2001).

Therefore, in the present study, we investigated the in vitro antioxidant effects of crude aqueous extract (CAE) of *C. glaziovii* leaves, as well as its in vivo anti-inflammatory activity on the inflammatory response caused by carrageenan in the mouse pleurisy model. In particular, we investigated the in vitro lipid peroxidation induced by several inducers of oxidative stress, and in vivo lipid peroxidation on (i) lactate dehydrogenase (LDH) activity, total protein, cell infiltrate, proinflammatory cytokines release (TNF- α , IL-1 β and IL-6), nitrite/nitrate concentration in the pleural exudate and (ii) the formation of lipid peroxidation, protein carbonylation, and sulfhydryl (SH) group and neutrophil infiltration in the lung tissue.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The leaves of *C. glaziovii* were collected in Florianópolis, Santa Catarina State, Brazil. A voucher specimen was identified by Dr. Daniel Falkenberg, and deposited in the Herbarium of the Universidade Federal de Santa Catarina (FLOR 37143).

2.2. Crude aqueous extract (CAE)

The leaves of *C. glaziovii* (500 g) were air-dried at (35–40 °C), crushed, and stored in a closed container. The crushed material was then subjected to extraction by infusion at 1:10 (m/v) for 30 minutes. The extract was filtered, freeze-dried and stored at 20 °C until use.

2.3. Chemical characterization

Qualitative and quantitative analyses of CAE were performed as previously described (Costa et al., 2011). Briefly, a PerkinElmer Series 200 HPLC was used, consisting of a Photodiode Array Detector (PDA), quaternary pump, autosampler and online degasser. The data acquisition system was Chromat software. The separation was performed in a PerkinElmer Brownlee Choice C18 column (1.50 mm 4.6 mm i.d., 5 mm) with a gradient of solvent A (acetonitrile) and solvent B (acetic acid 1%, adjusted to pH 3.0) as follows: 5–20% A (0–30 min) and isocratic 20% A (30–40 min) as mobile phase. The flow rate was kept at 1.0 mL/min. The chromatograms were recorded at 340 nm while the UV spectra were monitored over a range of 200–450 nm. All standard solutions were analyzed in triplicate.

2.4. Chemical compounds studied in this article

Chlorogenic acid (PubChem CID: 1,794,427); Isoviolin (PubChem CID: 162,350); Isoorientin (PubChem CID: 114,776).

2.5. In vitro antioxidant activity assay

The in vitro antioxidant activity of CAE was estimated by the inhibition of formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) induced by three different free radical generators in a lipid rich substrate (Silva et al., 2007). Briefly, 500 mL of 0.1% (w/v) lipid homogenate in phosphate buffer (pH 7.4) was mixed with 500 mL of trichloroacetic acid (10%) and centrifuged at 1,200 g (10 min). The CAE at different concentrations (0.02, 0.2, 2.0, 20 and 200 mg/mL) was added to a test tube, together with 2,2'-azobis (Zamidino-propane) dichloride (AAPH 0.5 M), iron sulfate (FeSO₄) (0.145 mM) or hydrogen peroxide (H₂O₂) (0.4 M) solutions to induce lipid peroxidation. The tubes were incubated at room temperature for 15 min, and 500 mL of thiobarbituric acid (TBA 0.67%) was added and heated at 100 °C for 30 min. After cooling, the absorbances were measured by a spectrophotometer (Microanal) at 532 nm, and the results were expressed as nmol malondialdehyde equivalents (MDA)/mL of substrate.

2.6. In vivo assays

2.6.1. Animals

Male Wistar rats (weighing 250–300 g) were used in this study and obtained from the Central Animal Facility of the University of Vale do Itajaí/UNIVALI. The animals were separated into boxes with five rat each box, with free access to food and water and maintained in 12 h light-dark cycles at 22 °C (71 °F). All experimental procedures involving animals were performed according with the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals for scientific and teaching purposes - (DBCA-2013) in accordance with the US guidelines (NIH publication #85-23, revised in 1996), with the approval of the Ethics Committee of the Universidade do Sul de Santa Catarina/UNISUL (number 12.021.4.03 IV).

2.6.2. Experimental groups

Rats were randomly allocated to the following groups:

- (1) Control. Rats received saline/vehicle (water) (N₃₆);
- (2) Cg₀vehicle (water). Rats were subjected to Cg-induced pleurisy (N₃₆);
- (3) Cg₀dexamethasone (dex). Same as the Cg₀vehicle group, except that dex (0.5 mg/kg i.p.) was administered one hour after Cg as reference drug (N₃₆);
- (4) Cg₀C. glaziovii CAE (10 mg/kg). Same as the Cg₀vehicle group, except that C. glaziovii CAE (10 mg/kg intragastrically) was administered one hour after Cg (N₃₆);
- (5) Cg₀C. glaziovii CAE (25 mg/kg). Same as the Cg₀vehicle group, except that C. glaziovii CAE (25 mg/kg intragastrically) was administered one hour after Cg (N₃₆);
- (6) Cg₀C. glaziovii CAE (100 mg/kg). Same as the Cg₀vehicle group, except that C. glaziovii CAE (100 mg/kg intragastrically) was administered one hour after Cg (N₃₆);
- (7) Cg₀C. glaziovii CAE (300 mg/kg). Same as the Cg₀vehicle group, except that C. glaziovii CAE (300 mg/kg intragastrically) was administered one hour after Cg (N₃₆).

2.6.3. Carrageenan-induced pleurisy

Induction of pleurisy was performed according to Vinegar et al. (1973). The rats were anesthetized with ketamine hydrochloride (80 mg/kg) and

xylazine (10 mg/kg), and a skin incision was made at the level of the left sixth intercostal space. The rats received 0.2 mL of saline containing 2% A-carrageenan or saline (control) in the pleural cavity. The skin incision was closed using a suture and one hour later, the animals were treated with different doses of the CAE or water only (control). Four hours after the Cg injection, the animals were killed, and approximately 1 mL of pleural exudate was obtained from each animal to determine the total cell count, LDH activity, nitrite/nitrate concentration, and cytokine levels. Lung tissue samples were also taken, to evaluate myeloperoxidase (MPO) levels, and oxidative damage parameters.

2.6.4. Quantification of cell migration, total protein and LDH

Cell migration, as an indicator of inflammation, was determined by the cell count in the pleural exudate, in a Neubauer chamber as previously described (Albano et al., 2013). The LDH activity was determined using commercial kits (Analisa – LDH UV-PP), and while total protein content was measured at 700 nm by the Method of Lowry using bovine serum albumin as standard (Lowry et al., 1951).

2.6.5. Quantification of nitrite/nitrate concentration

Total nitrite concentration in the pleural exudate was measured using the Griess reaction, by adding 100 μ L of Griess reagent [0.1% (w/v) naphthylethylenediamide dihydrochloride in H₂O and 1% (w/v) sulphaniilamide in 5% (w/v) concentrated H₃PO₄], vol. [1:1] to the 100 μ L sample. The nitrite/nitrate concentration was measured spectrophotometrically at 550 nm. The results were expressed as nitrite/nitrate concentration (mmol/mg protein) (Green et al., 1982).

2.6.6. Measurement of cytokine levels

Concentrations of TNF- α , IL-1 β and IL-6 were determined in the pleural exudate and this colorimetric assay was performed using a commercial ELISA kit (Caltchem-Novabiochem Corporation, USA).

2.6.7. Determination of myeloperoxidase activity in the lung tissue

The lung tissue was homogenized (50 mg/mL) in hexadecyltrimethylammonium bromide 0.5% and centrifuged at 15,000 rpm for 40 min. Next, an aliquot of the supernatant was mixed with a solution of tetramethylbenzidine 1.6 mM and 1 mM H₂O₂. The MPO activity was measured spectrophotometrically at a wavelength of 650 nm at 37 °C and the results were expressed as mU/mg protein (De Young et al., 1989).

2.6.8. Determination of oxidative damage parameters

The formation of TBARS during an acid-heating reaction is widely adopted as a sensitive method for measuring lipid peroxidation. Briefly, lung tissue samples were homogenized and mixed with 1 mL of 10% trichloroacetic acid and 1 mL of 0.67% TBA. Subsequently, these were then heated in a water bath at

100 °C for 30 min. The equivalent of malondialdehyde (MDA) was determined by the absorbance at 532 nm using 1,1,3,3-tetraethoxypropane as external standard. The results were expressed as MDA equivalents (nmol/mg protein) (Draper and Hadley, 1990).

Oxidative damage to proteins was assessed by determining the level of carbonyl groups, based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH). Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid and redissolved in DNPH, and the absorbance was monitored at 370 nm. The proteins were expressed as total carbonyl content (nmol/mg of protein) (Levine et al., 1990).

Another method of assessing the oxidative damage to proteins is through SH group formation. Oxidative damage was analyzed by the amount of thiol groups in total lung homogenate, using the 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) method as previously described, with minor modifications (Aksenov and Markesbery, 2001). Briefly, 30 μ L of a sample was mixed with 1 mL of PBS/ 1 mM EDTA (pH7.5). The reaction was initiated by the addition of 30 μ L of 10mM D TNB stock solution in PBS. After 30 min of incubation at room temperature and absorbance at 412 nm, the amounts of TNB formed equivalent to the amount of SH groups were calculated.

2.6.9. Quantification of proteins

The quantity of proteins in the determination of nitrite/nitrate concentration, MPO activity, TBARS test, protein carbonyl and SH groups was measured using the Lowry method (Lowry et al., 1951).

2.6.10. Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm SD and $p < 0.05$ was considered significant. The differences among the groups were determined by One-way Analysis of Variance, followed by the post hoc Tukey test. All the analyses were performed in SPSS 20.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL).

3. Results

3.1. Phytochemical characterization

The HPLC analysis of the CAE of *C. glaziovii* showed (1) chlorogenic acid, (2) isoorientin and (3) isovitexin as the major compounds (Fig. 1).

3.2. Effect of CAE on in vitro antioxidant activity

The CAE antioxidant activity was verified at all the different concentrations (0.02, 0.2, 2, 20, and 200 μ g/mL, respectively) inhibiting the formation of TBARS induced by free radicals generators (AAPH, FeSO₄ and H₂O₂), and showing significant dose-dependent antioxidant activity, including concentrations as low as 0.02 mg/mL (Table 1).

3.3. Effect of CAE on inflammatory and oxidative damage parameters on Cg-induced pleurisy

3.3.1. Acute pleural inflammation and cell damage

The effects of CAE on inflammatory cell recruitment into the pleural cavity are illustrated in Fig. 2. Carrageenan-induced pleurisy displayed a substantial increase in leukocytes number in the pleural cavity compared with control rats, while the treatment with dex or CAE (100 and 300 mg/kg) decreased cells migration in the pleural cavity compared to the Cg group.

When compared to the control animals, administration of Cg resulted in an increase in LDH and total protein levels in the pleural exudates (Fig. 3A and B respectively). The level of these pleural cell injuries was significantly attenuated by the treatment with dex and to the same degree, by the treatment with CAE (25, 100 and 300 mg/kg).

Carrageenan-induced pleurisy displayed a substantial increase in the TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels in pleural exudates compared to the control group (Fig. 4A, B and C respectively). Production of TNF- α and IL-1 β was significantly reduced in Cg-injected rats treated with CAE (100 and 300 mg/kg) with similar results compared with dex. However, the treatments with CAE and dex did not show a decrease in IL-6 levels.

In the nitrite/nitrate concentration evaluation after Cg administration, a significant increase was observed when compared to the control group (Fig. 5). On the other hand, the group

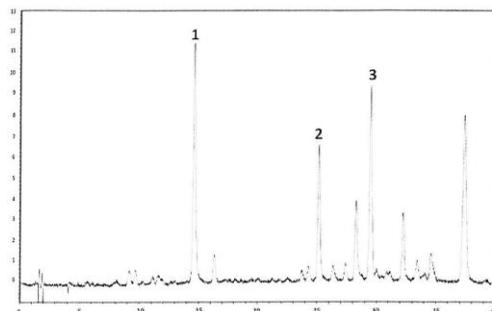


Fig. 1. HPLC chromatographic profile of *C. glaziovii* CAE with detection at 340 nm. (1) chlorogenic acid, (2) isorutin, (3) isovitexin. For chromatographic conditions, see Section 2.

Table 3
Inhibition of lipid peroxidation by CAE induced by free radicals generators (H₂O₂, FeSO₄ and AAPH).

Extract and free radicals generators	MDA (nmol/mL substrate)					
	Control	0.02 mg/mL	0.2 mg/mL	2 mg/mL	20 mg/mL	200 mg/mL
CAE	0.71070.021					
AAPH	1.24170.042 ^a					
AAPH+CAE		0.87770.051 ^{a,b}	0.92570.011 ^{a,b}	0.88870.014 ^{a,b}	0.87570.017 ^{a,b}	0.96670.148 ^{a,b}
H ₂ O ₂	1.09870.017 ^a					
H ₂ O ₂ +CAE		0.73570.095	0.72170.004	0.63670.067	0.55270.021	0.50370.023 ^a
FeSO ₄	1.17670.017 ^a					
FeSO ₄ +CAE		0.72870.140 ^a	0.60070.018 ^b	0.58970.047 ^a	0.56270.025 ^a	0.45570.057 ^a

Each value represents mean \pm S.D.^a

^a Different from control ($p < 0.05$).

^b Different from H₂O₂, FeSO₄, AAPH groups ($p < 0.05$).

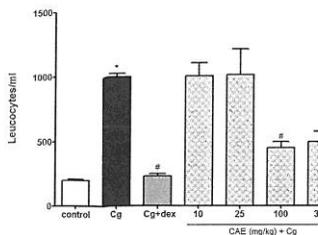


Fig. 2. Effects of *C. glaziovii* CAE (10–300 mg/kg) administered intragastrically in the murine model of pleurisy induced by Cg on leucocyte count in the pleural exudate. The negative control group was treated only with saline solution (0.9% NaCl). Cg is the positive control group with animals treated with Cg only. Dex is the group of animals treated with dexamethasone (0.5 mg/kg intraperitoneally). Bars indicate the mean \pm S.D. of 6 animals, * $p < 0.05$ compared to the control group and # $p < 0.05$ compared to the Cg group.

treated with CAE (10, 25, 100 and 300 mg/kg) presented a significant reduction in nitrite/nitrate concentrations in the pleural exudate, with similar levels as those observed for the dex group.

3.3.2. Acute lung inflammation and oxidative damage

We also investigated the effect of CAE on the presence of neutrophils by measuring the MPO activity in the lung tissues, which was found to be significantly elevated at 4 h after Cg administration (Fig. 6). In addition, in rats treated with CAE (25–300 mg/kg), MPO activity in the lungs was significantly reduced compared to the Cg group.

Pulmonary injury in the Cg-treated animals was also characterized by an increase in the tissue levels of MDA, indicative of lipid peroxidation (Fig. 7A). MDA levels were significantly enhanced in lungs collected from Cg-treated rats when compared to those of the control group. Nonetheless, the animals treated with CAE (25–300 mg/kg) showed significantly reduced MDA levels, with similar results compared to the dex group. In addition, Cg increased the carbonyls groups and decreased the free SH group, and these effects were reversed by CAE treatment (Fig. 7B and C respectively).

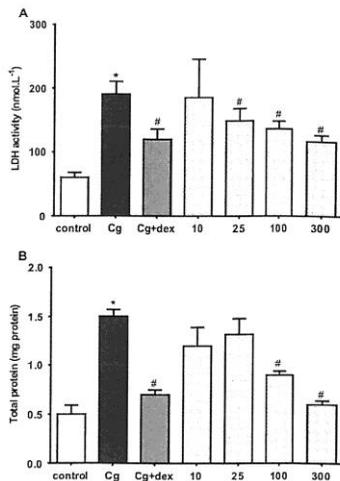


Fig. 3. Effects of *C. glaziovii* CAE (10–300 mg/kg) administered intragastrically in the murine model of pleurisy induced by Cg on LDH activity (A) and total protein (B) in the pleural exudate. The negative control group was treated only with saline solution (0.9% NaCl). Cg is the positive control group with animals treated with Cg only. Dex is the animals treated with dexamethasone (0.5 mg/kg intraperitoneally). Bars indicate the mean \pm S.D. of 6 animals, * $p < 0.05$ compared to the control group and # $p < 0.05$ compared to the Cg group.

4. Discussion

In this study, we report the effects of the CAE from *C. glaziovii* leaves on *in vitro* lipid peroxidation and in a well-established murine model for acute inflammation induced by Cg. The CAE showed a significant *in vitro* antioxidant profile against three free radical generators on lipid rich substrate. Furthermore, acute administration of CAE exhibited pronounced *in vivo* anti-inflammatory activity, characterized by the inhibition of leucocyte influx, nitrite/nitrate content, TNF- α and IL-1 β into the pleural cavity, as well as neutrophil infiltrate into the lung tissue in the acute model of inflammation caused by intrapleural administration of Cg. Moreover, CAE elicited important action against oxidative damage in lipids and proteins. Taken together, we show, for the first time, that oral treatment of *C. glaziovii* with CAE can effectively interfere in the inflammatory process in pleurisy induced by Cg.

The Cg-induced animal pleurisy model has been widely used to investigate the mechanisms involved in the acute inflammation, and to test the effectiveness of anti-inflammatory drugs (Froelke et al., 2009; Petronilho et al., 2010; Saleh et al., 1999). Cg administration leads to increased stimulus of the immune system, characterized by cell migration and, consequently, a continuous inflammatory process in the pleural serous layer, which results to

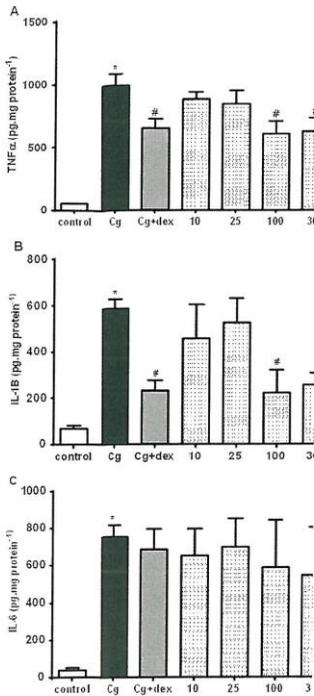


Fig. 4. Levels of TNF- α (A), IL-1 β (B) and IL-6 (C) levels in pleural exudates of rats subjected to Cg administration and treated with C. glaziovii CAE (10–300 mg/kg) intragastrically. The negative control group was treated only with saline solution (0.9% NaCl). Cg is the positive control group with animals treated with Cg only. Dex is the group of animals treated with dexamethasone (0.5 mg/kg intraperitoneally). Bars indicate the mean \pm S.D. of 6 animals, **p*0.05 compared to the control group and #*p*0.05 compared to the Cg group.

the pleura being highly permeable with parenchymal lung damage and finally, lung dysfunction by cell death mediated by oxidative damage (Kroegel and Antony, 1997; Ward, 2010).

