



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Jadiel de Abreu Pimenta Lins

**Avaliação do potencial anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico da casca da
*Luehea divaricata***

São Luis - MA
2019

Jadiel de Abreu Pimenta Lins

Avaliação do potencial anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico da casca da *Luehea divaricata*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia – Ponto Focal do Maranhão, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Romão Borges
Co-orientador: Prof. Dr. Lídio Gonçalves Lima Neto
Co-orientadora: Prof^a.Dr^a Marilene Oliveira da Rocha Borges

São Luis - MA
2019



Universidade Federal do Maranhão
 Av. dos Portugueses, 1966, Cidade Universitária – 65080-805 São Luís-MA
 Telefone (98) 3272- 9531 E-mail: renorbio@ufma.br
 Homepage: <http://www.renorbio.org.br>

FOLHA APROVAÇÃO DEFESA DE TESE

ALUNO: Jadiel de Abreu Pimenta Lins

TÍTULO DO PROJETO: “Avaliação do potencial anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico da casca da *Luehea divaricata*”.

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Antonio Carlos Romão Borges

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. Antonio Carlos Romão Borges – UFMA (Presidente)	_____	_____
Prof. Dr. Afonso Gomes Abreu Júnior – CEUMA (Titular)	_____	_____
Prof ^ª . Dr ^ª . Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos – UFMA (Titular)	_____	_____
Prof ^ª . Dr ^ª . Maria do Socorro de Sousa Cartágenes - UI (Titular)	_____	_____
Prof ^ª . Dr ^ª . Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento - UFMA (Titular)	_____	_____

DATA DA APROVAÇÃO: 15 de abril de 2019.

HORÁRIO: 14:30h.

LOCAL: Prédio da Pós-Graduação do CCBS - UFMA.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela existência de tudo e de todos.

A minha esposa, filha e mãe pelo apoio e estarem sempre presentes

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Maranhão (FAPEMA) pelo financiamento do projeto.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antônio Carlos Romão Borges, co-orientador Prof. Dr. Lídio Gonçalves Lima Neto, co-orientadora Prof^a.Dr^a. Marilene Oliveira da Rocha Borges pelo apoio e direcionamento da pesquisa.

A todos os pesquisadores, colegas e professores da UFMA e UNICEUMA que participaram do projeto.

Muito obrigado!

“Na natureza nada se cria, nada se
perde, tudo se transforma”

(Antoine Laurent de Lavoisier)

RESUMO

A *Luehea divaricata* popularmente conhecida como açoita cavalo é utilizada na medicina popular, entretanto os estudos que avaliam a atividade farmacológica desta espécie vegetal são escassos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico da casca da *Luehea divaricata* (EHLd). O efeito anti-oxidante de EHLd foi avaliado pelo método de DPPH e a citotoxicidade com uso de células Raw 264.7 e foi avaliada pelo método MTT (tetrazólio de metiltiazol), assim como o seu efeito anti-inflamatório que foi avaliado pela dosagem de NO e expressão gênica de IL-1 β e IL-6 pelos métodos de Griess e PCR em tempo real (RT-qPCR), respectivamente. Além disso, o efeito anti-inflamatório de EHLd também foi avaliado em camundongos com dano pulmonar agudo (DPA). Para isso, quarenta e oito camundongos Swiss (05 grupos) receberam pré-tratamento oral com EHLd (50 mg/Kg, 100mg/Kg e 250mg/Kg) ou salina (1mL/Kg), e foram induzidos uma hora após ao DPA pela instilação intranasal de LPS (30.000UE/10 μ g/50 μ L/animal). Após 24h, coletou-se o lavado broncoalveolar (LBA), sangue total (ST) e órgãos para análises. Foram analisadas a contagem total e diferencial de leucócitos tanto do lavado quanto do sangue, a expressão gênica de IL-1 β e IL-6 pela RT-qPCR do pulmão e foi realizada a análise histológica dos pulmões, rins e fígado. Através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o EHLd apresentou como picos majoritário as substâncias, Rhoifolin, Isorhoifolin, Naringin, Kaempferol – 3-O caffeoyl glucoside 7-O Glucoside, e Nuzhenide. O EHLd, na concentração de 250 μ g/mL, apresentou efeito anti-oxidante ao capturar 55% de radicais livres. O EHLd apresentou baixa citotoxicidade em todas as concentrações testadas de 50 μ g/mL a 250 μ g/mL ($p < 0,05$). Também foi observado que o EHLd possui efeito anti-inflamatório, uma vez que, reduziu os níveis de NO e expressão gênica de IL-1 β e IL-6 apresentou atividade anti-inflamatória em todas as concentrações testadas. Em relação ao estudo *in vivo*, o pré-tratamento com EHLd reduziu a migração celular, principalmente de neutrófilos, para os pulmões dos camundongos com DPA, e também reduziu a expressão dos genes IL-1 β e IL-6 dos pulmões, assim como, reduziu o edema e o infiltrado leucocitário nos pulmões provocado pelo LPS. Diante deste contexto, o extrato da *Luehea divaricata* poderá auxiliar no tratamento de inflamações.

Palavras-chave: *Luehea divaricata*, açoita cavalo, atividade Anti-inflamatória.

ABSTRACT

Luehea divaricata popularly known as horse whip is used in folk medicine, however studies evaluating the pharmacological activity of this plant species are scarce. Therefore, the aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory action of the hydroalcoholic bark extract of *Luehea divaricata* (EHLd). The anti-oxidant effect of EHLd was evaluated by the DPPH method and Raw 264.7 cell cytotoxicity was evaluated by the MTT (methylthiazole tetrazolium) method as well as its anti-inflammatory effect which was evaluated by NO and gene expression of IL-1 β and IL-6 by Griess and real-time PCR (RT-qPCR) methods, respectively. In addition, the anti-inflammatory effect of EHLd has also been evaluated in mice with acute lung injury (APD). Forty-eight Swiss mice (05 groups) received oral pretreatment with either EHLd (50 mg / kg, 100mg / kg and 250mg / kg) or saline (1mL / kg) and were induced one hour after APD by intranasal LPS instillation (30,000UE / 10 μ g / 50 μ L / animal). After 24h, bronchoalveolar lavage (BAL), whole blood (TS) and organs were collected for analysis. Total and differential leukocyte count from both lavage and blood, IL-1 β and IL-6 gene expression by lung RT-qPCR were analyzed and histological analysis of the lungs, kidneys and liver was performed. Through high performance liquid chromatography (HPLC), the EHLd showed as major peaks the substances Rhoifolin, Isorhoifolin, Naringin, Kaempferol - 3 - caffeoyl glucoside 7 - 0 Glucoside, and Nuzhenide. EHLd, at a concentration of 250 μ g / mL, showed anti-oxidant effect by capturing 55% of free radicals. EHLd showed low cytotoxicity at all concentrations tested from 50 μ g / mL to 250 μ g / mL ($p < 0.05$). It was also observed that EHLd has anti-inflammatory effect, since it reduced NO levels and IL-1 β and IL-6 gene expression showed anti-inflammatory activity at all tested concentrations. Compared to the in vivo study, pretreatment with EHLd reduced cell migration, mainly from neutrophils, to the lungs of DPA mice, and also reduced the expression of lung IL-1 β and IL-6 genes, as well as, reduced edema and leukocyte infiltrate in the lungs caused by LPS. In this context, *Luehea divaricata* extract may help in the treatment of inflammation.