The activation of resident macrophages and epithelial cells for the recruitment and activation of cell types such as neutrophils, eosinophils, monocytes and lymphocytes involve the inflammatory process (Lunardelli et al., 2006).

Thus, in the pathogenesis of most inflammatory pleural effusions, the immune cell response seems to be the predominant mechanism involved (Wu et al., 2014). Studies have also shown that cell influx into the pleural

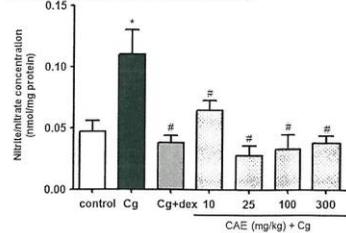


Fig. 5. Nitrite/nitrate concentration in pleural exudates of rats subjected to Cg administration and treated with C. glaziovii CAE (10–300 mg/kg) intragastrically. The negative control group was treated only with saline solution (0.9% NaCl). Cg is the positive control group with animals treated with Cg only. Dex is the group of animals treated with dexamethasone (0.5 mg/kg intraperitoneally). Bars indicate the mean \pm S.D. of 6 animals, **p*0.05 compared to the control group and #*p*0.05 compared with Cg group.

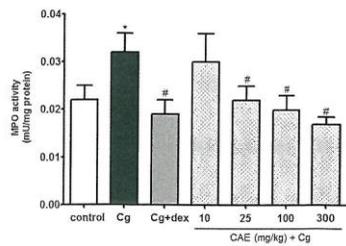


Fig. 6. Myeloperoxidase activity in lung tissue of rats subjected to Cg administration and treated with C. glaziovii CAE (10–300 mg/kg) intragastrically. The negative control group was treated only with saline solution (0.9% NaCl). Cg is the positive control group with animals treated with Cg only. Dex is the group of animals treated with dexamethasone (0.5 mg/kg intraperitoneally). Bars indicate the mean \pm S.D. of 6 animals, **p*0.05 compared to the control group and #*p*0.05 compared to the Cg group.

cavity occurs after the release of chemotactic cytokines by pleural mesothelial cells, in response to other cytokines (Antony et al., 1993). Another important mediator in acute inflammation is nitric oxide (NO). NO is a potent vasodilator, and its involvement in the inflammatory response may be related to the ability to increase vascular permeability and edema, through changes in local blood flow (Moncada et al., 1991; Moncada and Higgs, 1993). It was suggested that NO is involved in the development of inflammation, at early time points following Cg administration (Salvemini et al., 1996). In this sense, we verified that oral administration of CAE of C. glaziovii at higher doses in a murine model of pleurisy induced by Cg, presented inhibition of inflammatory mediators such as TNF- α , IL-1 β and nitrite/nitrate (final metabolites of NO in water) followed by decreased cell migration into the pleural cavity, with a similar effect to that of Dex.

In acute inflammation processes, such as acute lung injury induced by Cg, the major cells involved are neutrophils (Pohanka, 2013). Neutrophils are rapidly mobilized, and are the first cells to

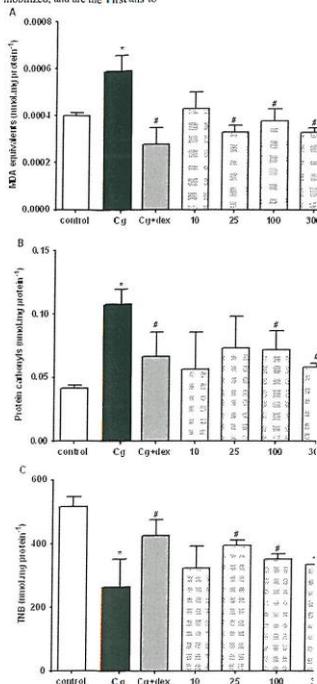


Fig. 7. Oxidative damage in lipid through thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) measurement (A), in proteins with protein carbonylation (B) and free lipid groups (C) determination in lung tissue of rats subjected to Cg administration and treated with C. glaziovii CAE (10–300 mg/kg) intraperitoneally. The negative control group was treated only with saline solution (0.9% NaCl). Cg is the positive control group with animals treated with Cg only. Dex is the group of animals treated with dexamethasone (0.5 mg/kg intraperitoneally). Bars indicate the mean \pm S.D. of 6 animals, * $p < 0.05$ compared to the control group and # $p < 0.05$ compared to the Cg group.

arrive at the lesion site, where they phagocytose and kill pathogens using different mechanisms, such as release

of enzymes and ROS generation (Li and Ng, 2012). Thus, uncontrolled inflammatory processes can lead to host tissue damage; control of neutrophil migration into the lesion site is an important factor for limiting the inflammatory process, and may represent a therapeutic strategy. As far as we are aware, this is the first report that the oral treatment with CAE of C. glaziovii reduces Cg-induced MPO activity, which may contribute to the inhibitory effect on the neutrophils, since this proinflammatory enzyme can reflect the activation of neutrophils.

In addition, activation and accumulation of neutrophils is one of the hallmarks of initial tissue injury, due to the release of ROS, which play a key role in lung injury associated with acute inflammation in both animal and clinical studies (Albano et al., 2013; Huang et al., 2013; Petronilho et al., 2010; Turowski et al., 2015). These species are cytotoxic agents, inducing lipid peroxidation and other cellular oxidative stress by cross-linking proteins, lipids and nucleic acids, which in turn, cause cellular dysfunction, damage and eventually death (Pisocchi and Pop, 2015). The antioxidant action of C. glaziovii hydroethanolic extract against in vitro lipid peroxidation has previously been demonstrated (Petronilho et al., 2012). In this study, we corroborate this evidence by using CAE of C. glaziovii in vitro analyses and lung tissue injury induced by Cg administration. The extract at all concentrations tested inhibited TBARS formation induced by all indicators of oxidative stress, showing significant antioxidant activity, including physiologically relevant concentrations. These results showed that C. glaziovii CAE could act as a lipid peroxidation chain breaker, direct scavengers of peroxyl/hydroxyl/hydrogen peroxide and iron chelator, data that also corroborates our results detected in the in vivo analyses.

Furthermore, it is well recognized that LDH and protein are released into the extracellular medium during cell injury associated with inflammation and oxidative stress and are recognized as markers of processes involved with the progression of pleural disease (Segura, 2004). Thus, we observed that the anti-inflammatory and antioxidant activity of C. glaziovii CAE may be directly related to the decrease in LDH and protein levels shown in the present study.

In conclusion, this study demonstrates, for the first time, that CAE of C. glaziovii leaves possess in vitro and in vivo antioxidant capacity, as shown by the inhibition of lipid peroxidation, and could effectively interfere in the inflammatory process in pleurisy induced by Cg. These related mechanisms appear to be linked to the reduction in cytokines production, NO formation, cell infiltrate in the pleural cavity, and the increase of neutrophil recruitment and oxidative damage, which may lead to a decrease in tissue injury. Finally, the results demonstrate that C. glaziovii CAE could efficiently act as antioxidant and anti-inflammatory agents, in similar fashion to dex, representing a potential strategy for antioxidant design with novel perspectives in inflammatory disease.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

Monique Michels, Larissa de Souza Constantino, Fabricia Petronilho and Flavio Henrique Reginaldo participated in the design of the study, and drafted the manuscript. Simony Davet Müller, Caroline Flach Ortman, Fernanda Amélia Martins, Drielly Florentino, Lucineia Gainski Danielski participated in the design of the study and in the data collection. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments

This work was performed with financial support from CNPq (Grant nos. 307677/2015-0 and 302546/2012-3), and FAPESP (Grant no. Proim 2771/2012). The authors F. Petronillo and FH Reginaldo are also grateful to CNPq and CAPES for their research fellowships.

References

- Aksetov, M.Y., Markskery, W.R., 2001. Changes in thiol content and expression of Glutathione reductase system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 302, 141–145.
- Albano, M.N., da Silva, M.R., Dimeoli, L.G., Florentino, D., Petronillo, F., Figueira, A.P., 2013. Anti-inflammatory and antioxidant properties of Hydrocotyle crude extract from *Casaria sylvestris* Sw. (Salaicaceae). *J. Ethnopharmacol.* 147, 612–617.
- Andrés-Centó, A., Heinrich, M., 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 99, 325–343.
- Antony, V.B., Godby, S.W., Sankal, S.L., Han, J.W., Hartman, D.L., Burdick, M.D., Strieter, R.M., 1995. Recruitment of inflammatory cells to the pleura space: demostates cytokines IL-8, and monocyte chemoattractant peptide-1 in human pleural fluids. *J. Immunol.* 151, 7216–7225.
- Casasoli, A.E., Ragnoni, M.L., Miglio, G.N., Confon, P., Volante, M.G., 2006. Cardioactive and sedative effects of *Crotopia puchanovii* Mart. (Asteraceae) on isolated rat hearts and conscious mice. *J. Ethnopharmacol.* 106, 90–96.
- Couts, G.A., Orman, C.F., Schenk, E.P., Reginato, F.H., 2011. An HPLC-DAD method to quantitate of main phenolic compounds from leaves of *Crotopia species*. *J. Braz. Chem. Soc.* 22, 1096–1102.
- Da Silva, A.O., Damasceno Aires, A., Almeida, D.A., Balgoin, S.O., de Oliveira, R.G., Aires, A. Soares, I.M., Maroso-Azeiteiro, P.G., Azeiteiro, S.D., de Oliveira Martins, D.T., 2014. Evaluation of anti-inflammatory and mechanism of action of extract of *Macrophragma longiflorum* (Desf.) Mill. *Arg. J. Ethnopharmacol.* 154, 319–329.
- De Young, L.M., Kheifets, J.B., Ballaran, S.J., Young, J.M., 1989. Edema and cell infiltration in the pleural space-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions* 26, 335–341.
- Delarriera, S., Lima-Landman, M.T., Souza, C., Cysneiros, R.M., Tanne, M.M., Lapa, A.J., 2007. Inhibition of histamine-induced bronchospasm in Guinea pigs treated with *Crotopia glaziosi* Smith and correlation with the *in vitro* activity in Tracheal muscles. *Phytochemistry* 14, 278–322.
- Drape, H.H., Ishley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186, 421–431.
- Frede, T.S., Duss, Z.S., Reis, O.G., Mendonça, Y.S., 2009. Evidence of anti-inflammatory effect of *Protoparica* in the murine pleurisy model induced by carrageenan. *Int. Immunopharmacol.* 9, 1394–1400.
- Green, J.C., Wagner, D.A., Govek, J., Slaughter, P.L., Wikoski, J.S., Tomsham, S.R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126, 131–138.
- Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publication No. 85-23, revised 1996.
- Huang, R., Zhong, T., Wu, H., 2015. Quercetin protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats through suppression of inflammation and oxidative stress. *Arch. Med. Sci.* 11, 427–432.
- Kregel, C., Antony, V.B., 1997. Immunology of pleural inflammation: potential implications for pathogenesis, diagnosis and therapy. *Eur. Respir. J.* 10, 2411–2418.
- Levine, R.L., Garland, D., Clifton, C.N., Amici, A., Clifton, A., Lenz, A.G., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464–478.
- Li, J.L., Ng, L.G., 2012. Peeking into the secret life of asarolactone. *Immunol. Res.* 33, 168–181.
- Lima-Landman, M.T.R., Bezerra, A.C.R., Cysneiros, R.M., De Lima, T.C.M., Souza, C., Lapa, A.J., 2007. Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Crotopia glaziosi* Smith in rats: *in vivo* approach to the hypotensive mechanism. *Phytochemistry* 14, 314–320.
- Lorenzi, H., Matsui, F.J.A., 2008. *Fitoterapia Medicinal: Os Benefícios Naturais e Evidências*. Instituto Plantarum de Estudos da Flessa Ltda, Nova Odessa, pp. 520–521.
- Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lumakilla, A., Leite, C.F., Pires, M.G.S., Oliveira, J.R., 2006. Extract of the bristles of *Dierpis* sp. increases nitric oxide in a rat pleurisy model. *Inflamm. Res.* 55, 129–135.
- MacNee, W., 2001. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Lar. J. Pharmacol.* 229, 195–207.
- Moncada, S., Higgins, A., 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl. J. Med.* 329, 2002–2012.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A., 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109–141.
- Peréz-Guerrero, C., Herrera, M.D., Ortiz, R., Alvarez de Sotomayor, M., Fernández, M. A., 2001. A pharmacological study of *Crotopia obtusifolia* Bertol. aqueous extract. *J. Ethnopharmacol.* 78, 279–284.
- Petronillo, F., de Souza, B., Violin, F., Benetton, C.A., Streck, E.L., Roselar, R., Schwartsmann, G., Dal-Pizzol, F., 2010. Protective effect of gastrin-releasing peptide receptor antagonist in carrageenan-induced pleural inflammation in rats. *Inflamm. Res.* 59, 781–789.
- Petronillo, F., Dal-Pizzol, F., Costa, I.M., Kappel, V.D., de Oliveira, S.O., Formoso, J., Cifardini-Zanette, B., Moreira, J.C., Simões, C.M., Dal-Pizzol, F., Reginaldo, F.H., 2012. Hepatoprotective effects and HSV-1 activity of the hydroethanolic extract of *Crotopia glaziosi* (Eimbanha-Vernholti) against acyclovir-resistant strain. *Pharm. Biol.* 50, 911–918.
- Piscose, A.M., Pop, A., 2005. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *Eur. J. Med. Chem.* 40, 57–74.
- Puhankka, M., 2013. Role of oxidative stress in infectious diseases. *A review. Folia Microbiol. (Praha)* 58, 503–513.
- Ramos Almeida, R., Motomi Raimundo, J., Rodrigues Oliveira, R., Coelho Kaplan, M. A., Rocha Gomes, C., Sique, R.T., Zappavolo, G., 2006. Activity of *Crotopia lychnis* extract on contractility of cardiac and smooth muscles in Wistar rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33, 109–113.
- Rocha, M.C., Anahaj, I., Rios, J.L., 2012. Anti-inflammatory agents from plants: progress and potential. *Curr. Med. Chem.* 19, 2088–2103.
- Rocha, F.F., Lapa, A.J., Da Lima, T.C.M., 2002. Evaluation of the anxiolytic-like effects of *Crotopia glaziosi* Smith in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71, 183–190.
- Rojas, J.I., Ochoa, V.J., Osampo, S.A., Munoz, J.F., 2006. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: a possible alternative in the treatment of non-mucococcal infections. *BMC Complement. Altern. Med.* 6, 2.
- Salek, T.S.F., Calzate, J.B., Medina, Y.S., 1999. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. *Papuleto* 20, 649–656.
- Salvemini, D., Wang, Z.Q., Wyatt, P.S., Bourdon, D.M., Martin, M.L., Manning, P.T., Currie, M.G., 1996. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phases of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 118, 829–838.
- Sardoval-Acueta, C., Ferrera, J., Sprisky, H., 2014. Polyphenols and micronutrients: an update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent action. *Arch. Biochem. Biophys.* 559, 75–80.
- Segura, R.M., 2004. Useful clinical biological markers in diagnosis of pleural effusions in children. *Pediatr. Respir. Rev.* 5A, S205–S212.
- Silva, E.G., Bahr, G.A., Zanotto-Filho, A., Lorenzi, R., Panigali, M.A., Ravazoli, G.F., Bordignon, C.L., Silva, F.A., Abov, A.L., Bassani, V.L., Henriques, A.T., Reginaldo, F.H., Dal-Pizzol, F., Moreira, J.C., 2007. Antioxidant activities and free radical scavenging potential of *Bauhinia microstachya* (RADDI) MACBR (Cresolaginaceae) extract linked to their polyphenol content. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 1488–1496.
- Singh, M., Kaar, M., Shikari, O., 2014. Flavones: an important scaffold for medicinal chemistry. *Eur. J. Med. Chem.* 84, 200–229.
- Souza, C., Cysneiros, R.M., Tanne, M.M., Torre, L.M.B., Lima-Landman, M.T.R., Lapa, A.J., 2008. Inhibition of gastric acid secretion by a standardized aqueous extract of *Crotopia glaziosi* Smith and underlying mechanism. *Phytochemistry* 15, 462–469.
- Tanne, M.M., Lima-Landman, M.T.R., De Lima, T.C.M., Souza, C., Lapa, A.J., 2007. Chemical standardization of the aqueous extract of *Crotopia glaziosi* Smith endowed with antihypertensive, bronchodilator, antiacid secretion and antidepressant-like activities. *Phytochemistry* 14, 309–313.
- Torowals, J.B., Pietrofesa, R.A., Lawson, J.A., Christofides-Solomon, M., Hadjiiladis, D., 2015. Flavonoid modulates inflammatory and oxidative stress biomarkers in cystic fibrosis: a pilot study. *BMC Complement. Altern. Med.* 15, 148.
- Vinagar, R., Traut, J.F., Selph, J.L., 1975. Some quantitative temporal characteristics of carrageenan-induced pleurisy in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 143, 711–714.
- Ward, P.A., 2010. Oxidative stress: acute and progressive lung injury. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1203, 35–50.
- Wu, C., Mu, J.Y., Zhang, X., Luo, S., Yang, B., 2014. Pleural fluid mononuclear cells (PMNCs) from tuberculous pleurisy can migrate *in vitro* in response to CXCL10. *Tuberc. (Edinb.)* 94, 123–130.

Glossary

- AAPIH: 2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride;
CAE: crude aqueous extract;
Cg: carrageenan;

Dex: dexamethasone;
FeSO₄: iron sulfate;
H₂O₂: hydrogen peroxide;
HPLC: high performance liquid chromatography; IL-1 β : interleukin 1 β ;
IL-6: interleukin 6;
LDH: lactate dehydrogenase;
MPO: myeloperoxidase;
NO: nitric oxide;
ROS: reactive oxygen species; TRAP: thiobarbituric acid reactive substance;
TNF α : Tumoral Necrosis Factor α .

CAPÍTULO 5

5 CAPÍTULO 5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO AQUOSO E DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM FLAVONOIDES C-GLICOSÍDEOS DAS FOLHAS DE *C. pachystachya* TRÉCUL (EMBAÚBA), UTILIZANDO-SE O MODELO DA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM RATOS

5.1 OBJETIVOS

✓ Avaliar o efeito anti-inflamatório do EA e FEF de *C. pachystachya* sobre a migração dos leucócitos no lavado pleural no modelo da inflamação pleural induzido pela carragenina em ratos;

✓ Investigar o efeito do EA e FEF de *C. pachystachya* sobre os níveis de proteínas totais, atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) e sobre as concentrações dos metabólitos do óxido nítrico (NOx), do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e das interleucinas 1 β (IL-1 β) e IL-6 no lavado pleural;

✓ Verificar o efeito do EA e FEF de *C. pachystachya* sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar;

✓ Verificar o efeito do EA e FEF de *C. pachystachya* sobre o dano lipídico no tecido pulmonar e os níveis de grupos de proteínas carboniladas no tecido pulmonar.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato aquoso e sua fração enriquecida em flavonoides *c*-glicosídeos das folhas de *C. pachystachya* Trécul. (embaúba), utilizando-se o modelo da pleurisia induzida pela carragenina em ratos, estão expostos na proposta de publicação para o periódico científico ***International Immunopharmacology - Journal***, a qual o mesmo será submetido.

5.3 PUBLICAÇÃO

***Cecropia pachystachya* Trécul. attenuates lung inflammation and oxidative stress in pleurisia induced by carrageenan in rats.**

***Cecropia pachystachya* Trécul. attenuates lung inflammation and oxidative stress in pleurisy induced by carrageenan in rats.**

Simony Davet Müller^a, Drielly Florentino^b, Caroline Flach Ortmann^a, Lucinéia Gainski Danielski^b, Fabricia Petronilho^b, Flavio Henrique Reginatto^{a*}

^aLaboratório de Farmacognosia, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC, Florianópolis, SC, Brazil.

^bLaboratório de Fisiopatologia Clínica e Experimental, Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina/UNISUL, Tubarão, SC, Brazil.

***Corresponding author:**

Flavio Henrique Reginatto, Laboratório de Farmacognosia, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC, Florianópolis, SC, Brazil. Phone: +55 48 3721-3499; E-mail: flavio.reginatto@ufsc.br

ABSTRACT

Background: Oxidative stress plays an important role in development of acute inflammatory diseases. The *Cecropia pachystachya*, is popularly used in bronchitis and cough treatments. Thus, the investigation of its anti-inflammatory and antioxidante properties stil remains relevant. **Methods:** The extract and its enriched flavonoid fraction were characterized by HPLC. The *in vitro* antioxidant activity was also evaluated. Further, the *in vivo* antioxidant and anti-inflammatory effects of the CAE and EFF-Cp (10-300 mg/kg, intragastrically) were investigated in the animal model of pleurisy. **Results:** HPLC analysis showed the presence of chlorogenic acid and C-glycosyl flavonoids (isoorientin and isovitexin) as the major compounds of the CAE and EFF-Cp. Both samples presented *in vitro* antioxidant activity induced by free radical generators AAPH (2,2'-azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride); FeSO₄ and H₂O₂. In addition, the *in vivo* experiments showed that administration of carrageenan (Cg) increase the inflammatory parameters and oxidative damage. These levels were reversed after CAE (100-300 mg/Kg) and EFF-Cp (10-100mg/Kg) treatment in animals with similar results to

Dexametasone (Dex) treatment. Further, the CAE and EFF-Cp were effective to reduce the proinflammatory cytokines, cell infiltrate, myeloperoxidase (MPO) activity, nitrite/nitrate concentration, lactate dehydrogenase (LDH) activity, activity, total protein levels and parameters of oxidative damage induced by Cg.

Conclusion: CAE and EFF-Cp of *C. pachystachya* exerts significant *in vitro* and *in vivo* antiinflammatory and antioxidant activities, probably to the preence of C-glycosyl-flavonoids present in these samples.

Keywords: *Cecropia pachystachya* Trécul.; C-glycosyl flavonoids; HPLC; pleurisy; oxidative stress

1. Introduction

Many studies have shown that changes in the reactive oxygen species (ROS) production as well as antioxidants, leads to oxidative stress involved in inflammatory processes present in several diseases, as pneumonia and asthma.^{1,2}

Natural products with anti-inflammatory activity have long been used as a folk remedy for inflammatory conditions such as fevers, pain, migraine and arthritis. In

this context *Cecropia pachystachya* Trécul., popularly known as 'umbaúba branca, árvore-da-preguiça, embaúba prateada', is reported by traditional medicine for the treatment of diabetes, cough, bronchitis and as diuretic.^{3,4,5}

The relationship between antioxidant and anti-inflammatory activities of plant extracts and phenolic compounds is well established in literature.⁶ In addition, several reports have demonstrated that this species have protection against oxidative damage in central nervous system.^{7,8} and anti-inflammatory properties.⁹⁻¹² Finally, three C-glycosyl flavonoids present in *C. pachystachya* leaves - isoorientin, orientin, and isovitexin.³ are described as compounds that have anti-inflammatory,¹³ anxiolytic,¹⁴ and antioxidant.¹⁵ Thus, the aim of the present work was investigated the *in vitro* and *in vivo* antioxidant effects of crude aqueous extract (CAE) and an enriched flavonoid fraction (EFF-Cp) of *C. pachystachya* leaves, as well as its *in vivo* anti-inflammatory activity by cell infiltrate, proinflammatory cytokines release (TNF- α , IL-1 β and IL-6) and neutrophil infiltration in pleurisy model.

2. Materials and methods

2.1 Plant material

Leaves of *Cecropia pachystachya* Trécul were collected in Torres, RS, Brazil. A voucher specimen (ICN 150025) was deposited in the Herbarium of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

2.2 Preparation of crude aqueous extract (CAE) and enriched flavonoid fraction (EFF-Cp)

The leaves of *C. pachystachya* (500 g) were air-dried at (35-40 °C), crushed and stored in a closed container. The crushed material was then subjected to extraction by infusion at 1:10 (m/v) for 30 minutes. The CAE was filtered, freeze-dried and stored at -20 °C until use.

A second part of this extract was then partitioned with n-butanol, yielding the n-butanolic fraction that was dried under reduced pressure, and stirred with Amberlite_XAD-16 resin. Then, the resin was stirred again in the presence of methanol for 30 min yielding the enriched C-glycosyl flavonoid fraction (EFF-Cp).⁸

2.3 Chemical Characterization of CAE and EFF-Cp by HPLC

Qualitative and quantitative analyses of CAE and EFF were performed as previously described.³ Briefly, a Perkin Elmer Series 200 HPLC, composed of a Photodiode Array Detector, quaternary pump, autosampler, and online degasser were used. The data acquisition system was Chromera_ software (Version 3.2.0.4847). The separation was achieved on a PerkinElmer Brownlee Choice C18 column (150 mm 9.4.6 mm i.d.; 5 μ m) and a gradient of solvent A (acetonitrile) and solvent B (acetic acid 1 %, adjusted to pH 3.0) as follows: 5–20 % A (0–30 min) and isocratic 20 % A (30–40 min) as the mobile phase. The flow rate was kept at 1.0 ml/min. Chromatograms were recorded at 340, while the UV spectra were monitored over a range of 200–450 nm. The peaks were characterized by comparing the retention time and UV spectra with the reference standards, and by the co-injection of the sample and authentic samples. The crude aqueous (CAE) and enriched fractions (EFF-Cp) were analyzed at 1.0 mg.mL⁻¹ for all samples.

As reference samples used were Sigma-Aldrich® standards. To check the quantitative profile of CAE and EFF three markers were used: chlorogenic acid, isoorientina and isovitexin. For this, calibration curves were performed in the ranges of 0.5-100 µg/ml for flavonoids and 0.5-50 µg/mL to phenolic acid. The contents were expressed as milligrams of compound per gram of extract (mg/g). All analyzes were performed in triplicate.

2.4 *In vitro* antioxidant activity assay

The *in vitro* antioxidant activity of CAE and EFF-Cp was estimated by the inhibition of formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) induced by three different free radical generators in a lipid rich substrate.¹⁶ Briefly, 500 µl of 0.1% (w/v) lipid homogenate in phosphate buffer (pH 7.4) was mixed with 500 µl of trichloroacetic acid (10%) and centrifuged at 1,200g (10 min). The CAE and EFF-Cp at different concentrations (0.02, 0.2, 2.0, 20 and 200 µg/mL) was added to a test tube, together with 2,2'-azobis (2-amidino-propane) dichloride (AAPH - 0.5 M), iron sulfate (FeSO₄) (0.145 mM) or hydrogen peroxide (H₂O₂) (0.4 M) solutions to

induce lipid peroxidation. The tubes were incubated at room temperature for 15 min, and 500 μ L of thiobarbituric acid (TBA - 0.67%) was added and heated at 100°C for 30 min. After cooling, the absorbances were measured by a spectrophotometer (Micronal®) at 532 nm, and the results were expressed as equivalentes of malondialdehyde (MDA) nmol/mL of substrate.

2.5 *In vivo* assays

2.5.1 Animals

Male Wistar rats (weighing 250-300 g) were used in this study and obtained from the Central Animal Facility of the University of Vale do Itajaí/ UNIVALI. The animals were separated into boxes with five int each box, with free access to food and water and maintained in 12 h light-dark cycles at 22 °C (\pm 1 °C). All experimental procedure involving animals were performed according with the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals for scientific and teaching purposes - (DBCA-2013) in accordance with the US guidelines (NIH publication 85-23, revised in 1996), with the approval of

the Ethics Committee of the Universidade do Sul de Santa Catarina/UNISUL (number 12.021.4.03 IV).

2.5.2 Experimental groups

Rats were randomly allocated in the following groups:

- (i) Control. Rats received saline + vehicle (water) (N = 6);
- (ii) Cg + vehicle (water). Rats were subjected to Cg-induced pleurisy + vehicle (N= 6);
- (iii) Cg + dexamethasone (dex). Same as the Cg + vehicle group, except that dex (0.5 mg/kg i.p.) was administered one hour after induction (N=6);
- (iv) Cg + CAE or EFF-Cp (10 mg/kg). Same as the Cg + vehicle group, except that CAE or EFF-Cp (10 mg/kg intragastrically) was administered one hour after Cg (N=6);
- (v) Cg + CAE or EFF-Cp (25 mg/kg). Same as the Cg + vehicle group, except that CAE or EFF-Cp (25 mg/kg intragastrically) was administered one hour after Cg (N=6);
- (vi) Cg + CAE or EFF-Cp CAE (100 mg/kg). Same as the Cg + vehicle group, except that CAE or EFF-Cp (100

mg/kg intragastrically) was administered one hour after Cg (N=6);

(vii) Cg + CAE or EFF-Cp (300 mg/kg). Same as the Cg + vehicle group, except that CAE or EFF-Cp (300 mg/kg intragastrically) was administered one hour after Cg (N=6).

2.5.3 Carrageenan-induced pleurisy

Induction of pleurisy was performed according to.¹⁷ The rats were anesthetized with ketamine hydrochloride (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and a skin incision was made at the level of the left sixth intercostal space. The rats received 0.2 mL of saline containing 2% λ -carrageenan or saline (control) in the pleural cavity. The skin incision was closed using suture and one hour later, the animals were treated with different doses of the CAE or EFF-Cp or water only (control). Four hours after the Cg injection, the animals were killed, and approximately 1 ml of pleural exudate was obtained from each animal to determine the total cell count, LDH activity, nitrite/nitrate concentration, and cytokine levels. Lung tissue samples were also taken, to evaluate myeloperoxidase (MPO) levels, and oxidative damage parameters.

2.5.4 Inflammatory parameters in pleural exudates

Cell migration, as an indicator of inflammation, was determined by the cell count in the pleural exudate, in a Neubauer chamber as previously described.¹⁸ The LDH activity was determined using commercial kits (Analisa – LDH UV-PP), and while total protein content was measured at 700 nm by Lowry using bovine serum albumin as standard.¹⁹

2.5.5 Measurement of nitrite/nitrate concentration in pleural exudates

Total nitrite concentration in the pleural exudate was measured using the Griess reaction, by adding 100 μ L of Griess reagent [0.1% (w/v) naphthylethylenediamide dihydrochloride in H₂O and 1% (w/v) sulphanilamide in 5% (v/v) concentrated H₃PO₄], vol. [1:1] to the 100 μ L sample. The nitrite/nitrate concentration was measured spectrophotometrically at 550 nm. The results were expressed as nitrite/nitrate concentration (nmol/mg protein).²⁰

2.5.6 Measurement of cytokine levels in pleural exudates

TNF- α , IL-1 β and IL-6 concentrations were determined in the pleural exudates at 4h after intrapleural injection of carrageenan. The assay was carried out by using a colorimetric, commercial ELISA kit (CALBIOCHEM-NOVABIOCHEM CORPORATION, USA).

2.5.7 Myeloperoxidase activity in the lung tissue

The lung tissue was homogenized (50 mg/mL) in hexadecyltrimethylammonium bromide 0.5% and centrifuged at 15.000 rpm for 40 min. Next, an aliquot of the supernatant was mixed with a solution of tetramethylbenzidine 1.6 mM and 1 mM H₂O₂. The MPO activity was measured spectrophotometrically at 650 nm (37 °C). The results were expressed as mU/mg protein.²¹

2.5.8 Determination of oxidative damage parameters

The formation of TBARS during an acid-heating reaction is widely adopted as a sensitive method for measuring lipid peroxidation. Briefly, lung tissue samples

were homogenized and mixed with 1 mL of 10% trichloroacetic acid and 1 mL of 0.67% TBA. Subsequently, these were then heated in a water bath at 100°C for 30 min. The equivalent of malondialdehyde (MDA) was determined by the absorbance at 532 nm using 1,1,3,3 - tetramethoxypropane as external standard. The results were expressed as MDA equivalents (nmol/mg protein).²²

Oxidative damage to proteins was assessed by determining the level of carbonyl groups, based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH). Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid and redissolved in DNPH, and the absorbance was monitored at 370 nm. The proteins were expressed as total carbonyl content (nmol/mg of protein).²³

2.5.9 Quantification of proteins

The protein assay was used to determination of nitrite/nitrate concentration, MPO activity, TBARS test and protein carbonyl groups was measured using the Lowry method.¹⁹

2.5.10 Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM and $p < 0.05$ was considered significant. Differences between groups were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed Tukey's post hoc test. All statistical analyses were performed with Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 21.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1 Phytochemical characterization of CAE and EFF-Cp by HPLC

The HPLC analysis of the CAE and EFF-Cp was performed as described by.³ It was possible identify the chlorogenic acid (1), isoorientin (2) and isovitexin (3) as the major compounds in CAE. (Figure 1 A) Further the EFFCp showed the C-glycosyl flavonoids as the major compounds (Figure 1B).

Quantitative analyzes were performed to chlorogenic acid, isoorientina and isovitexin. The analytical curve was constructed for these compounds at 5 different

concentrations, and carried out in triplicate. The amounts of CAE and EFF-Cp are shown in Table 1.

Table 1. Secondary metabolites present in CAE and EFF-Cp of *C. pachystachya*.

	Chlorogenic acid	Isoorientin	Isovitexin
CAE*	11.40 ± 1.0	10.03 ± 0.39	4.37 ± 0.34
EFF-Cp*	12.21 ± 0.14	61.23 ± 0.65	20.11 ± 0.33

*Amounts expressed in milligrams per gram of CAE/EFF ± standard deviation. These analyzes were performed in triplicate.

3.2 Effect of CAE and EFF- Cp *in vitro* antioxidant activity

Lipid peroxidation was measured by the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) induced by three free generators (AAPH, FeSO₄ and H₂O₂). The CAE presented significant dose-dependent antioxidant activity and EFF-Cp presented significant antioxidant activity especially at low concentrations as 0.02 µg/mL (Table 2).

Table 2. Inhibition of lipid peroxidation by CAE and EFF-Cp induced by free radicals generators (H_2O_2 , $FeSO_4$ and AAPH).

Extracts and free radical generators	MDA (nmol/mL substrate)					
	Control	0.02 mg/mL	0.2 mg/mL	2 mg/mL	20 mg/mL	200 mg/mL
Substrate	0.314±0.036					
AAPH	1.474±0.144 ^a					
AAPH+CAE		1.267±0.043 ^b	1.101±0.06 ^b	1.089±0.08 ^b	0.593±0.03 ^b	0.534±0.06 ^b
AAPH+EFF		0.567±0.02 ^b	0.356±0.067 ^b	0.377±0.06 ^b	0.756±0.04 ^b	1.038±1.01 ^b
H_2O_2	1.636±0.03 ^a					
H_2O_2 +EA		1.092±0.03 ^b	0.998±0.05 ^b	0.677±0.02 ^b	0.597±0.02 ^b	0.534±0.06 ^b
H_2O_2 +EFF		0.941±0.06 ^b	0.411±0.17 ^b	0.398±0.08 ^b	0.257±0.04 ^b	1.038±1.01 ^b
$FeSO_4$	1.531±0.10 ^a					
$FeSO_4$ +CAE		1.428±0.01 ^b	0.777±0.05 ^b	0.624±0.03 ^b	0.799±0.07 ^b	0.865±0.03 ^b
$FeSO_4$ +EFF		0.711±0.02 ^b	0.380±0.03 ^b	0.325±0.04 ^b	0.411±0.09 ^b	1.243±0.05 ^b

Each value represents mean ± SD. ^a different from control ($p < 0.05$) and ^b different from H_2O_2 , $FeSO_4$, AAPH groups ($p < 0.05$).

3.3 Effect of CAE and EFF-Cp on inflammatory and oxidative damage parameters in Cg-induced pleurisy in bronchoalveolar exsudate

3.3.1 Leukocytes migration

Pleurisy induced by carrageenan showed inflammation and CAE in all doses significantly decreased leukocytes, mainly in the doses of 100 (414.66±157.93) and 300 mg/kg (434.66±108.50),

respectively ($p < 0.05$). Dex also inhibited leukocytes by 479.0 ± 53.65 , ($p < 0.05$) (Figure 2A).