Keywords: *Luehea divaricata*, horse whip, Anti-inflammatory activity

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C.N.	Controle negativo
C.P.	Controle positivo
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
EHLd	Extrato Hidroalcoólico <i>Luehea divaricata</i>
E50	Extrato Hidroalcoólico <i>Luehea divaricata</i> 50mg/kg
E100	Extrato Hidroalcoólico <i>Luehea divaricata</i> 100mg/kg
E250	Extrato Hidroalcoólico <i>Luehea divaricata</i> 250mg/kg
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
IL-6	Interleucina 6
LPS	Lipopolissacarídeo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino
SUS	Sistema Único de Saúde
v.o.	Via Oral
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
UNICEUMA	Universidade CEUMA

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Primers utilizados na expressão gênica.....	39
Tabela 02: CLAE da EHLd - compostos identificados.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Árvore da espécie <i>Luehea divaricata</i>	24
Figura 02: Modelo Experimental.....	35
Figura 03: CLAE da EHLd.....	41
Figura 04: Avaliação do efeito antioxidante da EHLd em células Raw 264.7.....	42
Figura 05: Avaliação da viabilidade celular da EHLd em células Raw 264.7.....	43
Figura 06: Produção de NO em macrófagos Raw 264.7.....	43
Figura 07: EHLd (A e B) na Expressão Gênica de IL 1 β e IL 6.....	44
Figura 08: Análise Histológica Fígado	45
Figura 09: Análise Histológica Rim	46
Figura 10: Análise Histológica Pulmão.....	48
Figura 11: Lavado Broncoalveolar	49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
3.1 Plantas medicinais.....	17
3.2 Plantas medicinais anti-inflamatórias.....	21
3.3 <i>Luehea divaricata</i>.....	23
3.3.1 Aspecto Botânico.....	23
3.3.2 Planta medicinal - <i>Luehea divaricata</i>	26
3.4 Atividade Anti-inflamatória	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Local de coleta.....	29
4.2 Extrato hidroalcoólico da casca.....	30
4.3 Cromatografia e espectrômetro de massa.....	31
4.4 Cultura de macrófagos.....	32
4.5 Teste Antioxidante.....	32
4.6 Citotoxicidade.....	33
4.7 Atividade Anti-inflamatória Óxido Nítrico.....	34
4.8 Atividade Anti-inflamatória <i>in vivo</i>.....	34
4.8.1 Animais	34
4.8.2 Modelo Experimental Dano Pulmonar Agudo.....	35
4.8.3 Lavado Broncoalveolar.....	36
4.8.4 Contagem Total e Difencial de Leucócitos do Sangue.....	36
4.8.5 Contagem Total e Difencial de Leucócitos lavado Broncoalvelolar.....	37
4.8.6 Análise Histológica	37

4.9 Expressão Gênica	38
4.9.1 Extração e análise de RNA total	38
4.9.2 Análise da Expressão de RNAm – PCR em tempo real.....	39
4.10 Análise estatística.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Rendimento do EHLd	40
5.2 Análise Cromatográfica do EHLd.....	40
5.3 Ensaio <i>in vitro</i>	41
5.3.1 Atividade Antioxidante pelo método do DPPH.....	41
5.3.2 Citotoxicidade	42
5.3.3 Óxido Nítrico – NO.....	43
5.3.4 Expressão Gênica	44
5.4 Ensaio <i>in vivo</i>.....	45
5.4.1 Análise Histológica do Fígado	45
5.4.2 Análise Histológica do Rim	46
5.4.3 Análise Histológica do Pulmão	47
5.4.4 Lavado broncoalveolar.....	49
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXOS	64

1 INTRODUÇÃO

A fitoterapia já é conhecida a muitos séculos e com relatos de sua prática desde o Império Chinês entre 2.838-2.698 a. C., com uso e diversas formas de tratamento. Outro registro importante está em livros portugueses de farmacologia do século XVIII, que confirmam que os fitoterápicos já eram utilizados em Portugal e suas colônias, além do uso de minerais e produtos de origens animais para tratamento, prevenção a saúde (FIRMO et al, 2012).

No Brasil, desde do tempo de seu descobrimento, existem relatos de indígenas usando plantas medicinais para tratamento de diversas doenças, e esse uso e formulações empíricas vem sendo repassado de geração a geração (BRUNING et al., 2012).

Várias plantas são utilizadas pelo homem, cerca de 50.000 espécies diferentes, contudo esse número cai exponencialmente em relação ao estudo fitoquímico e seu potencial de ação (GULER; KUMUSTEKIN; UGURLU, 2015).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) diante do uso das plantas medicinais divulgou sua posição no final da década de 70, criando o Programa Medicina Tradicional. No Brasil essa abordagem iniciou na década 80 e se consolidou com a criação do Sistema Único de Saúde (SUS), que possibilitou a assistência envolvendo o uso das plantas medicinais (BRASIL, 2006)

Grande parte dessa biodiversidade de espécies se localiza no Brasil, e são utilizadas a séculos na medicina popular para o tratamento de doenças e melhoria da saúde, e grande parte sem a comprovação científica da ação farmacológica. (TRIBESS et al., 2015).

Uma parte da população carente não tem acesso aos fármacos industrializados, e continuam usando chás, lambedores e garrafadas. A Política Nacional voltada as plantas medicinais e uso dos fitoterápicos, foi criada com o intuito de padronizar os fitoterápicos, com a participação de pesquisadores, usuários e profissionais de saúde (BRASIL, 2006).

Para consolidação da Fitoterapia, algumas resoluções foram modificadas visando celeridade para seu desenvolvimento, padronização, produção e comercialização (FIGUEREDO et al., 2011).

Segundo Maciel et al. (2002), o uso de plantas medicinais se constitui no único recurso terapêutico de grupos étnicos e comunidades, sem registro escrito e transmitidas oralmente. As pesquisas sobre as plantas medicinais são necessárias, e exige uma equipe multidisciplinar.

De acordo com ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), os medicamentos fitoterápicos são aqueles que são obtidos a partir de derivados vegetais, com mecanismos de ação, possíveis riscos, e como eles agem no corpo humano, e seus os efeitos devem ser conhecidos. Os fitoterápicos obrigatoriamente devem comprovar através de estudos de toxicologia e farmacológicos a sua ação e efeito. Os artigos publicados, conhecimento tradicional sobre o uso das plantas medicinais serve de base para registro junto a ANVISA (BRASIL, 2016).

As espécies mais procuradas e indicadas no tratamento de infecções, bronquites, má-digestão, inflamações entre outras enfermidades são aquelas que a população acredita possuir ação de cura. Em feiras e mercados públicos ocorre a inter-relação dos conhecimentos tradicionais, medicina popular, e os

consumidores podendo-se evidenciar a grande diversidade de saberes sobre plantas medicinais (FERREIRA JUNIOR et al., 2014).

A incidência de doenças em que ocorrem inflamações está diretamente relacionada a uma patologia, portanto a continua busca em encontrar novos compostos anti-inflamatórios com baixos efeitos adversos, e que sejam de origem natural (GUO et al., 2017).

A Inflamação é um mecanismo imunológico de defesa do organismo a diversos patógenos como: bactérias, vírus e outros. Durante esse processo, inicia-se a liberação de mediadores inflamatórios, as citocinas, que realizam danos no tecido e sinalizam a inflamação. (CHEN et al., 2016). O processo inflamatório é complexo e tem a participação de vários mediadores inflamatórios e citocinas que são liberadas por células ativadas, como: macrófagos (TNF-alfa, IL-6 e NO), linfócitos T (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 e GM-CSF), eosinófilos (proteína basal principal-MBP, proteína catiônica eosinofílica-ECP, peroxidase eosinofílica-EPO, prostaglandinas, leucotrienos e citocinas), neutrófilos (elastase) e, pelas células epiteliais (endotelina-1, leucotrienos, prostaglandinas e NO). Embora o endotélio vascular ativado realize recrutamento de células inflamatórias, concomitantemente existe um aumento da expressão de moléculas de adesão, como ICAM-1 e VCAM-1 (GINA, 2018). A predisposição genética e fatores ambientais pode ter um papel importante no prognóstico de uma doença inflamatória, além de acidentes químicos, físicos e biológicos.

Diante do exposto, a pesquisa propõe viabilizar o liofilizado do EHLd possibilitando um tratamento alternativo e viável economicamente, além de ser eficiente nos processos inflamatórios e auxiliando na prevenção.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico da casca da *Luehea divaricata*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar os metabólitos secundários presentes no EHLd;

Analisar o efeito antioxidante do EHLd;

Avaliar a citotoxicidade do EHLd;

Analisar o efeito anti-inflamatório do EHLd na produção de óxido nítrico e na expressão gênica de IL-1 β e IL6 em macrófagos estimulados por LPS;

Avaliar o efeito anti-inflamatório do pré-tratamento do EHLd em camundongos com Dano Pulmonar Agudo;

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Plantas Medicinais

As plantas medicinais acompanham o desenvolvimento da humanidade, e esse conhecimento do uso e das práticas de preparo são passados de geração a geração (FREIRES, et al., 2010).

Nas últimas décadas houve aumento expressivo no uso de diversas plantas medicinais, e uma das explicações é o fato dos fármacos convencionais ocasionarem alguns efeitos colaterais, o que para alguns pacientes com restrição se torna inviável o uso (KOK et al., 2015).

Além disso, as discussões associadas ao resgate da diversidade biocultural local sobre o uso de plantas medicinais são essenciais para preservar o conhecimento tradicional (SIQUEIRA e LEMOS, 2017)

O homem vem observando como alguns animais utilizam as plantas como medicamentos, e com o passar do tempo, através das próprias experiências empíricas foi possível organizar uma base de dados, gerando um acervo imenso para a fitoterapia moderna (BRASIL, 2006; BRANDÃO, 2011).

Plantas medicinais são vegetais naturais ou cultivados que são usados para fins terapêuticos, processados a partir de vários modos de preparos e várias maneiras de administração como: lambedores, garrafadas, chás, tinturas e outros (JARDIM, 2016).

Plantas medicinais são aquelas utilizadas tanto pelo homem para fins medicinais e/ou que tenha alguma ação terapêutica.

Existem várias formas de utilizar as plantas medicinais, e os chás são a forma preferida pela população, pois contribuem na preservação dos compostos

ativos, na hidratação, no equilíbrio da temperatura do corpo (MARODIN E BAPTISTA, 2001).

O homem ao longo do tempo foi conhecendo e usando as plantas medicinais de acordo com o possível potencial de cura. Contudo, somente no final do século XX, a comunidade científica intensificou um estudo mais aprofundado sobre as propriedades das plantas medicinais (SARAIVA, 2007).

O uso de fitoterápico caracteriza-se pelo uso de plantas medicinais e deve possuir formulações, modos de preparo e administração específicos, contudo sem utilização de princípios ativos isolados (SCHENKEL, 2001).

Várias pesquisas foram desenvolvidas para viabilização de formulações seguras do uso das plantas medicinais e fitoterápicas, visando disponibiliza-las a população brasileira.

A indústria farmacêutica cresceu muito após a 2ª Guerra Mundial devido ao grande marketing, e os fitoterápicos foram colocados de lado, mas nas últimas décadas houve crescimento dos fitoterápicos ressurgindo como alternativa para diversas patologias (CARVALHO, BINO, MACIEL, PERFEITO, 2008).

A produção de fitofármacos e seus componentes ativos são extraídos de plantas, e esses compostos podem se transformar em medicamentos ou não dependendo da pesquisa, mas o produto pode se tornar um protótipo com propriedades farmacêuticas (YUNES, PEDROSA, CECHINEL FILHO, 2001). No Brasil, estimasse que os fitoterápicos movimentam US\$550 milhões por ano, e com taxas de crescimento girando em torno de 15% ao ano (BRASIL, 2015).

O aumento no uso das plantas medicinais no Brasil tem diversos fatores como: maior uso de produtos naturais, preços acessíveis, e a resolução dos problemas de saúde.

Existem tratamentos ainda não desenvolvidos de plantas no Brasil e conseqüentemente o não uso terapêutico no SUS, constituindo um atraso na qualidade dos atendimentos (TOMAZZONI, NEGRELLE, CENTA, 2006).