Under the same conditions, the EFF-Cp in all tested doses significantly decreased leukocytes in pleural lavage, highlighting doses of 10 (464.20 ± 105.55), 25 (652.00 ± 52.9) and 100 mg/kg (109.01 ± 67.69), respectively ($p < 0.05$). Dex also inhibited leukocytes by 447.60 ± 0.89 , ($p < 0.05$) (Figure 2B).

3.3.2 Total protein and LDH activity

The CAE was able to decrease LDH enzyme activity in pleural lavage in all tested doses and no significant difference between LDH and the doses of 10 (80.95 ± 3.36) and 25 mg/kg (77.71 ± 5.03), ($p < 0.05$) were detected (Figure 3A). Furthermore, CAE was able to decrease total protein levels, specially at doses of 25 (0.93 ± 0.06), 100 (0.81 ± 0.009) and 300 mg/Kg (0.96 ± 0.03) ($p < 0.05$). Dex also decrease total protein levels by 0.71 ± 0.07 , ($p < 0.05$) (Figure 3B).

In the same protocol, EFF-Cp showed to be effective in all tested doses, since the LDH activity decreased in pleural lavage when compared to

vehicle. No significant difference between the doses of 10 (72.69 ± 9.54), 25 (72.57 ± 4.96) and 100 mg/Kg (75.63 ± 8.04) were observed. As expected, Dex also decrease total LDH activity by 66.95 ± 16.86 , ($p < 0.05$) (Figure 3C). Additionally, EFF-Cp was able to decrease total protein levels, at doses of 10 (0.66 ± 0.09), 25 (0.94 ± 0.01) and 100 mg/Kg (1.07 ± 0.01) ($p < 0.05$). No significant difference between the doses of 25 and 100 mg/Kg. Dex also decrease total protein levels by 0.60 ± 0.08 , ($p < 0.05$) (Figure 3D).

3.3.3 TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels

To determine whether the modulation of leukocyte migration, the levels of the cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6 were measured.

The CAE and EFF-Cp induced a significant decrease in IL-1 β , while the CAE in the doses of 100 (465.30 ± 211.21), 300 (310.67 ± 292.31) mg/kg and EFF in the lower doses of 10 (401.42 ± 82.66) and 25 (370.71 ± 65.49) mg/kg ($p < 0.05$) (Figure 4 B,E). Furthermore, the TNF- α levels were also decreased by CAE treatment at 100 (417.80 ± 61.16), 300

(252.66±81.13) mg/kg as well as EFF-Cp at 10 (515.29±18.71), 25 mg/kg (566.23±33.75), ($p < 0.05$) (Figure 4 A,D). On the IL-6 levels, the CAE caused significant decrease at the doses of 10 (494.70±17.35), 25 (321.70±5.40), 100 (226.33±124.50) and 300 (145.0±47.69) mg/Kg, ($p < 0.05$) (Figure 4 C). Finally, the lowerdoses of the EFF-Cp 10 (790.18±16.79) and 25 (1017.38±137.37) mg/Kg caused significant decreases in IL-6 levels ($p < 0.05$) (Figure 7F). Dexamethasone also significantly decreased the levels of these pro-inflammatory cytokines ($p < 0.01$), (Figure 4 F).

3.3.4 Nitrite/nitrate concentration

A significant decrease of nitrite/nitrate concentration in the pleural exudate was observed after the administration of CAE, EFF-Cp and Dex in relation to the animals that only received carrageenan. The CAE was able to decrease of nitrite/nitrate concentration especially at dose of 100 (0.07±0.006) and 300 mg/kg (0.055±0.0004) at 4 h in the inflammatory response induced by carrageenan ($p < 0.05$). Dex also decrease of nitrite/nitrate concentration by 0.01±0.001, ($p < 0.05$). (Figure 5A).

The EFF-Cp induce a marked reduction in nitrite/nitrate concentration by doses 10 (0.099 ± 0.007), 25 (0.06 ± 0.004) and 100 (0.10 ± 0.004) mg/Kg, ($p<0.05$). (Figure 5B).

3.4 Acute lung inflammation and oxidative damage

3.4.1 MPO enzymatic activity

The effects of CAE and EFF-Cp were assessing by MPO activity in neutrophilic infiltrate marker in the lung tissue. The CAE was able to decrease MPO activity at dose of 100 mg/kg (0.03 ± 0.02) in the inflammatory response induced by carrageenan ($p<0.05$). Dex also inhibited this enzyme (0.04 ± 0.01) ($p<0.05$). In addition, No significant difference between the doses of 100 mg/Kg and Dex, suggesting that these treatments are equally to protect to oxidative damage (Figure 6A).

Under the same conditions, the EFF-Cp at 10 (0.04 ± 0.001), 25 (0.04 ± 0.002) and 100 mg/kg (0.038 ± 0.007) was able to decrease MPO activity ($p<0.05$). Dex also inhibited this enzyme (0.04 ± 0.01). No significant difference between the doses of EFF-Cp and Dex, ($p<0.05$) was observed (Figure 6B).

3.4.2 Measurement of TBARS levels

Lung injury induced by carrageenan was also characterized by the increase of oxidative damage in macromolecules. These levels were reversed by the administration of CAE and EFF-Cp, showed to be more effective than Dex. The CAE (25, 100 and 300 mg/kg), yielding a marked reduction in TBARS levels by 0.0018 ± 0.0005 ; 0.0010 ± 0.0002 and 0.0013 ± 0.0007 , respectively ($p<0.05$). As expected, Dex also inhibited this same inflammatory parameter (0.0019 ± 0.0002) ($p<0.05$) (Figure 7A).

The EFF-Cp (10, 25 and 100) also caused a marked reduction in TBARS levels by (0.0024 ± 0.00003), (0.0026 ± 0.0003) and (0.0036 ± 0.0002), respectively ($p<0.05$). The same protector potential against oxidative damage was observed by Dex (0.0020 ± 0.00009) ($p<0.05$) (Figure 7C).

3.4.3 Measurement of protein damage

The different aspects of antioxidant activity of CAE and EFF-Cp are presented in Figure 7.

Treatment with CAE was able to decrease carbonyls groups at a dose of 100 mg/kg (0.051 ± 0.01) and 300 mg/kg (0.078 ± 0.007) when compared to carrageenan group ($p<0.05$). Dex also decrease carbonyls groups by 0.066 ± 0.01 , ($p<0.05$) (Figure 7B).

All the doses of the EFF-Cp [10 (0.08 ± 0.007), 25 (0.051 ± 0.017), 100 (0.054 ± 0.006) or 300 (0.111 ± 0.01) mg/Kg], reduced the oxidative damage to proteins in lung tissue. Dex also decrease carbonyls groups by 0.077 ± 0.008 , ($p<0.05$) (Figure 7D).

Discussion

The inflammation process is closely associated to immune responses and can be characterized by swelling, redness, heat, pain and dysfunction of tissue and organs.²⁴ The inflammation process is related to synthesis and excessive secretion of pro-inflammatory mediators as MPO, nitric oxide, TNF- α , IL-1 β , IL-6 and the production and release reactive species of oxygen and nitrogen.²⁵⁻²⁷

In this study, crude aqueous extracts (CAE), and an enriched flavonoid fraction (EFF-Cp) were obtained from

the *C. pachystachya* leaves, evaluated on inflammation and oxidative damage induced by carrageenan in the model of pleurisy in rats.

In the present study, the treatment with CAE or e EFF-Cp decreased lipid peroxidation *in vitro*, suggesting that both samples possess antioxidant activity against the ROS generator tested (AAPH, FeSO₄ and H₂O₂). Furthermore, it was found that the lower concentrations EFF-Cp significantly were able to inhibit the formation of malondialdehyde.

The cell membrane flow is related to the presence of chains unsaturated phospholipids and cholesterol and lipid damage of this layer tend to decrease membrane fluidity. The attack of some reactive species leading to oxidation of many molecules of fatty acids.²⁸ Lipid peroxidation antioxidants may be interrupted by interrupting the chain peroxidation reacting with peroxy radicals and alkoxy thus preventing the propagation of the chain in the lipid membranes.²⁹

Recent studies support our work demonstrating the ability of *C. pachystachya* to protect oxidative damage, and that this activity is attributed to the C-glycosides flavonoids.⁹ Since orientin and its isomer, isoorientin are the major flavonoid in CAE as well as in the EFF-Cp its

powerful antioxidant function could be attributed to elimination of free radicals.³⁰ In addition, other important activities are assigned to C-glycosides such as cytokines inhibition, decrease in proinflammatory production and leukocyte migration, among other purposes.³¹

In our study, the results provide a direct evidence that *C. pachystachya* has anti-inflammatory and protective effect against oxidative damage, demonstrated by lipid peroxidation and nitric oxide decrease, as well as by inhibition of IL-1 β , IL-6 and TNF- α , and reducing the leukocyte activation site of inflammation.

The anti-inflammatory effect of *C. pachystachya* could be explained mainly by the inhibition of leukocytes. EFF-Cp was more effective in inhibiting the inflammatory parameters than CAE at lower doses (10, 25 and 100 mg/kg).

These data re in agreement with previous studies that shown the anti-inflammatory activity from methanolic extract of *C. pachystachya* by the model of ear edema induced by croton oil, arachidonic acid, capsaicin, etilfenilpropiolato (PPE) and phenol. The results showed significant reduction in leukocyte influx into the tissue during acute and chronic inflammation in Swiss mice.¹¹

The pleurisy model, besides being very useful for screening of anti-inflammatory compounds has a characteristic bimodal profile. In the first phase (4 hours), there is an increased exudation with mass leukocyte migration into the pleural cavity, mostly activated neutrophils, characteristic profile of innate or natural immune response.³² The recognition molecules used by the innate system are expressed by a large number of cells, this system is ready to act quickly after finding an attacker toxin or pathogen.² In addition to assessing the ability of the CAE and EFF-Cp, as the protector of lipid damage in the lung tissue were evaluated by carbonyls levels used as protein oxidation biomarker mediated ROS. These results herein described, demonstrate CAE and EFF-Cp are effective in stress oxidative protection by inflammatory action of carrageenan.

Whereas proteins contain several reactive sites on oxidative stress process, the first event is the formation of a radical centered on carbon by extraction $H\cdot$ in a peptide bond with the consequent fragmentation of the chains and oxidation of amino acids, producing carbonyl compounds. Additionally, proteins can contain with metal binding sites that are susceptible to reactions of oxidation and reduction, which can produce a sequence of signals

that degrade these proteins.³³ The results of this research suggest that the CAE and EFF-Cp have an important role in reversing effect of stress on carbonylation in proteins of pleural exudate.

MPO is an enzyme that has the ability to generate reactive species such as hypochlorous acid. This enzyme consist in of approximately 5% of the neutrophil proteins, considered a marker for these cells is also responsible by O_2 consumption together with the NADPH oxidase enzyme complex.³⁴ NADPH oxidase is responsible for reducing the molecular oxygen (O_2) to superoxide radical anion (O_2^-) whichis converted to H_2O_2 by superoxide dismutase (SOD). The H_2O_2 is responsible for destroying the bacteria directly, or through their conversion into hydroxyl ions (OH^-) or hypochlorous acid (HOCl).³⁵

The ROS produced by MPO is, in part, responsible to the destruction of agents involved in damage associated with different types of inflammatory diseases. This enzyme has been gaining attention as target in the development of new drugs by inhibition on its activities.^{36,37} This inhibition by CAE (100 mg/kg) and EFF-Cp (10-100 mg/kg) on the activity of MPO and TBARS were similar to those presented by the reference drug dexamethasone ($p < 0,05$).

Although there are not studies to demonstrate in the inflammation of the respiratory tract. This study demonstrated that CAE and EFF-Cp has ability to decrease MPO activity as previously described.⁷ Furthermore, several studies suggest that inhibition of MPO by flavonoids, is considered an important anti-inflammatory cellular mechanism.^{6,38,39}

Another important parameter herein evaluated was the LDH activity. Considered a cytosolic tetrameric enzyme that catalyze the conversion of pyruvate to lactate in all tissues. Its detection in high concentrations in extracellular fluids is indicative of cell death or loss of integrity.^{40,41}

The release of inflammatory mediators are associated with several acute and chronic inflammatory diseases, including pneumonia and asthma where there is an increase of inflammatory mediators such as NO, TNF- α , IL-1 β .^{1,42,43}

Another important signal inflammatory process is the formation of exudate, which is closely related to NO production by nitric oxide synthase (NOS) present in endothelial cells and in inflammatory diseases. This enzyme has three isoforms: endothelial nitric oxide synthase (eNOS or NOS1), inducible nitric oxide

synthase to (NOS2 or iNOS) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS or NOS3). The nNOS and eNOS isoforms are related to physiological processes to maintain homeostasis of the organism. Since isoform iNOS is induced, that is activated by the release of inflammatory mediators such as proinflammatory cytokines.⁴⁴

In this context our results showed that the CAE at the concentrations tested (100-300 mg/kg) and EFF-Cp (10-100 mg/Kg) were able to reduce the concentrations of nitrite and nitrate levels, product of NO metabolites and TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the pleural cavity during the inflammatory process generated by carrageenan.

This study was the first study evaluating *C. pachystachya* CAE and its EFF-Cp in a model of pleurisy on oxidative and inflammatory damage induced by carrageenan in animals as well as biochemical parameters cytokines, enzymes, NO and oxidative damage in the lung tissue. It is important to note that an enriched fraction of flavonoids C-glycosyl, with isoorientin, and orientin isovitexin as the main components, may have contributed to these effects. However, more studies are needed to clarify the specific mechanism of CAE en eff, is believed to

be related to the anti-inflammatory and antioxidant actions of flavonoid C-glycosides present in the plant.

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments: This work was performed with financial support from CNPq, CAPES, and FAPESC. The authors F Petronilho and FH Reginatto are also grateful to CNPq for their research fellowships.

References

- 1 Barnes PJ. New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2013; 12(7): 543-59.
- 2 Chaplin DD. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2010; 125(2 suppl. 2): S3-S23.
- 3 Costa GM, Ortmann CF, Schenkel EP, Reginatto FH. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. *Journal of the Brazilian Chemical Society.* 2011; 22(6): 1096-1102.
- 4 Hernández-Terrones MG, Morais SAL, Londe GB, Nascimento EA, Chang R. Allelopathic Action of *Cecropia pachystachya* Extracts on the Growth of Guinea Grass (*Panicum maximum*). *Planta Daninha.* 2007; 25(4): 763-769.

5 Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996; 20(7); 933-56.

6 Lorenzi H, Matos FJA. Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarium de Estudos da Flora Ltda; 2008.

7 Gazal M, Ortmann CF, Martins FA, Streck EL, Quevedo J, Campos AM et al. Antidepressant-like effects of aqueous extract from *Cecropia pachystachya* leaves in a mouse model of chronic unpredictable stress. *Brain Research Bulletin*. 2014; 108: 10-17.

8 Ortmann CF, Réus GZ, Ignácio ZM, Abelaira HM, Titus SE, de Carvalho P et al. Enriched Flavonoid Fraction from *Cecropia pachystachya* Trécul Leaves Exerts Antidepressant-like Behavior and Protects Brain Against Oxidative Stress in Rats Subjected to Chronic Mild Stress. *Neurotoxicity Research*. 2016; 29(4): 469-83.

9 Aragão DM, Lima IV, Silva JM, Bellozi PM, Costa JC, Cardoso GM, et al. Anti-inflammatory, antinociceptive and cytotoxic effects of the methanol extract of *Cecropia pachystachya* trécul. *Phytotherapy Research*. 2013; 27(6): 926-30.

10 Maquiaveli CC, Silva ER, Rosa LC, Francescato HD, Lucon Júnior JF, Silva CG et al. *Cecropia pachystachya* extract attenuated the renal lesion in 5/6 nephrectomized rats by reducing inflammation and renal arginase activity. *Journal of ethnopharmacology*. 2014; 2(158): 49-57.

- 11 Pacheco NR, Pinto NC, Silva JM, Mendes RF, Costa JC, Aragão DM et al. Cecropia pachystachya: A species with expressive in vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant effects. *BioMed Research International*. 2014; 2014(301294):
- 12 Schinella G, Aquila S, Dade M, Giner R, Recio Mdel C, Spegazzini E et al. Anti-inflammatory and apoptotic activities of pomolic acid isolated from Cecropia pachystachya. *Planta Medica*. 2008; 74(3): 215-20.
- 13 Zucolotto SM, Fagundes C, Reginatto FH, Ramos FA, Castellanos L, Duque C et al. Analysis of C-glycosyl Flavonoids from South American Passiflora Species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochemical Analysis*. 2012; 23(3): 232-9.
- 14 Sena LM, Zucolotto S, Reginatto FH, Schenkel EPaulo, Lima TCM. Neuropharmacological Activity Of The Pericarp Of Passiflora edulis flavicarpa Degener: Putative Involvement Of C-Glycosylflavonoids. *Experimental Biology and Medicine*. 2009; 23(4): 967-75.
- 15 Rudnicki M, Oliveira MR, Pereira TV, Reginatto F, Pizzol FD, Moreira JC. Antioxidant and antiglycation properties of Passiflora alata and Passiflora edulis extracts. *Food Chemistry*. 2007; 100(2): 719-24.
- 16 Silva EG, Behr GA, Zanotto-Filho A, Lorenzi R, Pasquali MA, Ravazolo LG, Bordignon CL Jr. Antioxidant activities and free radical scavenging potential of Bauhinia microstachya (RADDI) MACBR. (Caesalpinaceae) extracts linked to their polyphenol content. *Biol Pharm Bull*. 2007; 30(8): 1488-96.

17 Saleh TSF, Calixto JB, Medeiros YS. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *British Journal of Pharmacology*. 1996b; 118(3): 811-9.

18 Albano MN, Silveira MR, Danielski LG, Florentino D, Petronilho F, Piovezan AP. Anti-inflammatory and antioxidant properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 2013; 147(3): 612-7.

19 Lowry OH, Rosebrough A, Farr L, Randall RJ. Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951; 193(1): 265-75.

20 Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*. 1982; 126(1): 131-8.

21 De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents and actions*. 1989; 26(3-4): 335-41.

22 Draper HH, Hadley M. Oxygen Radicals in Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants. [s.l.]: Elsevier; 1990. v. 186

23 Levine RL. Oxygen Radicals in Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants. [s.l.] Elsevier; 1990a. v. 186.