As plantas medicinais já são utilizadas no Brasil a bastante tempo, mas a inovação tecnológica é uma realidade e ferramenta importante, e detectar oportunidades para criar um produto baseado no conhecimento empírico, é muito mais do que retorno financeiro, se trata de mesclar uma série de combinações e práticas dos antepassados, gerando aprendizado e consolidando um processo (TIDD; BESSANT, 2015)

O Governo Federal buscou regularizar o crescente uso das plantas medicinais e fitoterápicos, e aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) através do Decreto Presidencial 5.813 de 22/6/2006 (BRASIL, 2006). Esse decreto regulamentou as diretrizes que diz respeito ao uso dos produtos naturais, como as plantas medicinais e fitoterápicos, visando a melhorias na qualidade de vida da população. Esses medicamentos naturais foram incorporados ao Sistema Único de Saúde – SUS (Portaria nº 971 do Ministério da Saúde, de 03/5/2006) (BRASIL, 2006).

Com isso a Política Nacional de plantas medicinais e fitoterápicos, possibilitou a agricultura familiar uma nova geração de emprego e renda, combatendo o êxodo rural e promovendo a redução das desigualdades regionais e locais (ZUANAZZI, MAYORGA, 2010).

De Acordo com a Constituição Federal de 1988, no artigo 6º, descreve que “A saúde é direito de todos e dever do Estado, garantido mediante políticas sociais e econômicas que visem à redução do risco de doença e ao acesso às ações e serviços para a promoção, proteção e recuperação”.

O Sistema Único de Saúde (SUS), segundo a lei nº 8.080 de 1990, no artigo 04º, se refere ao conjunto de procedimentos e serviços de saúde, sendo os mesmo sem ônus para o cidadão, e prestados por órgãos e instituições públicas federais, estaduais e municipais, sendo de Administração direta e indireta, ou de Fundações mantidas pelo Poder Público (CNS, 2015). Então, conclui-se que todos têm direito a saúde, cumprida através do SUS (OAB, 2008).

A falta de medicamentos é uma realidade no Sistema de Saúde no Brasil, devido a burocracia e má logística de distribuição, e os fitoterápicos chegaram como uma alternativa integrativa de medicação muito útil e importante (SANTOS et al., 2011; BRANDÃO, 2011).

O uso de plantas medicinais e de fitoterápicos no Brasil já está inserido nas práticas no serviço de saúde, e complementam as terapias medicamentosas alopáticas para a população menos favorecidas (BRUNING, MOSEGUI e VIANA, 2012).

Visando dar um maior suporte a questão das plantas medicinais que tem potencial de gerar produtos de interesse fitoterápico e posterior uso da população, o Governo Federal lançou o RENISUS, que tem o objetivo de organizar, regulamentar e subsidiar a cadeia produtiva relacionadas à produção, manejo, comercialização e dispensação de plantas medicinais e fitoterápicos. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse no SUS (RENISUS), possibilitando segurança e melhoria para o tratamento de determinadas doenças. O Ministério da Saúde custeia pesquisas de interesse para o RENISUS, evidenciando a importância das plantas medicinais para desenvolvimento biotecnológico do Brasil, proporcionando medicamentos naturais e de baixo custo, ofertando qualidade de vida a população.

3.2 Plantas medicinais anti-inflamatórias

As plantas em geral são produtoras de metabólitos químicos primários e secundários, e grande parte das espécies produzem metabólitos primários que são essenciais para a sobrevivência dos vegetais. Em relação aos metabólitos secundários, esses possuem diferentes quantidades e tipos, com variações de espécie para espécie pois a produção desses metabólitos é influenciada pelo ambiente onde vivem como pluviosidade, pH dos solos, irradiação solar e outros, mas esses metabólitos secundários favorecem e proporcionam sobrevivência e segurança ao vegetal (ASHU AGBOR; NAIDOO, 2015).

O uso de plantas medicinais como fitoterápicos, segundo Silva et al. (2008), vem sendo utilizada de geração a geração pelas famílias residentes em comunidades rurais, e essa prática é muitas das vezes a única opção que os mesmos têm, devido à falta de recursos financeiros, distâncias geográficas e dificuldades topográficas de se locomoverem até um posto de atendimento médico. As comunidades rurais do Brasil ainda sofrem com situações básicas como comunicação (telefone fixo ou celular), transporte e até falta de alimentos, e no Maranhão a situação piora pois possui um dos menores índices de IDH com 0,639, ocupando a 26ª posição no ranking nacional (IBGE, 2010).

Algumas plantas se destacam em relação a confiança dos resultados pela população, é o caso do mastruço ou mastruz, que é uma planta medicinal com ação antimicrobiana, fungicida, vermífuga, anti-inflamatória e cicatrizante. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) descreve que o mastruz é a espécie mais usada do planeta em relação a medicina popular (RIBEIRO et al., 2004).

Outra planta anti-inflamatória é a romã, *Punica granatum L.* que pertencente à família Punicaceae e é originária da região do mediterrâneo e oriente médio, muito utilizada no controle de inflamações diversas. As partes da planta mais utilizadas são os frutos, folhas, flores e casca da árvore, no tratamento de infecções em geral, além do trato respiratórios da garganta ao pulmão. Embora a população a usem também como antisséptico e antiviral, além de inflamações na boca (MENEZES, 2004).

A romã é muito usada devido sua ação anti-inflamatória e antimicrobiana, e uma das classes de metabólitos secundários encontrados na romã são os flavonoides, que são uma subclasse de polifenóis, que desempenham um importante papel na biologia desses vegetais e na saúde humana. (MANSURI et al., 2014).

Bastante utilizada pelas mulheres, a Aroeira é uma planta arbórea da família Anacardiaceae, e tem sua utilização na medicina popular para o tratamento de problemas ginecológicos e da região do útero, com atividade cicatrizante e anti-inflamatória. Sua composição fenólica das folhas é diferente da casca, contudo as duas são ricas em taninos e em óleo essencial, habilitando as mesmas ao combate e ação antimicrobiana. (JORGE et al., 1996; SALES, 2013).

De acordo com Associação Brasileira de Empresas do Setor Fitoterápico, confirma um dado interessante de que um dos produtos do Laboratório Aché, a erva-baleeira (*Cordia verbenacea*), originária da mata atlântica, é um produto fitoterápico anti-inflamatório comercializado como pomada no mercado, já conseguiu ultrapassar as vendas do Cataflam.

Diante do exposto a *Luehea divaricata* se constitui em uma alternativa viável, pois é uma planta bastante utilizada na medicina popular, e devido a sua ação anti-inflamatória para o tratamento e prevenção de processos inflamatórios, pois é de simples manipulação e acessibilidade.