- 24 Niu X, Wang Y, Li W, Zhang H, Wang X, Mu Q et al. Esculin exhibited anti-inflammatory activities in vivo and regulated TNF- α and IL-6 production in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages in vitro through MAPK pathway. *International immunopharmacology*. 2015; 29(2): 779-86.
- 25 Dinarello CA. Historical Review of Cytokines. *European Journal of Immunology*. 2007; 37(Suppl 1): S34-S5.
- 26 Kamper EF, Chatzigeorgiou A, Tsimpoukidi O, Kamper M, Dalla C, Pitychoutis PM, et al. Sex differences in oxidant/antioxidant balance under a chronic mild stress regime. *Physiology and Behavior*. 2009; 98(1-2): 215-22.
- 27 Nauseef WM. Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. *Cellular Microbiology*. 2014; 16(8): 1146-55.
- 28 Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*. 2000; 486(1): 10-3.
- 29 Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*. 2006; 141(2): 312-22.
- 30 Praveena R, Sadasivam K, Kumaresan R, Deepha V, Sivakumar R. Experimental and DFT studies on the antioxidant activity of a C-glycoside from *Rhynchosia capitata*. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2013; 103: 442-52.
- 31 Figueiredo D, Colomeu TC, Schumacher NS, Stivanin-Silva LG, Cazarin CB, Meletti LM et al. Aqueous leaf extract of *Passiflora alata* Curtis promotes antioxidant and anti-inflammatory effects and consequently preservation of NOD mice beta cells (non-obese diabetic). *International*

immunopharmacology. 2016; 35: 127-36.

32 Saleh TSF, Calixto JB, Medeiros YS. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *British Journal of Pharmacology*. 1996a; 118(3): 811-9.

33 Dalle-Donne I, Giancarlo A, Marina C, Roberto C, Ranieri R, Aldo M. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J. Cell. Mol. Med.* 2006; 10(2): 389-406.

34 Klebanoff SJ, Kettle AJ, Rosen H, Winterbourn CC, Nauseef WM. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *Journal of Leukocyte Biology*. 2012; 93(2): 185-8.

35 Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of leukocyte biology*. 2005; 77: 598-625.

36 Forbes LV, Sjögren T, Auchère F, Jenkins DW, Thong B, Laughton D, et al. Potent Reversible Inhibition of Myeloperoxidase by Aromatic Hydroxamates. *Journal of Biological Chemistry*. 2013; 288(51): 36636-47.

37 Paumann-Page M, Furtmüller PG, Hofbauer S, Paton LN, Obinger C, Kettle AJ.. Inactivation of human myeloperoxidase by hydrogen peroxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2013; 539(1): 51-62.

38 Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. Critical Review Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2004; 96(3): 229-45.

- 39 Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*. 2000; 52(4): 673-51.
- 40 Drent M, Cobben NA, Henderson RF, Wouters EF, van Dieijen-Visser M.. Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation. *European Respiratory Journal*. 1996; 9(8): 1736-42.
- 41 Henderson RF. Use of bronchoalveolar lavage to detect lung damage. *Environmental Health Perspectives*. 1984; 56: 115-29.
- 42 Narasaraju T, Yang E, Samy RP, Ng HH, Poh WP, Liew AA et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *American Journal of Pathology*. 2011; 179(1): 199-210.
- 43 Szeffler SJ, Wenzel S, Brown R, Erzurum SC, Fahy JV, Hamilton RG et al. Asthma outcomes: Biomarkers. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012; 129(3): S9-S23.
- 44 MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M et al. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell*. 1995; 81(4): 641-50.

Legends of Figures

Figure 1. HPLC chromatographic profile of *C. pachystachya* CAE (A) and EFF (B) with diode array detection at 340 nm. (1) chlorogenic acid; (2) isoorientin; (3) isovitexin. For chromatographic conditions, see Material and Methods section.

Figure 2. Effects of *C. pachystachya* CAE (A) and EFF (B) (10-300 mg/kg) administered intragastrically in the murine model of pleurisy induced by Cg on leucocyte count in the pleural exudate. Sal is the negative control group with animals treated with saline solution only (0.9% NaCl). Cg is the positive control group with animals treated with Cg only. Dex is the group of animals treated with dexamethasone (0.5 mg/kg intraperitoneally). Bars indicate the mean \pm S.D. of 6 animals, [#] $p < 0.05$ compared to the control group and * $p < 0.05$ compared to the Cg group.

a = statistical differences in relation to dex;

b = statistical differences in relation to dose 10 mg/Kg;

c = statistical differences in relation to dose 25 mg/Kg;

d = statistical differences in relation to dose 100 mg/Kg;

e = statistical differences in relation to dose 300 mg/Kg.

Figure 3. Effects of *C. pachystachya* CAE and EFF (10-300 mg/kg) administered intragastrically in the murine model of pleurisy induced by Cg on LDH activity CAE (A) and EFF (C), total protein CAE (B) and EFF (D) in the pleural exudate, respectively. Sal is the negative control group with animals treated with saline solution only (0.9% NaCl). Cg is the positive control group with animals treated with Cg only. Dex is the animals treated with dexamethasone (0.5 mg/kg intraperitoneally). Bars indicate the mean \pm S.D. of 6 animals, [#]p<0.05 compared to the control group and *p<0.05 compared to the Cg group.

a = statistical differences in relation to dex;
b = statistical differences in relation to dose 10 mg/Kg;
c = statistical differences in relation to dose 25 mg/Kg;
d = statistical differences in relation to dose 100 mg/Kg;
e = statistical differences in relation to dose 300 mg/Kg.

Figure 4. Levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels in pleural exudates of rats subjected to Cg administration and treated with *C. pachystachya* CAE (A, B and C) and EFF (D, E and F) (10-300 mg/kg) intragastrically respectively. Sal is the negative control group with animals treated with saline solution only (0.9% NaCl). Cg is the positive control group with animals treated with Cg only. Dex is the group of animals treated with dexamethasone (0.5

mg/kg intraperitoneally). Bars indicate the mean \pm S.D. of 6 animals, [#] $p < 0.05$ compared to the control group and * $p < 0.05$ compared to the Cg group.

a = statistical differences in relation to dex;

b = statistical differences in relation to dose 10 mg/Kg;

c = statistical differences in relation to dose 25 mg/Kg;

d = statistical differences in relation to dose 100 mg/Kg;

e = statistical differences in relation to dose 300 mg/Kg.

Figure 5. Nitrite/nitrate concentration in pleural exudates of rats subjected to Cg

administration and treated with *C. pachystachya* CAE (A) and EFF (B) (10-300 mg/kg) intragastrically. Sal is the negative control group with animals treated with saline solution only (0.9% NaCl). Cg is the positive control group with animals treated with Cg only. Dex is the group of animals treated with dexamethasone (0.5 mg/kg intraperitoneally). Bars indicate the mean \pm S.D. of 6 animals, [#] $p < 0.05$ compared to the control group and * $p < 0.05$ compared to the Cg group.

a = statistical differences in relation to dex;

b = statistical differences in relation to dose 10 mg/Kg;

c = statistical differences in relation to dose 25 mg/Kg;

d = statistical differences in relation to dose 100 mg/Kg;

e = statistical differences in relation to dose 300 mg/Kg.

Figure 6. Myeloperoxidase activity in lung tissue of rats subjected to Cg administration and treated with *C. pachystachya* CAE (A) and EFF (B) (10-300 mg/kg) intragastrically. Sal is the negative control group with animals treated with saline solution only (0.9% NaCl). Cg is the positive control group with animals treated with Cg only. Dex is the group of animals treated with dexamethasone (0.5 mg/kg intraperitoneally). Bars indicate the mean \pm S.D. of 6 animals, [#] $p < 0.05$ compared to the control group and * $p < 0.05$ compared to the Cg group.

a = statistical differences in relation to dex;

b = statistical differences in relation to dose 10 mg/Kg;

c = statistical differences in relation to dose 25 mg/Kg;

d = statistical differences in relation to dose 100 mg/Kg;

e = statistical differences in relation to dose 300 mg/Kg.

Figure 7. Oxidative damage in lipids through thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) measurement and in proteins with protein carbonylation determination in lung tissue of rats subjected to Cg administration and treated with *C. pachystachya* CAE (A and B) and EFF (C and D) (10-300 mg/kg) intragastrically respectively. Sal is the negative control group with animals treated with saline solution only (0.9% NaCl). Cg is the positive control group with animals treated with Cg

only. Dex is the group of animals treated with dexamethasone (0.5 mg/kg intraperitoneally). Bars indicate the mean \pm S.D. of 6 animals, [#]p<0.05 compared to the control group and *p<0.05 compared to the Cg group.

a = statistical differences in relation to dex;

b = statistical differences in relation to dose 10 mg/Kg;

c = statistical differences in relation to dose 25 mg/Kg;

d = statistical differences in relation to dose 100 mg/Kg;

e = statistical differences in relation to dose 300 mg/Kg.

Glossary

AAPH – 2,2'-azobis (2-amidino-propane) dichloride

CAE - Crude aqueous extract

Cg – Carrageenan

Dex – Dexametasone

EFF - Enriched Fraction in flavonoids

FeSO₄ – Iron sulfate

H₂O₂ – Hydrogen peroxide

HPLC - High Performance Liquide Chromatography

IL1 β – Interleukin 1 β

IL6 – Interleukin 6

LDH – lactate dehydrogenase

MPO – Myeloperoxidase

NO – Nitric Oxide

ROS – Reactive oxygen species

TBARS – Thiobarbituric acid reactive substances

TNF α – Tumoral Necrosis Factor α

Figure 1

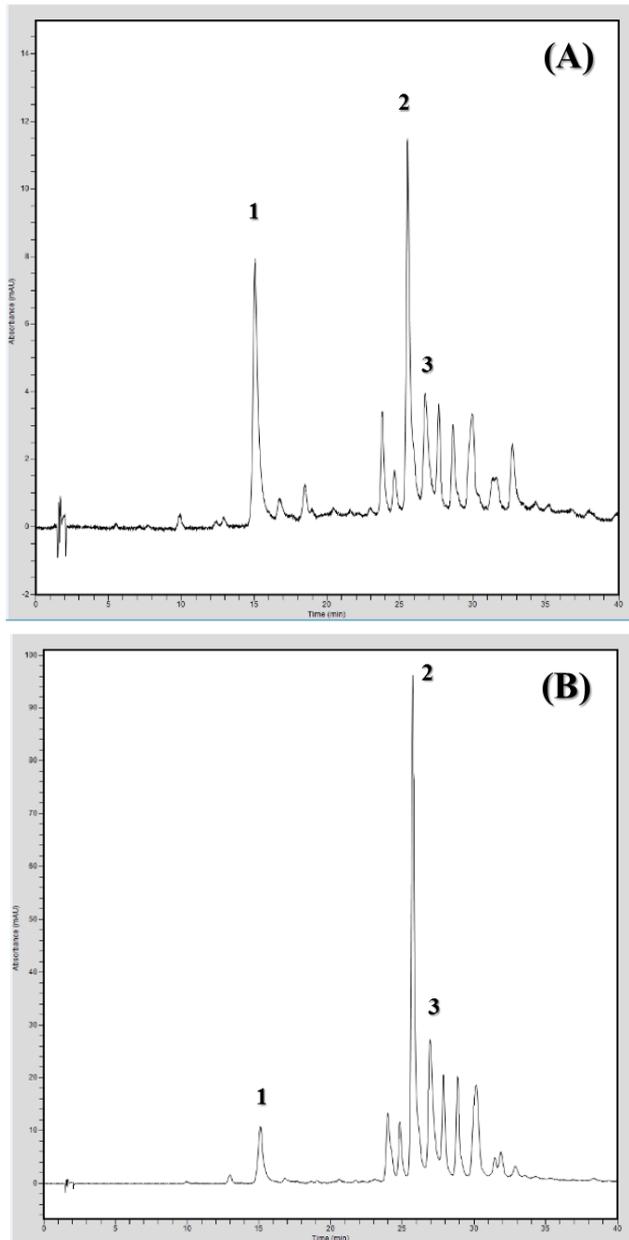


Figure 2

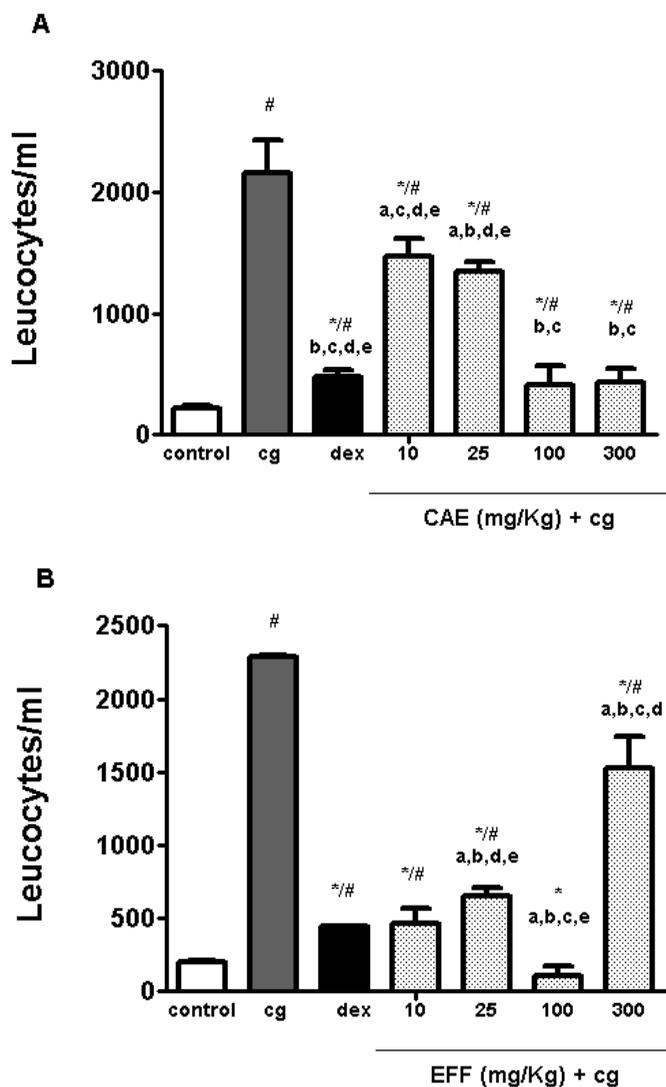


Figure 3

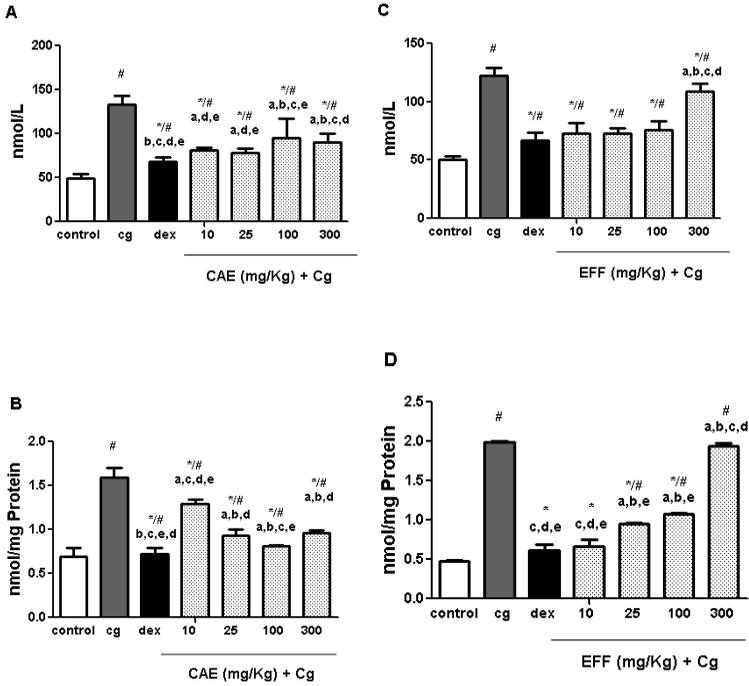


Figure 4

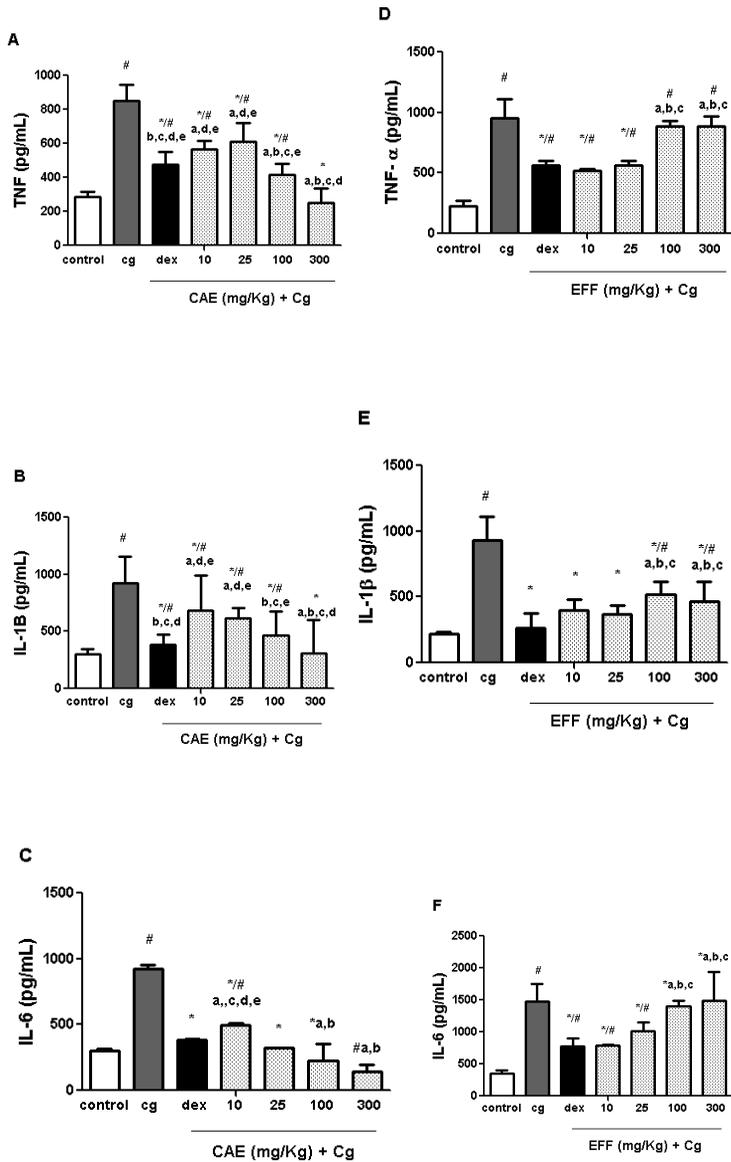
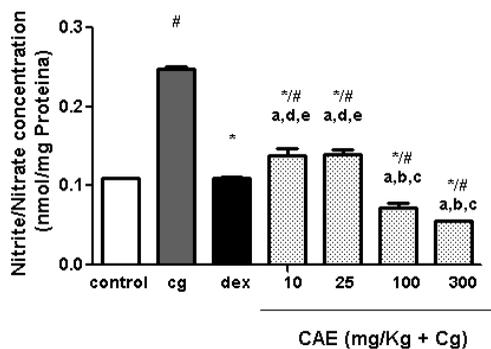


Figure 5

A



B

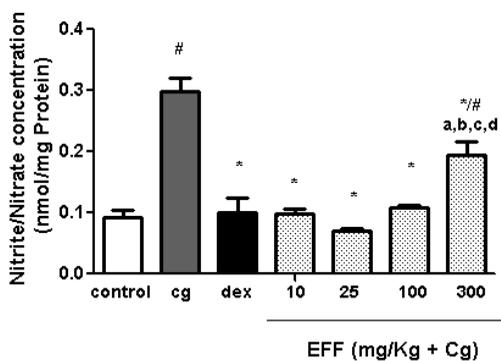


Figure 6

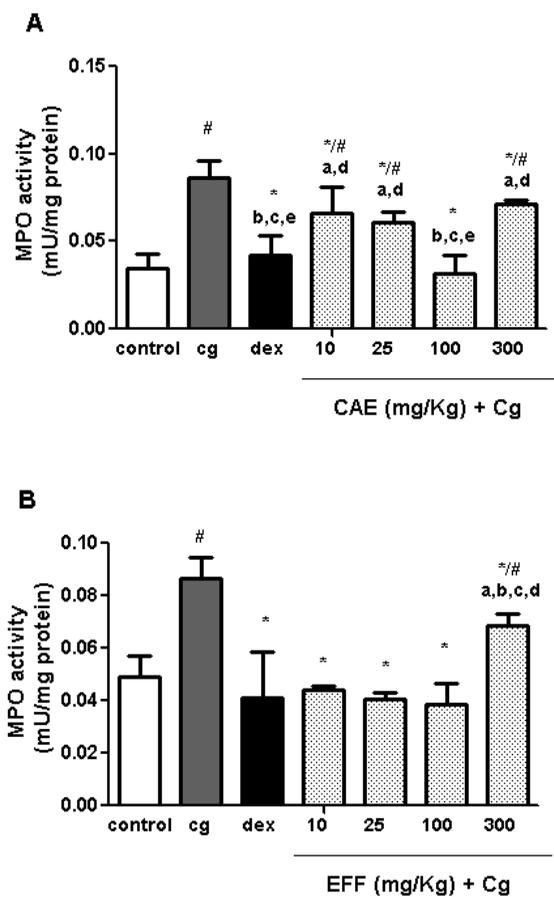
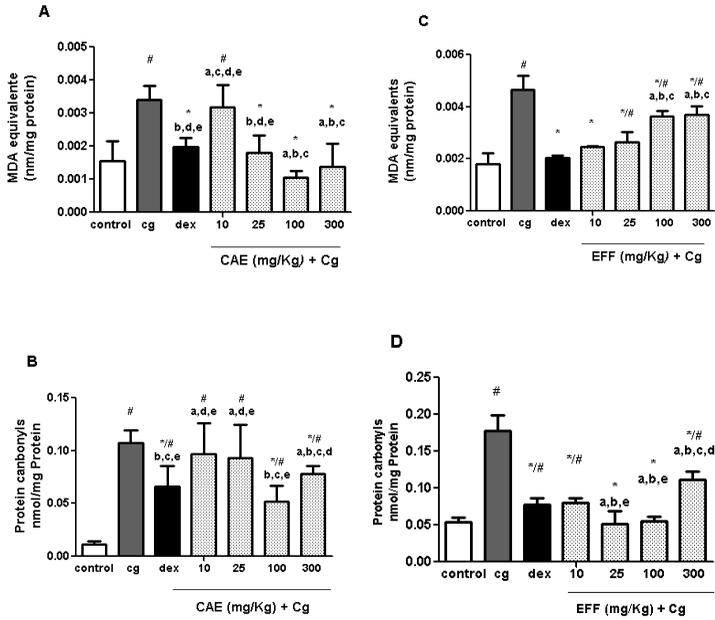


Figure 7



6 DISCUSSÃO GERAL

Espécies do gênero *Cecropia* são utilizadas para o tratamento de problemas respiratórios, como tosse, asma e bronquite, pressão alta, diabetes, inflamações, além de serem empregadas como diurético e cardiotônico a muito tempo pela poluição, utilizando-se principalmente as folhas, além de cascas e brotos nestas preparações (DI STASI et al., 2002; LORENZI; MATOS, 2008; MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000; PIO-CORRÊA, 1978; SIMÕES et al., 1998). A espécie *Cecropia hololeuca*, identificada como “Imbaúba” fez parte da 1ª edição da Farmacopeia Brasileira (SILVA, 1926), fato que corrobora com o uso popular antigo do gênero *Cecropia*.

As espécies mais abundantes na região sul do Brasil são *C. glaziovii* Sneth. E *C. pachystachya* Trécul (BERG; ROSSELLI, 2005). Nos últimos anos, diversos grupos de pesquisa, no Brasil e em países da América Latina estão contribuindo com o conhecimento científico sobre o gênero *Cecropia* com vistas a ampliar os estudos farmacológicos e químicos necessários para comprovar o potencial uso terapêutico das espécies.

Sobre a composição química das espécies estudadas neste trabalho, são descritos como compostos majoritários ácido clorogênico, isoorientina e isovitexina, sendo que estes metabólitos ocorrem concomitantemente em *C. glaziovii* e *C. pachystachya*, porém diferem quantitativamente. Análises das FEF-Cg e FEF-Cp indicaram que estas eram constituídas majoritariamente pelos compostos isoorientina, isovitexina quando comparadas com os EA-Cg e EA-Cp. O ácido clorogênico também está presente, porém, ao contrário do extrato bruto, este é minoritário quando comparado aos flavonoides.

São descritos na literatura um grande número de trabalhos que abordam e demonstram a ação antioxidante e os respectivos mecanismos de ação dos compostos fenólicos, estes estudos datam desde 1948. Mais especificamente sobre flavonoides, entre as várias atividades farmacológicas descritas, destacam-se as atividades anti-inflamatória, anti-asmática, anti-viral, entre outras. Estas atividades podem ser atribuídas, em parte as propriedades antioxidantes e de proteção aos danos oxidativos da membrana celular, cujos mecanismos estão relacionadas a estrutura química e a capacidade de interagir com as ligações lipídicas, características estas consolidadas na literatura internacional (GULCIN, 2012; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; LAGO et al., 2014; PRAVEENA et al., 2013; RICE-EVANS;

MILLER; PAGANGA, 1996; SEKHER et al., 2001; TALHI; SILVA, 2012).

Adicionalmente, estudos da atividade antioxidante atribuída aos flavonoides C-glicosídeos, embora com menor frequência, também são descritos (MATTERSKA et al., 2015; ODONTUYA; HOULT; HOUGHTON, 2005; ORTMANN et al., 2016; PACHECO et al., 2014; TALHI; SILVA, 2012). Cabe destacar que, é conhecido que a atividade antioxidante de isoorientina, flavonoide C-glicosídeo majoritário nas FEF-Cg e FEF-Cp, produz efeitos através da eliminação de EROs. (ANDRADE-CETTO; WIEDENFELD, 2001; CHAILLOU; NAZARENO, 2006; NICASIO-TORRES; ERAZO-GOMEZ; CRUZ-SOUSA, 2009).

De acordo com Halliwell (1995), a atividade antioxidante de um composto ou de uma substância, deve ser avaliada inicialmente *in vitro*, pois o resultado obtido permite verificar o potencial antioxidante da amostra testada. Nesse contexto, a peroxidação lipídica foi avaliada em um estudo pre-eliminar (*in vitro*) pelo ensaio de TBARS, o qual é utilizado extensivamente para estimar a peroxidação dos lipídeos nas membranas e sistemas biológicos.

No presente trabalho, a peroxidação lipídica foi induzida por três diferentes geradores de EROs, sendo o AAPH gerador de radica peroxila (LOOH^\bullet), FeSO_4 gerador de radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e H_2O_2 gerador de radical hidroxila (OH^\bullet). Os extratos de *C. glaziovii* e *C. pachystachya* reduziram os níveis de peroxidação lipídica e reduziram a produção de TBARS.

Os primeiros estudos farmacológicos publicados para a espécie *C. glaziovii* datam de 1996 a 2013. Já os estudos farmacológicos publicados da espécie *C. pachystachya*, são mais recentes e datam de 2003 a 2016, conforme abordado no **Capítulo 2**. Contudo, são poucos estudos com os extratos aquosos das folhas dessas plantas e não são descritas atividades farmacológicas em modelo *in vivo* anti-inflamatório e/ou antioxidante no trato respiratório.

Nos estudos em ratos *Wistar* da presente tese, demonstramos a propriedade anti-inflamatória do extrato aquoso de *C. glaziovii* (EA-Cg) e *C. pachystachya* (EA-Cp) e sua fração (FEF-Cp), pois estas amostras foram capazes de inibir a migração de leucócitos na cavidade pleural dos ratos quando submetidos a indução da pleurisia induzida pela carragenina.

Resultados similares são descritos apenas para a espécie *C. pachystachya*: uma redução significativa no influxo de leucócitos no tecido, foi verificada quando camundongos *Swiss* foram tratados com

extrato metanólico das folhas de *C. pachystachyano* modelo da edema de orelha induzido por óleo de cróton. (ARAGÃO et al., 2013). Ainda mais recentemente nos experimentos de Pacheco et al., (2014) foi demonstrado, através do modelo do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, que o extrato metanólico de *C. pachystachya* reduziu significativamente o influxo de leucócitos no tecido durante a inflamação aguda e crônica.

Além disso, nesta tese foi mostrado que FEF-*Cp*, nas mesmas doses do EA-*Cp*, apresentou resultados semelhantes ao fármaco de referência dexametasona. A atividade anti-inflamatória dos flavonoides, já está bem caracterizada na literatura, em diferentes modelos experimentais tanto *in vivo*, quanto *in vitro*. O flavonoide C-glicosídeo, orientina, demonstrou ser capaz de inibir a migração de leucócitos induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, confirmando assim sua utilidade como uma terapia em doenças inflamatórias. (LEE, KU; BAE, 2014).

O modelo da pleurisia, além de ser considerado muito útil para a triagem de novos fármacos anti-inflamatórios, possui como característica um perfil bimodal (4 e 48 horas) e, em sua primeira fase (4 horas), ocorre um aumento da exsudação com massiva migração leucocitária para a cavidade pleural, sendo na sua grande maioria neutrófilos ativados, perfil característico da resposta imune inata ou natural. (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). As moléculas de reconhecimento utilizados pelo sistema inato são expressas por um grande número de células, este sistema está pronto para agir rapidamente após encontrar um patógeno invasor ou toxina e constitui, assim, a resposta do hospedeiro inicial. (CHAPLIN, 2010).

Estudo recente de *C. pachystachya*, demonstrou que a fração metanólica enriquecida em flavonoides C-glicosídeos do extrato bruto das folhas, reverteu o comportamento depressivo, além de proteger o dano causado pelo estresse oxidativo no sistema nervoso central. (ORTMANN et al., 2016).

A inibição dos níveis da atividade enzimática pelos EA-*Cg*, EA-*Cpe* FEF-*Cp* sobre a atividade da MPO e sobre as concentrações de TBARS foram próximas aos apresentados pelo fármaco de referência dexametasona. Embora não existam até o momento estudos que demonstrem através de um modelo de inflamação no trato respiratório, a capacidade das espécies *C. glaziovii* e *C. pachystachya* em diminuir a atividade desta enzima, foi demonstrado que a FEF-*Cp* reduziu significativamente os níveis da MPO avaliados no balanço oxidativo com perfil neuroprotetor em diferentes regiões cerebrais em ratos. Efeito

este atribuído pelos autores, aos flavonoides C-glicosídeos presentes na fração. (ORTMANN et al., 2016). Além disso, vários estudos apontam que a inibição da exacerbação enzimática pelos flavonoides, é considerada um importante mecanismo celular anti-inflamatório. (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; KIM et al., 2004).

Outro parâmetro bioquímico importante a ser avaliado no processo inflamatório são os níveis da atividade enzimática LDH. Considerada uma enzima citosólica tetramérica, apresenta cinco isoenzimas que catalisam a conversão do lactato a piruvato em todos os tecidos. Sua detecção em concentrações elevadas em fluidos extracelulares é um indicativo de morte ou perda de integridade celular. (HENDERSON, 1984; DRENT et al., 1996).

Os níveis da atividade enzimática da LDH foram diminuídos significativamente, após o tratamento com o EA-Cg, EA-Cp e FEF-Cp, quando comparados com o grupo controle ($P < 0,05$). Adicionalmente verificou-se no tratamento a proteção na integridade de proteínas totais.

A fase aguda do processo inflamatório, caracteriza-se por uma série de eventos inter-relacionados, entre os quais o acúmulo de leucócitos dos vasos para o interior do tecido injuriado. Este processo envolve a participação de diferentes tipos celulares tais como, neutrófilos, macrófagos, mastócitos, linfócitos, plaquetas, células dendríticas, células endoteliais, fibroblastos entre outras. (BARNES, 2013; DENNIS; NORRIS, 2015; KIRKHAM et al., 2011). Além disso, esta ativação promove a produção e liberação pelas células infiltradas no tecido lesado, principalmente os neutrófilos e diversos mediadores inflamatórios tais como: aminas vasoativas (histamina e serotonina), mediadores derivados de lipídeos (prostanoides e leucotrienos), mediadores peptídicos (bradicinina, taquicininas e endotelinas), proteases, entre outros, além de mediadores que têm sua produção estimulada, tais como: IL-1 β , TNF- α , IL-6, quemocinas, NO, EROs entre outros. (OLZA et al., 2012; BARNES, 2013; FUJISHIMA, 2014).

Considerando que os flavonóides são reconhecidos como potentes compostos antioxidantes devido à sua capacidade de eliminação de radicais de EROs e sua capacidade em reduzir as concentrações dos metabólitos do NO (CERQUEIRA et al., 2008). Neste contexto, os nossos resultados demonstraram que o EA-Cg, EA-Cp e FEF-Cp (10-300 mg/Kg), foram capazes de reduzir as concentrações dos níveis de nitrito e nitratos. Cabe ressaltar que, a FEF-Cp (10 mg/Kg) que atingiu níveis semelhantes ao fármaco de referência dexametasona.

Nos experimentos de Ventura (2011), os extratos aquosos de *C. pachystachya* foram capazes de inibir a produção de NO, TNF- α , PGE₂, além de inibir o crescimento micobacteriano, dados que corroboram com o processo de inibição dos metabólitos do NO e das citocinas pelas amostras EA-*Cp* e FEF-*Cp*.

Embora existam muitos componentes celulares e moleculares bem caracterizados do sistema imune inato e adaptativo que influenciam os processos inflamatórios, as interleucinas (IL) são consideradas essenciais na iniciação, regulação e resolução da inflamação. Estudos recentes de ILs provocaram uma mudança de paradigma na compreensão da imunidade inata e adaptativa, pois têm alimentado investigações extensas para estas células, devido ao potencial de influência das ILs na saúde humana e nas doenças, sendo passíveis de estratégias terapêuticas que podem ser utilizadas para modular a resposta de diversas doenças inflamatórias. (SONNENBERG; ARTIS, 2015).

Dentre as citocinas pró-inflamatórias podemos destacar o TNF- α , a IL-1 β e a IL-6 por suas importâncias em diferentes doenças de caráter inflamatório. A IL-6 é produzida amplamente por várias células, tais como fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, monócitos, células T, mastócitos, células tumorais e neuronais. É conhecida como pró-inflamatória, produzida em resposta ao tratamento da carrageninajuntamente com TNF- α e IL-1 β e utilizada muitas vezes como marcador da ativação sistêmica das citocinas pró-inflamatórias. Também há evidências de que a IL-6 pode ter propriedades pró inflamatória e anti-inflamatória. (FRÖDE; SOUZA; CALIXTO, 2002).

Embora diversas citocinas estejam envolvidas no desenvolvimento e estabelecimento da inflamação, sabe-se que o TNF- α e a IL-1 β tem um papel central neste fenômeno principalmente quando a resposta imune inata é proeminente, incluindo a resposta inflamatória presente no modelo da pleurisia induzida pela carragenina. (FRODE; SOUZA; CALIXTO, 2001). Contudo não são encontrados outros estudos que apresentem a ação de *C. pachystachyae* ou *C. glaziovii* sobre as citocinas IL-1 β e IL-6, porém os estudos na inibição das citocinas, entre elas TNF- α , IL-1 β e IL-6 pelos flavonoides são corroborados por Bobe et al., (2010) e Spencer et al., (2012).

As citocinas estão intimamente relacionadas com o estado redox intracelular, ou seja, o aumento da geração de ERO promove uma redução simultânea na atividade do sistema enzimático da defesa antioxidante. Além disso, o estresse oxidativo pode ativar o gene NLRP3 (*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*) este por

sua vez estimula a produção da IL1, considerada uma citocina altamente inflamatória. (OGUNBILEJE et al., 2014). Adicionalmente, em doenças pulmonares, a exacerbação de geração de EROs intracelulares podem levar a apoptose e ao dano do DNA, ainda o conteúdo tóxico de células apoptóticas podem levar a inflamação crônica neste órgão. (ERWIG; HENSON, 2008).