3.3 *Luehea divaricata*

3.3.1 Aspectos Botânicos

A origem do nome *Luehea divaricata* é em homenagem ao botânico austriaco Karl Von der Lühe (*Lühea*), e *divaricata* que se refere aos aspectos dos pedúnculos da inflorescência (CUNHA,1985). A escrita original *Lühea* passou a ser *Luehea*, de acordo o Artigo 73.6 do Código Internacional de Nomenclatura Botânica. Outra grafia utilizada no Paraguai, Uruguai e sul do país, na língua tupi-guarani, é *Ivatingi*, que significa “fruto-que-aborrece”. Mas o nome vulgar açoita-cavalo advém da rigidez e flexibilidade dos galhos que era usado como chicote no manejo de diversos animais.

Pertencente à ordem Malvaceae, e família Tiliaceae, ao qual existem espécies no Sul da África e América do Sul e em todo Brasil. A açoita cavalo é uma árvore caducifólia, e uma planta adulta tem altura de 25 m com diâmetro de 50 cm (BACKES; IRGANG, 2002). Suas sementes são aladas e modo de dispersão anemocórica (pelo vento), tendo suas flores hermafroditas nas colorações rósea, amarelo e brancas, e são pentâmeras, sendo o fruto capsulado com valvas lenhosas oblongas de coloração castanha e estouram para liberar as sementes aladas (CARVALHO,2003).



Fonte: João Augusto Bagatini - 03/2014 - Jadiel de Abreu Pimenta Lins - 04/2019

Figura 01 - Árvore da espécie *Luehea divaricata*.

A *Luehea divaricata* é considerada espécie secundária inicial, isso quer dizer que em uma área degradada, com ação antrópica ou não, ela é uma das primeiras espécies florestais a surgir dentro de um processo natural de regeneração da vegetação (VACCARO et al., 1999).

De acordo com Lorenzi (1992), *Luehea divaricata* faz parte de um grupo de menos de 60 espécies aptas ao rápido crescimento, assim como o cedro, ipê roxo e branco, peroba, murta e outras, que são muito indicadas ao reflorestamento, e usadas nas áreas degradadas.

O Tronco é irregular, tortuoso, e com várias reentrâncias onde é comum encontrar fungos. O fuste (parte do tronco) tem características de serem curtos, porém quando a planta se desenvolve no interior da floresta, tornam-se retos, medindo até 10 m de comprimento, isso ocorre devido a planta buscar o máximo de luz do sol, na competição com outras espécies na floresta (ORTEGA, 1995).

Açoita cavalo possui a copa larga e densa, possui folhas alternas, irregularmente e serradas nas bordas, sendo brancacenta na face inferior, medindo de 5 a 15 cm de comprimento. Sua casca chega a medir até 25 mm de espessura, sendo sua casca interna avermelhada e fibrosa. É comum a presença de diversos fungos, pois sua casca possui reentrâncias que permite a retenção da umidade.

A *Luehea divaricata* é uma planta muito adaptada, estabelecendo-se em diferentes terrenos, seja seco ou úmido, raso ou pedregoso, em solos com textura variando de franca a argilosa, em solos com drenagem ou encharcados (LORENZI, 1992).

3.3.2 Planta medicinal - *Luehea divaricata*

As moléculas bioativas presentes em plantas medicinais, teve um aumento exponencial nos últimos anos, devido a uma série de fatores relacionados ao aumento de consumo da população pelos medicamentos fitoterápicos (DINIZ et al., 2007).

Novas ferramentas permitem um detalhamento melhor das substâncias presentes nas plantas medicinais, utilizando-se das análises fitoquímicas (SILVA et al., 2010).

A açoita cavalo já é muito conhecida pela população, e seu já é bem difundido e descrito por vários autores. Já as cascas do caule, assim como as folhes e folhas tem diversos usos como antisséptico, cicatrização, e afecções do sistema respiratório destacando-se bronquite e laringite (REINTZ 1950; TANAKA et al, 2003).

De acordo com Alice et al. (1985), a parte mais utilizada como depurativo e controle da inflamação é a raiz.

Já as folhas, segundo Tanaka et al. (2005), são utilizadas como fitoterápicos contra reumatismo e disenteria, além de ação anti-inflamatória e calmante. Pesquisadores do Sul do Brasil realizaram testes a parti de um extrato metanólico das folhas da *Luehea divaricata*, obtendo dois triterpenos, sendo um derivado do ácido torâmico e o outro do ácido maslínico, todavia esses compostos não foram avaliados (TANAKA, VIDOTTI, SILVA, 2003).

Posteriormente esse mesmo grupo de pesquisa, fazendo uso do mesmo extrato, identificaram um flavonóide, a epicatequina, e realizaram testes com concentrações do extrato metanólico das folhas da *Luehea divaricata* nas

concentrações de 250-500 µg / mL, demonstrando a ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. (TANAKA et al., 2005).

Foram realizados testes antifúngicos usando um extrato de diclorometano da *Luehea divaricata* (25 µg / disco filtrante), que conseguiu inibir montagem da parede celular de *Neurospora crassa*, ou em outras palavras, a síntese de polímeros (Zacchino et al., 1998).

Em outro estudo, Coelho de Souza et al. (2004), foi testado extrato metanólico das folhas da *Luehea divaricata*, na concentração de 50 mg / mL, obtendo resultado significativo para ação antimicrobiana.

3.4 Atividade anti-inflamatória

Vários são os conceitos para processo inflamatório, mas em geral se define como um processo imediato de resposta do organismo imunológico contra um dano do tecido, como cortes, batidas, aquecimento, ou até a invasão de patógenos, e nesse caso as células de defesa entram em ação. Acontece sempre com eventos sequenciais, que pode caracterizar-se por alguma características como dor, vasodilatação, vermelhidão, migração celular; maior permeabilidade vascular; ativação de mediadores inflamatórios, assim como outros processos.

A dor é uma das respostas de algo errado no organismo, e ela se divide em quatro tipos: fisiológica, inflamatória, neuropática e disfuncional, que são gerados por mecanismos diferentes em cada caso (GOLAN et al., 2017)

O corpo humano possui sistema de defesa organizado, e dispõe de três linhas básicas de defesas: a primeira são as barreiras físicas e anatômicas

do corpo humano como: a pele (que é inultrapassável para muitos patógenos); mucosas; epitélios; suco gástrico (baixo pH); reflexos como espirros e tosses; pH vaginal; mucosa na câmara do pulmão entre outros. Já a segunda defesa é baseada na identificação, eliminação do agente infeccioso pela imunidade inata, realizada por algumas citocinas e componentes celulares, como monócitos, eosinófilos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas.