No que concerne aos níveis de o TNF- α , as IL-1 β e IL-6 na cavidade pleural durante o processo inflamatório gerado pela carragenina, apenas o EA-Cg, não apresentou resultado significativo para a IL-6. Melhor resultado verificou-se para a FEF-Cp frente as citocinas avaliadas, se comparados com o grupo controle e também ao fármaco dexametasona (P<0,05).

No intuito de investigar as atividades farmacológicas das espécies estudadas, foi observado que ambas apresentaram atividade frente aos parâmetros inflamatórios avaliados e do estresse oxidativo. Entre as espécies estudadas, *C. pachystachya* demonstrou atividade anti-inflamatória mais promissora em relação a inibição da maioria dos parâmetros estudados se comparado com *C. glaziovii*. Além disso, foi possível observar com relação aos parâmetros do estresse oxidativo, avaliados no tecido pulmonar, *C. pachystachya* demonstrou ser mais efetiva que *C. glaziovii*, inibindo a atividade da MPO, na proteção ao dano lipídico e na integridade de proteínas com grupos carbonilas.

Os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo*, permitiram inferir que o EA-Cp é mais promissora sob o ponto de vista farmacológico, que nos conduziu a uma nova perspectiva de investigação *in vivo* com a fração enriquecida em flavonoides C-glicosídeos no modelo da pleurisia. Possibilitando verificar uma resposta mais efetiva com a FEF-Cp.

No decorrer do trabalho, algumas hipóteses foram surgindo, porém não puderam ser abordadas na presente tese, tornando-se assim temas a serem respondidos por trabalhos futuros. Como perspectivas, pode-se destacar:

- Realização de estudos avaliando-se as atividades de *C. glaziovii* e *C. pachystachya* na asma brônquica em camundongos;
- Realização de estudos para detalhar o mecanismo de ação anti-inflamatório e antioxidante das espécies estudadas.

7 CONCLUSÃO

Este foi o primeiro estudo *in vitro* e *in vivo*, através da via de administração intragástrica do extrato aquoso e fração enriquecida em flavonoides C-glicosídeos a demonstrar o efeito anti-inflamatório e a proteção ao dano oxidativo de *Cecropia glaziovii* e *C. pachystachya*. Os resultados obtidos no presente estudo, indicam que as espécies estudadas apresentam importantes propriedades anti-inflamatória e antioxidante avaliadas no modelo de pleurisia induzida pela carragenina em ratos, uma vez que:

- Os extratos aquosos e suas frações das folhas das espécies estudadas, caracterizados quimicamente quanto aos seus compostos majoritários, demonstraram possuir proteção ao dano causado pela peroxidação lipídica, avaliados *in vitro*, porém os resultados das frações enriquecidas em flavonoides (FEF-Cg e FEF-Cp) foram mais efetivos, onde concentrações menores foram capazes de exercer maior proteção ao dano lipídico da membrana;

- Diminuíram a migração de leucocitos bem como mediadores liberados por células, como NO, no exsudato pleural;

- Diminuíram os níveis de proteínas totais e a atividade enzimática da LDH;

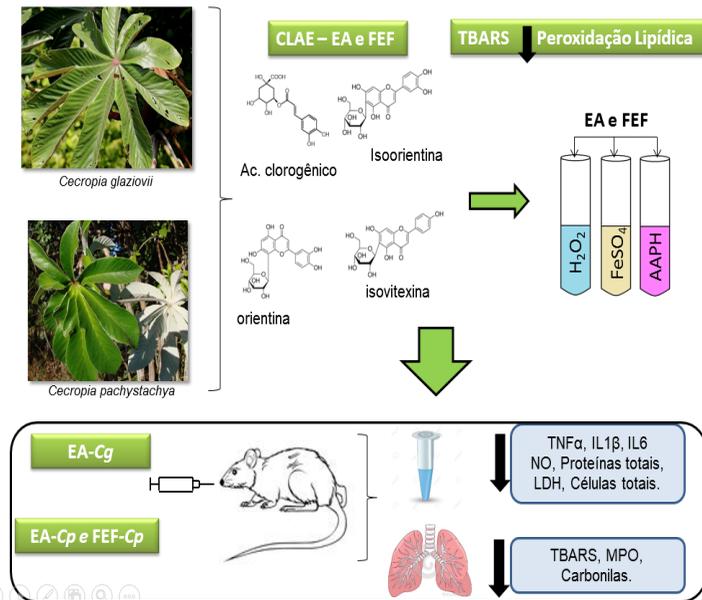
- Promoveram inibição de citocinas pró-inflamatórias do tipo IL-1 β , IL-6 e TNF- α , responsáveis pela quimiotaxia de leucocitos, no modelo experimental estudado. Com exceção do EA-Cg que não demonstrou resultado significativa para IL-6;

- Promoveram inibição da ativação celular no tecido pulmonar por meio de enzimas do tipo MPO, uma vez que esta enzima e reconhecida ser um marcador de neutrófilos ativados e da geração de EROs;

- Protegeram o tecido pulmonar quanto ao dano oxidativo, diminuindo níveis de TBARS, grupos carbonilas e sulfidrilas;

As frações enriquecidas de *C. pachystachya* e a dexametasona foram também semelhantes na maioria dos ensaios bioquímicos avaliados, demonstrando que provavelmente as duas substâncias possuem algumas vias comuns de ação anti-inflamatória. Adicionalmente os estudos demonstraram que este efeito pode estar relacionado com a ação da planta na proteção ao dano lipídico. Futuros estudos devem ser realizados na tentativa de melhor elucidar o mecanismo de ação anti-inflamatório da planta.

Figura 15 – Resumo gráfico dos efeitos anti-inflamatório e antioxidante das espécies *Cecropia glaziovii* e *Cecropia pachystachya*



REFERÊNCIAS

- ADIBHATLA, R. M.; HATCHER, J. F. Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxidants & redox signaling**, v.12, p.125-169, 2010.
- AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, n. 2-3, p. 141-145, 2001.
- ALBANO, M. N. et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 3, p. 612-617, 2013.
- ANDRADE-CETTO, A.; WIEDENFELD, H. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 145-149, 2001.
- ARAGÃO, D. M. O. et al. Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 629-633, 2010.
- ARAGÃO, D. M. O. et al. Anti-Inflammatory, Antinociceptive and cytotoxic effects of the methanol extract of *Cecropia pachystachya* Trécul. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 6, p. 926-930, 2013.
- AREM, H. et al. Flavonoid intake and risk of pancreatic cancer in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study Cohort. **British journal of cancer**, v. 108, n. 5, p. 1168-72, 2013.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1-31, 2014.
- BARNES, P. J. New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 7, p. 543-559, 2013.

- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal**: as bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre: Artmed, 2001.
- BASTIANETTO, S.; ZHENG, W. H; QUIRION, R. The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: involvement of its flavonoid constituents and protein kinase C. **Journal of Neurochemistry**. n. 74, v. 6, p. 228-77, 2000.
- BAUER, A.; BRONSTRUP, M. Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. **Nat Prod Rep.**, v.31, n. 1, p. 35-60, 2014.
- BELLIK, Y. et al. Molecular mechanism underlying anti-inflammatory and anti-allergic activities of phytochemicals: an update. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 18, n. 1, p. 322-353, 2012.
- BERG, C. C. *Cecropiaceae* a new family of Urticales. **Taxon**, v. 27, p. 39-44, 1978.
- BERG, C. C.; ROSSELLI, P. F. *Cecropia*. New York: Flora Neotropica; Botanical Garden, 2005.
- BIGLIANI, M.C. et al. Effects of *Cecropia pachystachya* and *Larrea divaricata* aqueous extracts in mice. **Human & Experimental Toxicology**, v. 29, p. 601-6, 2010.
- BOBE, G. et al. Serum cytokine concentrations, flavonol intake and colorectal adenoma recurrence in the Polyp Prevention Trial. **British journal of cancer**, v. 103, n. 9, p. 1453-1461, 2010.
- BONNES, T., GUÉRIN, T. Is malonaldehyde a valuable of peroxidation? **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v.44, n. 5, p.985-988, 1992.
- BOUAYED, J.; BOHN, T. Exogenous Antioxidants Double-Edged Swords in Cellular Redox State: Health Beneficial Effects at

Physiologic Doses versus Deleterious Effects at High Doses. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n. 4, p. 228-237, 2010.

BRAGA, F. C. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition by Brazilian plants. **Fitoterapia**, v. 78, n. 5, p. 353-358, 2007.

BRUNETON J. **Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales**. 3rd ed. Paris: TEC & DOC, 1999.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, p. 749-760, 1997.

CARTA, S. et al. DAMPs and inflammatory processes: the role of redox in the different outcomes. **Journal of leukocyte biology**, v. 86, n. 3, p. 549-55, 2009.

CASLAKE, M. J.; PACKARD, C. J. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as a biomarker for coronary disease and stroke. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med.**, 2, n. 10, p. 529-535, 2005.

CATALA A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. **Chemistry and physics of lipids**, v.157, p.1-11, 2009.

CERQUEIRA, F. et al. He natural prenylated flavone artelastin is an inhibitor of ROS and NO production. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 597-602, 2008.

CHAILLOU, L. L.; NAZARENO, M. A. New method to determine antioxidant activity of polyphenols. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, p. 8397-8402, 2006.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S3-S23, 2010.

CHEN, X. et al. Catalase transgenic mice: characterization and sensitivity to oxidative stress. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 422, p. 197-210, 2004.

CIZ, M. et al. Flavonoids inhibit the respiratory burst of neutrophils in mammals. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2012.

CONSOLINI, A. E. et al. Cardiotoxic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 90-96, 2006.

CONSOLINI, A. E.; MIGLIORI, G. N. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 417- 422, 2005.

COSTA, G. M. et al. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 6, p. 1096-1102, 2011.

COSTA, G. M.; SCHENCKEL, E. P.; REGINATTO, F. H. Chemical and Pharmacological Aspects of the Genus *Cecropia*. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 6, p. 913-920, 2011.

DAVID, J. N.; GORDON, M. C. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod.** v. 79, n. 3, 629-661, 2016.

CRUZ, E. D. M. et al. Leishmanicidal activity of *Cecropia pachystachya* flavonoids: Arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. **Phytochemistry**, v. 89, p. 71-77, 2013.

GUO, J. J.; HSIEH, H. Y.; HU, C. H. Chain-breaking activity of carotenes in lipid peroxidation: a theoretical study. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 113, p.15699-15708. 2009.

CUNHA, A. **Farmacognosia e fitoquímica**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2010.

CUZZOCREA, S. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- α contributes to the anti-inflammatory activity of glucocorticoids. **Mol Pharmacol**, v. 73, n. 2, p. 323-337, 2008.

CYSNEIROS, R. M. **Mecanismo da ação hipotensora do extrato aquoso e frações purificadas de *Cecropia glazioui* Sneath**. 1996, 72f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1996.

- DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **J. Cell. Mol. Med.** v. 10, n. 2, p. 389-406, 2006.
- DALMARCO, E. M. et al. Antioxidant effects of mycophenolate mofetil in a murine pleurisy model. **Transplant Immunology**, v. 22, n. 1-2, p. 12-17, 2009.
- DE YOUNG, L. M. et al. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents and Actions**, v. 26, n. 3-4, p. 335-41, 1989.
- DELA CRUZ, MARI GEMMA. **Plantas medicinais de Mato Grosso: a farmacopeia popular dos raizeiros.** Cuiabá MT, Carlini e Caniato, 2008.
- DELARCINA JÚNIOR, S. et al. Inhibition of, histamine-induced bronchospasm in guinea pigs treated with *Cecropia glaziovii* Sneth and correlation with the in vitro activity in tracheal muscles. **Phytomedicine**, v.14, p. 328-332, 2007.
- DENNIS, E. A.; NORRIS, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 8, p. 511-523, 2015.
- DI STASI, L. C.; SEITO, L. N.; HURUMA-LIMA, C. A. Urticales medicinais In:____.DI STASI, L. C.; HURUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica.** São Paulo: UNESP, 2002. p. 230-233.
- DINARELLO, C. A. Historical Review of Cytokines. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. Suppl 1, p. S34-S45, 2007.
- DRENT, M. et al. Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation. **European Respiratory Journal**, v. 9, n. 8, p. 1736-1742, 1996.
- DUQUE, A. P. et al. In vivo wound healing activity of gels containing *Cecropia pachystachya* leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 128-138, 2016.

DZOYEM, J. P.; ELOFF, J. N. Anti-inflammatory, anticholinesterase and antioxidant activity of leaf extracts of twelve plants used traditionally to alleviate pain and inflammation in South Africa. **J Ethnopharmacol.**, v. 160, p. 194-201, 2015.

EATON, J.W.; QIAN, M. Molecular basis of cellular iron toxicity. **Free Radical Biology and Medicine**, v.32, p.833-40, 2002.

ERWIG, L. P.; HENSON, P. M. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. **Cell Death and Differentiation**, v. 15, n. 2, p. 243-250, 2008.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and Biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology and Medicine**, v.11, p. 81-128, 1991.

FACINO, R. M.; CARINI, G.; ALDINI, G. Antioxidant activity of nimesulide and its main metabolites. **Drugs**, v.46, p.15-21, 1993.

FORBES, L. V. et al. Potent Reversible Inhibition of Myeloperoxidase by Aromatic Hydroxamates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 51, p. 36636-36647, 2013.

FRANÇA, B. K. et al. Peroxidação lipídica e obesidade: métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 20, n. 5, p. 199-206, 2013.

FRÖDE, T. S.; SOUZA, G. E. ; CALIXTO, J. B. the Effects of Il-6 and Il-10 and Their Specific Antibodies in the Acute Inflammatory Responses Induced By Carrageenan in the Mouse Model of Pleurisy. **Cytokine**, v. 17, n. 3, p. 149-156, 2002.

FUJISHIMA, S. Pathophysiology and biomarkers of acute respiratory distress syndrome. **Journal of intensive care**, v. 2, n. 1, p. 32, 2014.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 4, n. 3, p. 281-286, 2005.

GALATI, G.; O'BRIEN, P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 287-303, 2004.

GAZAL, M. et al. Antidepressant-like effects of aqueous extract from *Cecropia pachystachya* leaves in a mouse model of chronic unpredictable stress. **Brain research bulletin**, v. 108, p. 10-17, 2014.

GAZAL, M. et al. Preventive Effect of *Cecropia pachystachya* Against Ketamine-Induced Manic Behavior and Oxidative Stress in Rats. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 7, p. 1421-1430, 2015.

GERENUTTI, M. et al. The effect of *Cecropia glaziovii* Sneth. lage on the physical and neurobehavioral development of rats. **Pharmazie**, v. 63, n. 5, p. 398-404, 2008.

GOMES, M. R. F. **Estudo químico dos extratos hexano e diclorometano da folhas de *Cecropia obtusa* (Cecropiaceae)**. 2003. 119 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2003.

GRANGER, D. N.; SENCHENKOVA, E. **Inflammation and the Microcirculation**. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, 2010.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-899, 2011.

GROTTO, D. et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 2, p. 619-624, 2007.

GULCIN, I. Antioxidant activity of food constituents: An overview. **Archives Toxicology**, v. 86, p. 345-391, 2012.

HALLIWELL, B.; ARUOMA, O. I. DNA damage by oxygen-derived species. **Febs**, v. 281, n. 1-2, p. 9-19, 1991.

HALLIWELL, B. Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 54, n. 5, p. 505-510, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**. 3. ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS Letters**, v. 486, n. 1, p. 10-13, 2000.

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: How should we move forward? **Cardiovascular Research**, v. 47, n. 3, p. 410-418, 2000.

HALLIWELL, B.; RAFTER, J.; JENNER, A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? **The American journal of clinical nutrition**, v. 81, n. 1 Suppl, p. 268-276, 2005.

HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiol.**, v. 141, p. 312-322, 2006.

HALLIWELL, B. Cell Culture, Oxidative Stress, and Antioxidants: Avoiding Pitfalls. **Biomed J.** v. 37, n. 3, p. 99-105, 2014.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, n. 2, p. 107-112, 2008.

HAMILTON, M. L. et al. C-Glucosylflavonoid biosynthesis from 2-hydroxynaringenin by *Desmodium uncinatum* (Jacq.) (Fabaceae). **Tetrahedron Letters**, v.50, p.5656-5659. 2009.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol Ther**, v, 96, n. 2-3, p. 67-202, 2002.

HE, R. R. et al. A new oxidative stress model, 2,2-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride induces cardiovascular damages in chicken embryo. **Plos one**, v. 8, n. 3, 2013.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.

HENDERSON, R. F. Use of bronchoalveolar lavage to detect lung damage. **Environmental Health Perspectives**, v. 56, p. 115-129, 1984.

HENDRICH, A. B. Flavonoid-membrane interactions: Possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 27, n. 1, p. 27-40, 2006.

HENSLEY, K. et al. Dietary choline restriction causes complex I dysfunction and increased H₂O₂ generation in liver mitochondria. **Carcinogenesis**. v. 21, n. 5, p. 983-989, 2000.

HERNÁNDEZ-TERRONES, M. G. et al. Allelopathic Action of *Cecropia pachystachya* Extracts on the Growth of Guinea Grass (*Panicum maximum*). **Planta Daninha**, v. 25, n. 4, p. 763-769, 2007.

HIKAWCZUK, V. J. et al. Anti-inflammatory activity of compounds isolated from *Cecropia pachystachya*. **Anales de la Asociación Química Argentina**, v. 86, p. 167-170, 1998.

KIRKHAM, P. A. et al. Oxidative stress-induced antibodies to carbonyl-modified protein correlate with severity of chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 184, p. 796-802, 2011.

HODGES, D. M. et al. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**, v. 207, n. 4, p. 604-611, 1999.

HOLZEROVÁ, E.; PROKISCH, H. Mitochondria: Much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production? **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 63, p. 16-20, 2015.

KAMPER, E. F. et al. Sex differences in oxidant/antioxidant balance under a chronic mild stress regime. **Physiology & Behavior**, v. 98, n. 1-2, p. 215-222, 2009.

KARAKAYA, s. Bioavailablilty of phenolic compouns. Critical reviews in food. **Science and nutrition**, v. 44, n.6, p.453-464, 2004.

KIM, H. P. et al. Critical Review Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 96, p. 229 - 245, 2004.

KLEBANOFF, S. J. et al. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, n. 2, p. 185-198, 2013.

LACAILLE-DUBOIS; FRANCK, U.; WAGNER, H. Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 8, n. 1, p. 47-52, 2001.