Existem vários conceitos para resposta imunológica, e ela pode ser dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade inata caracteriza-se por barreiras físicas, químicas e biológicas com uma resposta rápida e limitada a determinados estímulos. Portanto ela é realizada por meio de componentes humorais, como complementos proteicos; já algumas citocinas; além de componentes celulares, como por exemplo os monócitos, eosinófilos e das células fagocíticas, como neutrófilos, células dendríticas e macrófagos. Sobre a terceira linha de defesa do organismo chamamos de imunidade adquirida ou adaptativa que é específica e envolve a proliferação de linfócitos e a produção de anticorpos (AGIER; EFENBERGER; BRZEZINSKA-BLASZCZYK, 2015)

As principais células são macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células NK. (CRUVINEL et al, 2010). Já a imunidade adquirida é a ativação de células especializadas (linfócitos T e B) por meio de células que apresentam de antígeno (APCs). (CRUVINEL et al, 2010). Em relação as células dendríticas, são denominadas APCs, e consideradas a ponte entre as imunidades inata e adaptativa sendo atraídas e ativadas por elementos da resposta inata e viabilizam a sensibilização de linfócitos T da resposta adaptativa. (CRUVINEL et al, 2010)

Existem vários tipos de citocinas, e as mesma são divididas em dois grupos: citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Para que o sistema imune funcione de maneira ordenada, é preciso haver uma sincronia entre as funções específicas de cada grupo de citocinas. (TRIFUNOVIC et al., 2015).

Um dos representantes de citocinas inflamatória é o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), produzida por macrófagos expostos a patógenos, que são os mais ativados no sistema imune inato (CALDWELL et al., 2014).

A IL-1 β foi a primeira citocina descoberta nas pesquisas que descrevia a nocicepção inflamatória, e é umas das principais citocinas pró-inflamatórias. Outra citocina muito conhecida é a interleucina 10 (IL-10), do grupo anti-inflamatório, em função de defender o hospedeiro de resposta inflamatória grave (UDDIN et al., 2015).

Atualmente várias pesquisas envolvendo plantas e derivados têm resultados promissores para atividade anti-inflamatória, visando principalmente minimizar os efeitos colaterais dos fármacos. Os medicamentos agem no processo inflamatório em várias vias de sinalização celular e molecular, e com resultados na prevenção e tratamento, por isso as pesquisas biotecnológicas estão focadas em dados científicos que consigam gerar fitofármacos com ação comprovada (WANG et al., 2013).

4 . MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de Coleta

A área de coleta do material vegetal localiza-se na Universidade Federal do Maranhão – UFMA, nas coordenadas 02°33'09,71”S e

44°18'17,73"O, e altitude de 25m. A *Luehea divaricata* já possui exsicata no Herbário Ático Seabra na Universidade Federal do Maranhão, registrada sob o nº01117. A coleta da casca da açoita cavalo foi realizada na manhã de 15 de Junho de 2016, com retirada da casca no sentido vertical respeitando a fisiologia e botânica da planta. Após retirada da casca, a mesma foi limpa e selecionada para processo de secagem em temperatura ambiente de 25°C. Após 72 horas, as cascas foram trituradas em moinho elétrico e o pó obtido foi medido e graduado visando a extração dos metabólitos presentes e demais testes.

4.2 Extrato hidroalcoólico da casca

A recomendação do Etanol para a extração de compostos fenólicos durante o preparo de extratos hidroalcoólicos vegetais tem sido explicada devido à sua capacidade de inibir a oxidação de polifenóis (YAO et al., 2004). O etanol é diferente de outros solventes, porque sua estrutura molecular apresenta uma parte polar (possui o grupo OH) e outra apolar (com cadeia carbônica), proporcionando ao solvente uma maior extração da amostra e consequentemente apresentando uma maior variedade de compostos.

O processo de extração de metabólitos secundários EHLd foi realizada por maceração, utilizando-se uma mistura de álcool etílico (solução hidroalcoólica 70%) como solvente (Stowe, 1979). O volume de solvente foi quatro vezes o volume do soluto, sendo adicionado solvente sempre que preciso durante o processo de diluição tendo o cuidado de homogeneizar todo volume. A mistura foi feita em frasco âmbar fechado e mantido em constante agitação por 2 horas diárias. Após 72 horas foi realizada a primeira filtragem do extrato,

com auxílio de um funil de vidro e papel filtro, além da segunda filtragem visando retirar materiais indesejados. O volume filtrado foi medido em proveta graduada e o obtido repostado com mais solvente da mistura inicial.

4.3 – Cromatografia e espectrometria de massa

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) se constitui em um dos métodos mais utilizados para identificar compostos diversos, e essa técnica realiza separações e análises quantitativas dos metabólitos secundários, com alta resolução, sensibilidade e segurança dos resultados (Collins et al., 2006).

Foi realizada investigação dos compostos secundários do extrato através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a um Espectrômetro de massa (LC-MS). Na análise de Espectrometria de massa foi utilizado aparelho Amazon Speed ETD – Bruker, com faixa média de pressão operacional de Nebulizer 27 Psi, Dry gas: 12 L/min, temperatura de 300°C, HV: 4500V. Para a Cromatografia Líquida é utilizado uma Controladora: CBM-20A- Shimadzu, bomba LC-20AD Shimadzu, Detector SPD-20A – Shimadzu, Forno CTO-20A – Shimadzu e Autoinjeter SIL 20AC – Shimadzu, além Solvente A: H₂O 1% ácido acético, Solvente B: MeOH, Coluna: Phenomenex Luna C18 (250x4,6mm-5µm), T forno: 40°C e Fluxo: 0,6 ml/min. Essas Análises foram realizadas no Centro Analítico de Instrumentação da Universidade de São Paulo – Central Analítica localizado no Instituto de Química da USP.

4.4 Cultura dos Macrófagos

Os macrófagos RAW 264.7 foram cultivados em meios RPMI suplementados com soro fetal bovino (SFB) a 10% e mantidos em garrafas de cultura de 25cm² em incubadora com 5% de CO₂ à 37 °C. As células foram tripsinizadas a cada 3 dias com o meio substituído e novamente mantidos nas mesmas condições em incubadora.

Os macrófagos RAW 264.7 ($1,0 \times 10^6$ células/mL) foram estimulados com LPS a 100µg/mL, e incubados com diferentes concentrações de EHLd (50µg/mL, 100µg/ mL 250µg/ mL) em placas de 96 poços (200 µL por poço) por 48 horas em incubadora com 5% de CO₂ à 37 °C. A seguir, o sobrenadante foi coletado para dosagens de NO e as células utilizadas para expressão gênica.

4.5 Teste antioxidante

Um dos vários métodos que são utilizados para a avaliação da atividade antioxidante é o sequestro do radical 2,2-difenil-1- picril-hidrazil (DPPH; Sigma-Aldrich). O ensaio se baseia na quantidade da capacidade antioxidante de uma substância em sequestrar o radical DPPH, e é mensurado através da redução da hidrazina (ALVES et al, 2010). Neste trabalho, usou-se ensaio a partir de uma fração de 250µL de solução de DPPH (1mM), com 40µL das concentrações de 50µg/mL, 100µg/ mL 250µg/ mL do EHLd. As leituras foram feitas no ELISA, após 30 minutos de incubação, e a capacidade de reduzir o radical DPPH foi calculada através da média das absorbâncias, com base na seguinte fórmula $[DPPH] (\%) = (A_c - A_s) / A_c \times 100$, e temos: A_c - controle de absorção; A_s - Absorbância da Amostra. O Ácido Gálico (Sigma-Aldrich) foi

utilizado como o controle, por possuir boa ação antioxidante comprovada. O teste foi realizado em duplicata para cada amostra, e em diferentes concentrações, onde foi feita a média da atividade antioxidante que cada amostra apresentou.

4.6 Teste de citotoxicidade

O método escolhido foi o MTT (tetrazólio de metiltiazol) que avalia a atividade das desidrogenases mitocondriais, capazes de reduzir o MTT a sais de formazan, um composto de coloração azul escuro (MOSMANN, 1983). Foram utilizados macrófagos RAW 264.7, em placas de microdiluição de 96 poços a uma concentração 2×10^5 células em 200uL de meio RPMI + SFB 2% por poço e incubadas por 24h para aderência. As células foram cultivadas a 37 °C. Depois da incubação, o sobrenadante foi pipetado e descartado e acrescido 200uL das concentrações 50µg/ mL, 100µg/ mL, 150µg/ mL e 250µg/ mL do EHLd, em triplicata, diluídas no mesmo meio de cultura e incubadas por 48h. O próximo passo foi descartar o sobrenadante e colocar 100uL do mesmo meio com MTT (0,5%) (Sigma-Aldrich, EUA), para melhor visualização dos cristais de formazan nas células viáveis.. As placas foram incubadas por mais 24h e após esse período observou-se leitura no ELISA com absorbância a 570nm. Os cálculos das porcentagens de crescimento e viabilidade celular, foram obtidos a partir da seguinte fórmula: %Viabilidade = $TA/T1 \times 100$, tendo: TA = média da absorbância da célula tratada – absorbância do branco da amostra; e T1 = absorbância da suspensão celular de controle.

4.7 Atividade anti-inflamatória – dosagem de Óxido Nítrico

A dosagem de NO foi realizada pelo método de Griess (GREEN et al.; 1982). Foi realizado teste para mensurar a produção de óxido nítrico, através da concentração de nitrato presente no sobrenadante do meio de cultura. A absorvância foi mensurada em leitor de microplaca.

Para o reparo da curva de calibração da investigação do teor de nitrito presente nas amostras, foi necessário construir uma curva de calibração (absorvância x concentração de nitrito), com diluições padrões de uma solução estoque de nitrito de sódio (NaNO_2), cuja concentração inicial era de 1 mg/mL.

A curva padrão foi construída com 6 pontos de concentração distintos e diluições específicas, em duplicata, para o cálculo da absorvância média de cada concentração. Esses resultados foram baseados em curva padrão de NaNO_3

4.8 Atividade anti-inflamatória *in vivo*

4.8.1 Animais

No modelo experimental foram utilizados camundongos machos, 8 – 10 semanas de idade, pesando entre 20-30g, provenientes do Biotério do Uniceuma. Seguindo protocolo do biotério, foram acondicionados o máximo de 05 animais por gaiola, em ambiente com temperatura e umidade controladas, estante com ventilação automática e individual por gaiola, ciclo de 12 horas claro/escuro. Os animais estavam com livre acesso a água e alimentação. A verificação do peso dos animais foi constante até o dia do experimento para ajuste das doses administradas.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – Uniceuma, sob o protocolo N°147/17. A equipe envolvida no teste animal, possui certificado no Curso de Bioética em Experimentação Animal, além da experiência em manejo com animais de laboratório.

4.8.2 Modelo experimental - dano pulmonar agudo

Utilizou-se camundongos Swiss, machos todos provenientes do biotério da UNICEUMA, e mantidos em condições higiênicas ideais.

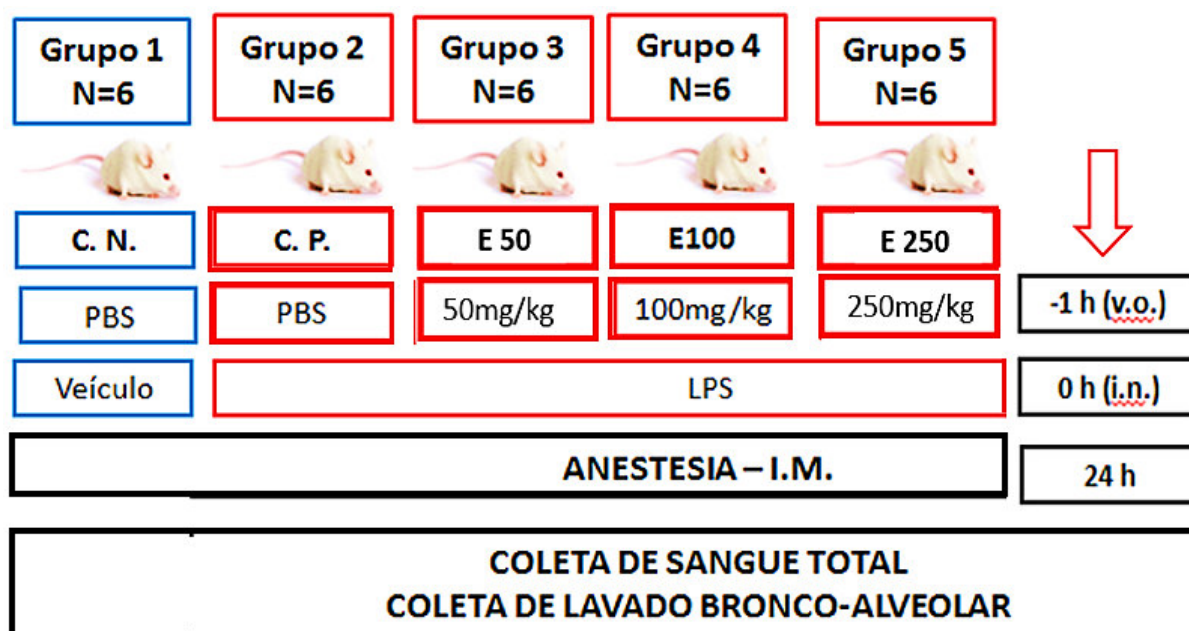


Figura 02 - Modelo Experimental – 05 grupos divididos em: CN, CP, CP + diferentes concentrações EHLd – animais induzidos por LPS.