LAGO, J. et al. Structure-Activity Association of Flavonoids in Lung Diseases. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 3570-3595, 2014.

LEE, W.; KU, S.K.; BAE, J. S. Vascular barrier protective effects of orientin and isoorientin in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. **Vascul Pharmacol.**, v. 62, 1, p. 3-14, 2014.

LEE, S. C. et al. Bioflavonoids commonly and potently induce tyrosine dephosphorylation/inactivation of oncogenic proline-directed protein kinase FA in human prostate carcinoma cells. **Anticancer Res.**, v. 18, n. 2, p. 1117-1121, 1998.

LEE, S. E.; PARK, Y. S. Role of lipid peroxidation-derived α , β -unsaturated aldehydes in vascular dysfunction. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, 2013.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 464-478, 1990.

LI, H. et al., Critical Role of Peroxiredoxin 6 in the Repair of Peroxidized Cell Membranes Following Oxidative Stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 87, p. 356-365, 2015.

LI, H.; HORKE, S.; FÖRSTERMANN, U. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 6, p. 313-319, 2013.

LIMA, É. S.; SAES, D.; ABDALLA, P. Peroxidação lipídica : mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIMA-LANDMAN, M. T. R. et al. Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: an in vivo approach to the hypotensive mechanism. **Phytomedicine**, v. 14, n. 5, p. 314-320, 2007.

LITVINOV, V. P. Chemistry and biological activities of 1,8-naphthyridines. **Russian Chemical Reviews**, v. 73, n. 7, p. 637-670, 2007.

LONDOÑO-LONDOÑO, J. et al. Hesperidin and hesperetin membrane interaction: Understanding the role of 7-O-glycoside moiety in flavonoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 499, p. 6-16, 2010.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Nova Odessa: **Plantarum**, 1998, v. 2, 352p.

LORENZI, H. MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarium de Estudos da Flora Ltda, p.520-521, 2008.

LOWRY, H. O. et al. The folin by oliver. **Readings**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUSTER, AD.; ALON, R.; VON ANDRIAN, U. H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nature Immunology**, v. 6, p.1182 - 1190, 2005.

MACMICKING, J. D. et al. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell*, v. 81, n. 4, p. 641-650, 1995.

MACHADO, E. C. et al. Two new 11 α , 12 α -epoxy-ursan-28, 13 β -olides and other triterpenes from *Cecropia catharinensis*. **Natural Products Research**, n. 22, p. 1310-1316, 2008.

MACIEL, E. et al. Detection of phosphatidylserine with a modified polar head group in human keratinocytes exposed to the radical generator AAPH. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 548, p. 38-45, 2014.

MAQUIAVELI, C. C. et al. *Cecropia pachystachya* extract attenuated the renal lesion in 5/6 nephrectomized rats by reducing inflammation and renal arginase activity. **Journal Ethnopharmacology**, v. 2, n.158, p. 49-57, 2014.

MATERSKA, M. et al. Antioxidant activity and protective effects against oxidative damage of human cells induced by X-radiation of phenolic glycosides isolated from pepper fruits *Capsicum annum* L. **Food Chem.** v. 1, n. 168, p. 546-553, 2015.

MCNEILL, E. et al. Regulation of iNOS function and cellular redox state by macrophage Gch1 reveals specific requirements for tetrahydrobiopterin in NRF2 activation. **Free radical biology & medicine**, v. 79, p. 206-16, 2015.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-776, 2010.

MEDZHITOV, R. Review Article Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, 428-435, 2008.

MEDZHITOV, R; HORNG, T. Transcriptional control of the inflammatory response. **Nat Rev Immunol.** v. 9, n. 10, p. 692-703, 2009.

MIDDLETON, E. E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MILES, A. M.; GRISHAM, M. B. **Methods enzymology**, v. 234, p.555-572, 1994.

MITTAL, M. et al. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxidants & redox signaling**, v. 20, n. 7, p. 1126-67, 2014.

MOON, J. K., SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.57, p.1655-1666. 2009.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal plants of Brazil**. Algonac: Reference Publications, 2000.

NARASARAJU, T. et al. Excessive Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Contribute to Acute Lung Injury of Influenza Pneumonitis. **The American Journal of Pathology**, v. 179, n. 1, p. 199-210, 2011.

NAUSEEF, M., W. Myeloperoxidase in human neutrophil host defense. **Cell Microbiolody**, n.16, v.8, p. 1146-1155, 2014.

NATHAN, C.; DING, A. SnapShot: Reactive Oxygen Intermediates (ROI). **Cell Microbiolody**, v. 140, n. 6, p. 951-951, 2010.

NEGRI, G.; RODRIGUES, E. Essential oils found in the smoke of “tira-capeta”, a cigarette used by some quilombolas living in pantanal wetlands of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 310–316, 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G.M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NGO, L. T.; OKOGUN, J. I.; FOLK, W. R. 21st century natural product research and drug development and traditional medicines. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 4, p. 584-92. 2013.

NICASIO, P. et al. Hypoglycemic effect and chlorogenic acid content in two *Cecropia* species. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 661-664, 2005.

NICASIO-TORRES, M. D. P.; ERAZO-GÓMEZ, J. C.; CRUZ-SOSA, F. In vitro propagation of two antidiabetic species known as guarumbo: *Cecropia obtusifolia* and *Cecropia peltata*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n. 5, p. 905-914, 2009.

NICKAVAR, B., KAMALINEJAD, M., IZADPANAH, H. In vitro free radical scavenging activity of five *Salvia* species. Pakistan. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 20, p. 291-294, 2007.

NIJVELDT, R. . Flavonoids : a review of probable mechanism of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418-425, 2001.

NINAHUAMAN, M. F. M. L. et al. Activity during the hypotension produced by standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth: a comparative study to captopril effects in rats. **Phytomedicine**, v.14, n. 5, p. 321-327, 2007.

NOGUCHI, N, et al. 2, 29-Azobis (4-Methoxy-2,4-Dimethylvaleronitrile), a new lipid-soluble azo Iinitiator: application to oxidations of lipids and low-density lipoprotein in solution and in aqueous dispersions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, p. 259-268, 1998.

ODONTUYA, G.; HOULT, J. R. S.; HOUGHTON, P. J. Structure-Activity Relationship for Antiinflammatory Effect of Luteolin and its Derived Glycosides. **Phytotherapy Research Phytother**, v. 19, p. 782-786, 2005.

OGUNBILEJE, J. O. et al. Particles internalization, oxidative stress, apoptosis and pro-inflammatory cytokines in alveolar macrophages exposed to cement dust. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 3, p. 1060-1070, 2014.

OHSHIMA, H. et al. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: Effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 25, n. 9, p. 1057-1065, 1998.

OLIVEIRA, R. R. et al. Pharmacological evaluation of *Cecropia purpurascens* Berg. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 72, n. 2, p. 289-295, 2000.

OLZA, J. et al. Myeloperoxidase Is an Early Biomarker of Inflammation and Cardiovascular Risk in Prepubertal Obese Children. **Diabetes Care**, v. 35, n. 11, p. 2373-2376, 2012.

ORTMANN, F. C. **Avaliação da estabilidade de extratos, frações e flavonoides C-glicosídeos presentes em *Cecropia glaziovii***. 2013. 122f. , Dissertação (Mestrado em Farmácia)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

ORTMANN, C. F. et al. Enriched Flavonoid Fraction from *Cecropia pachystachya* Trécul Leaves Exerts Antidepressant-like Behavior and Protects Brain Against Oxidative Stress in Rats Subjected to Chronic Mild Stress. **Neurotoxicity Research**, v. 29, n. 4, p. 469-483, 2016.

PACHECO, N. R. et al. *Cecropia pachystachya*: A Species with Expressive In Vivo Topical Anti-Inflammatory and In Vitro Antioxidant Effects. **Bio Med research international**, v. 2014, p. 301-294, 2014.

PAUMANN-PAGE, M. et al. Inactivation of human myeloperoxidase by hydrogen peroxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 539, n. 1, p. 51-62, 2013.

PERRON, N.R.; BRUMAGHIM, J. L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. **Cell Biochem Biophysics**, v. 53, p.75-100. 2009.

PENG, C. et al. Biology of ageing and role of dietary antioxidants. **Bio Med research international**, v. 2014, p. 831841, 2014.

PETRONILHO, F. et al. Hepatoprotective effects and HSV-1 activity of the hydroethanolic extract of *Cecropia glaziovii* (embauba-vermelha) against acyclovir-resistant strain. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 7, p. 911-918, 2012.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal Natural Products**. v. 63, p. 1035-1042. 2000

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

PIZZIMENTI, S. et al. Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. **Frontiers in physiology**, v. 4, n. 4, 2013.

PINHEIRO, G. B.V. **Terpenóides de *Cecropia palmata* (Moraceae)**. 1999. 70 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Pará, Belém.

PIO-CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1978.

PRAVEENA, R. et al. Experimental and DFT studies on the antioxidant activity of a C-glycoside from *Rhynchosia capitata*. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 103, p. 442-452, 2013.

REVUELTA, L. et al. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions**, v. 161, p.79-91, 2006.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

RIBEIRO, A. R. **Ação bloqueadora de canais de cálcio de compostos terpenoidais presentes no extrato etanólico de *Cecropiaadenopus***

Mart. (Moraceae), Embaúba. 1999. Thesis (Doutorado)- Federal University of Maranhão, São Luiz, Brazil.1999.

RICE-EVANS, C. Flavonoid antioxidants. **Current medicinal chemistry**, v. 8, p. 797-807, 2001.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

ROCHA, F. F.; LAPA A. J.; DE LIMA T. C. M. Evaluation of the anxiolytic-like effects of *Cecropia glazioui* Sneth in mice. **Pharmacology and Biochemical and Behavior**, v. 71, p. 183- 190, 2002.

ROCHA, F. F. et al. Antidepressant-like effect of *Cecropia glazioui* Sneth and its constituents-In vivo and in vitro characterization of the underlying mechanism. **Phytomedicine**, v.14, p. 396-402, 2007.

SALEH, T. S. F.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, n. 3, p. 811-819, 1996.

SANDHAR, H. K. et al. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v. 1, n. 1, p. 25-41, 2011.

SAKIHAMA et al. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. **Toxicology**, v. 177, p. 67-80, 2002.

SCHINELLA, G. et al. Anti-inflammatory and apoptotic activities of pomolic acid isolated from *Cecropia pachystachya*. **Planta Medica**, v. 74, n. 3, p. 215-220, 2008.

SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annu Rev Journal of Biomedical Engineering**, v. 8, p. 93-131, 2006.

SCHOCK, B. C. et al. Oxidative stress and increased type-IV collagenase levels in bronchoalveolar lavage fluid from newborn babies. **Pediatric research**, v. 50, n. 1, p. 29-33, 2001.

SCOTTI, L. et al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, 2007.

SEKHER P. A. et al. Flavonoid B-Ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, n. 5, p. 1161-1168, 2001.

SEN, S.; CHAKRABORTY, R. The Role of Antioxidants in Human Health. **Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy**, v. 1083, p. 1-37, 2011.

SENA, L. M. et al. Neuropharmacological Activity Of The Pericarp Of *Passiflora edulis flavicarpa* Degener: Putative Involvement Of C-Glycosylflavonoids. **Experimental Biology and Medicine**. v. 23, n. 4, p. 967-975, 2009.

SHIRLEY, R.; ORD, E.; WORK, L. Oxidative Stress and the Use of Antioxidants in Stroke. **Antioxidants**, v. 3, n. 3, p. 472-501, 2014.

SILVA, D. C.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K. M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. *Química Nova*, v. 34, n. 2, p. 300-305, 2011.

SILVA, I. T. et al. In vitro antiherpes effects of a C-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth. *Letters in Applied Microbiology*, v. 51, n. 2, p. 143-148, 2010.

SILVA, R. A. D. **Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil**, São Paulo: Nacional, 1926.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: UFRGS, 1998.

SONNENBERG, G. F.; ARTIS, D. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. **Nature medicine**, v. 21, n. 7, p. 698-708, 2015.

SOUCCAR, C. et al. Inhibition of gastric acid secretion by a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth and underlying mechanism. **Phytomedicine**, v. 15, n. 6-7, p. 462-469, 2008.

SPENCER, J. P. E. et al. Neuroinflammation: Modulation by flavonoids and mechanisms of action. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 33, n. 1, p. 83-97, 2012.

STANGE, V. S. et al. Avaliação do efeito mutagênico do extrato hidroalcoólico bruto, por meio de bioensaios in vivo e prospecção fitoquímica de *Cecropia glaziovii* Sneth (embaúba), *Cecropiaceae*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2, p. 637-642, 2009.

SYTSMA, K. J. et al. Urticalean rosids: circumscription, rosid ancestry, and phylogenetics based on *rbcL*, *trnL-F*, and *ndhF* sequences. **American Journal of Botany**, v. 89, p. 1531-1546, 2002.

SZEFLER, S. J. et al. Asthma outcomes: biomarkers. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 3, p. S9-S23, 2012.

SUN, Y. et al. Metabolic changes of H2S in smokers and patients of COPD which might involve in inflammation, oxidative stress and steroid sensitivity. **Scientific Reports**, v. 12, n. 5, 2015.

TAK, P. P.; FIRESTEIN, G. S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. **J Clin Invest.**, v. 107, n. 1, p. 7-11, 2001.

TALHI, O.; SILVA, A. M. S. Advances in C-glycosylflavonoid Research. **Current Organic Chemistry**, v. 16, p. 859-896, 2012.

TANG, Y. Z; LIU, Z. Q. Free-radical-scavenging effect of carbazole derivatives on AAPH-induced hemolysis of human erythrocytes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p.1903-1913, 2007.

TANAE, M. M. et al. Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antiacid secretion and antidepressant-like activities. **Phytomedicine**, v. 14, n. 5, p. 309-313, 2007.

TOYAMA, D. O. et al. An Evaluation of 3-Rhamnosylquercetin, a Glycosylated Form of Quercetin, against the Myotoxic and

Edematogenic Effects of sPLA₂ from *Crotalus durissus terrificus*.

BioMed Research International, 2014.

TSUCHIYA, H. Structure-dependent membrane interaction of flavonoids associated with their bioactivity. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 1089-1096, 2010.

UCHÔA, V. T. et al. Antimalarial activity of compounds and mixed fractions of *Cecropia pachystachya*. **Drug Development Research**, v. 71, n. 1, p. 82-91, 2009.

UCHOA, V. T. **Avaliação das atividades biológicas dos extratos e frações das espécies *Cecropiapachystachya TRÉCUL.* (*Cecropiaceae*) e *Ximenia americana L.* (*Olacaceae*) e o estudo fitoquímico das *C. pachystachya* guiado pelo bioensaioantimalárico *in vivo*.** 2004. thesis (Doutorado)- Federal University of Alagoas, Recife, Brazil, 2004.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VÁZQUEZ-TORRES, A. Redox Active Thiol Sensors of Oxidative and Nitrosative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 17, n. 9, p. 1201–1214, 2012.

VASQUEZ-MARTINEZ, Y. et al. Structure-activity relationship studies of flavonoids as potent inhibitors of human platelet 12-hLO, reticulocyte 15-hLO-1, and prostate epithelial 15-hLO-2. **Bioorg Med Chem.**, v. 15, n. 23, p. 7408-25, 2007.

VARGAS, A. et al. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**, v. 78, p. 112-119, 2007.

VENTURA, T.L.B. **Atividade anti-inflamatória e antimicrobacteriana de Espécies vegetais ocorrentes no Brasil com ênfase em *Cecropia pachystachya* e *Vochysia divergens*.** 2011. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia)- Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2011.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VELÁZQUEZ, E. et al. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v. 74, n. 1-2, p. 91-97, 2003.

VIANNA-FILHO, M. D. M. et al. *Cecropia* (*Cecropiaceae*): guia para coleta. **Albertoa, (Urticales)**. v. 23, p. 165-170. 2005.

VINEGAR, R. et al. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in rat. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. **Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 143, p. 704-711, 1973.

WEIDINGER, A.; KOZLOV, A. V. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 472- 84, 2015.

YANG, D. et al. Flavonoid C -glycosides from star fruit and their antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 16, p. 204-210, 2015.

YU, S. L. et al. Immunopathological roles of cytokines, chemokines, signaling molecules, and pattern-recognition receptors in systemic lupus erythematosus. **Clinical and Developmental Immunology**, 2012.

ZENG, P. et al. Advances in studying of the pharmacological activities and structure–activity relationships of natural C-glycosylflavonoids. **Acta Pharmaceutica Sinica** , v.3, n. 3, p. 154-162, 2013.

ZUCOLOTTO, S. M. et al. Analysis of C-glycosyl Flavonoids from South American Passiflora Species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical Analysis**. v. 23, n. 3, p. 232-239, 2012.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Resumos apresentados em anais de congressos

Simony Davet Müller, Caroline Flach Ortmann, Fernanda Amélia Martins, Drielly Florentino, Lucinéia Gainski Danielski, Andriele Vieira, Fabricia Petronilho And Flavio Henrique Reginatto. ESTUDOS PRELIMINARES DE ANÁLISE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE *Cecropiapachystachya* Trécul (EMBAÚBA-PRATEADA). In: I Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas. I Seminário Ibero-americano de P&D de Medicamentos. Teresina, PI, 2013. **Apresentação Oral.**

Simony Davet Müller, Caroline Flach Ortmann, Fernanda Amélia Martins, Drielly Florentino, Lucinéia Gainski Danielski, Andriele Vieira, Fabricia Petronilho And Flavio Henrique Reginatto. ANTIOXIDANT AND ANTI INFLAMMATORY ACTIVITIES OF AQUEOUS EXTRACT FROM THE LEAVES OF *Cecropia pachystachya* TRÉCUL (EMBAÚBA). In: 4th Brazilian Conference on Natural Products and the XXX Meeting on Micromolecular, Evolution Systematic and Ecology (RESEM), Natal, RN, 2013.

Simony Davet Müller, Drielly Florentino, Caroline Flach Ortmann, Fernanda Amélia Martins, Lucineia Gainski Danielski, Monique Michels, Fabricia Petronilho, Flavio Henrique Reginatto. ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DO EXTRATO AQUOSO DE *Cecropia glaziovii* Sneth. In: II Simpósio Sul de Pesquisa Clínica, I Simpósio Internacional de Pesquisa Translacional, Tubarão SC, 2015. **Apresentação Oral.**