Foram utilizados 48 animais nos testes, sendo que estes foram divididos em cinco grupos: Veículo+PBS (Controle Negativo - CN / N=6); Veículo+LPS (Controle Positivo - CP / N=6); EHLd 50mg/kg+LPS (E50 / N=6); EHLd 100mg/kg+LPS (E100 / N=6); EHLd 250mg/kg+LPS (E250 / N=6). Foi

administrado, via oral (v.o.), uma solução de PBS como veículo (1ml/kg) nos grupos CN e CP, e nos grupos EHL D 50, EHL D 100, EHL D 250. Após uma hora, a infecção respiratória foi induzida nos animais dos grupos CP, EHL D 50, EHL D 100, EHL D 250, através da instilação de 30.000EU/10µg/50µL/animal (25µL/narina) de lipopolissacarídeo (LPS) obtido de *Pseudomonas aeruginosa* (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA); e no grupo CN foi administrado 50µL de PBS na narina. Cumprindo normas de protocolo do CEUA, os sinais clínicos dos camundongos foram monitorados até o final do efeito sedativo.

4.8.3 Lavado broncoalveolar

Nessa etapa, o procedimento teve início após vinte e quatro horas da instilação intranasal, os animais foram anestesiados com uma mistura de Ketamina (80mg/kg) e Xilazina (10mg/kg) visando coleta do sangue total por punção cardíaca. A coleta do lavado broncoalveolar segue a sequência: expõe toda a cavidade pulmonar e a traqueia do animal, para realizar uma punção traqueal com auxílio de um cateter, injetando um volume de 1,5ml de PBS estéril, sendo três etapas de 500µL cada, observando se o pulmão se enche, realizando a coleta imediata. O sangue e o lavado foram coletados para determinação do número de leucócitos total e diferencial.

4.8.4 Contagem total e diferencial de leucócitos do sangue

A contagem total dos leucócitos no sangue total foi feita no mesmo dia da coleta, com utilização de microtubos pipetados a 400µL de solução de

Turk e adicionado 20 μ L da amostra (diluição 1:20); após homogeneização, a contagem realizada em câmara de Neubauer. A contagem diferencial dos leucócitos presentes no sangue foi feita por esfregaço sanguíneo, com alíquota de 10 μ L da amostra em lâmina e leitura em microscopia ótica em objetiva de 100X com imersão a óleo através da contagem de 100 células.

4.8.5 Contagem total e diferencial de leucócitos do lavado broncoalveolar

A contagem total dos leucócitos presentes no lavado broncoalveolar foi realizada no mesmo dia da coleta, através de uma diluição de 1:2 de 10 μ L da amostra com 10 μ L de solução de Turk; a contagem foi feita em Câmara de Fuchs Rosenthal. A contagem da diferença dos leucócitos presentes no lavado broncoalveolar foi realizada por gota espessa de uma alíquota de 100 μ L da amostra em citocentrífuga (TEKLAB) e leitura da lâmina em microscopia ótica em objetiva de 100X com imersão a óleo através da contagem de 100 células.

4.8.6. Análise histológica

Os órgãos coletados (pulmões, rins e fígado), foram fixados com formaldeídos a 10% por 24 horas, e foram embebidos em parafina. Após a desparafinização e desidratação, seções teciduais de 4 μ m foram fixadas e coradas com hematoxilina e eosina (HE) e então analisada por microscopia na magnificação de 100x e 400x. Dois pesquisadores independentes fizeram análise cega, e se existisse discordância dos dados, um terceiro pesquisador

realizaria outra análise. Todas as imagens histológicas foram realizadas no microscópio Binocular Axio Imager Z2.

4.9. Expressão Gênica *in vitro*

4.9.1 Extração e análise de RNA total

O RNA total obtido do lavado do pulmão do animal com utilização de um conjunto de reagentes *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN, GmbH, Alemanha) de acordo com o manual de instrução do fabricante. Após extração, a concentração de RNA total foi obtida por espectrofotometria no ultravioleta (UV) utilizando-se o espectrofotometro GeneQuant 100 (GE Health care, Wisconsin, EUA) além do grau de pureza do RNA determinado pela relação A_{260}/A_{280} .

Foi utilizado reagentes SuperScript™ II reverse transcriptase (Invitrogen, Gathersburg, EUA), de acordo com protocolo do manual do fabricante, com a síntese de cDNA a partir de 200µg de RNA total. Na síntese de cDNA foi utilizado iniciadores aleatórios 200 nM (*random primers*) (Invitrogen, MD, EUA), dNTP 200nM(Amershan-Pharmacia Biotech do Brasil, Brasil), DTT 20mM, transcriptase reversa 200 U (Superscript™II RT RNase H) e com tampão (Tris-HCL 250mM pH 8,3, KCl 375mM, MgCl₂15mM) (Invitrogen, MD, EUA). Após essa etapa a mistura foi incubada a 25°C por 10 min, a 50°C por 50 min e aumentada para 70°C a 15 min. O cDNA resultante foi conservado a -20°C até a realização da PCR em Real Time, visando a quantificação relativa dos genes inflamatórios.

4.9.2 Análise da expressão de RNAm pela PCR em tempo real

O resultado da análise foi pela quantificação relativa da expressão dos genes IL-1 β , IL-6. Os oligonucleotídeos iniciadores para os genes de interesse IL-1 β e IL-6, e para o gene de controle endógeno GAPDH (Tabela 01), e selecionados utilizando o programa *Primer Premier 5.0* (Premier Biosoft International, Califórnia, EUA). As regiões analisadas possuem seqüência disponíveis no Banco de genes (*GenBank*) do *National Institute of Health* (NIH) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Para a análise da expressão gênica através da técnica de PCR em tempo real, foi utilizado o método de Delta Ct (Δ Ct) (Livak & Schmittgen, 2001). Foi feito um cálculo usando o Δ Ct de cada uma das amostras, e para o cálculo do Δ Ct, foi utilizado a fórmula: [Ct gene alvo - Ct gene endógeno]. Uma vez determinado os valores de Δ Ct, foi aplicado a fórmula $2^{-\Delta$ Ct}, que resultou no valor da expressão gênica relativa.

Gene	<i>Primer Forward</i>	<i>Primer Reverse</i>
IL-1 β	GGCAGCTACCTGTGTCTTCC	ATATGGGTCCGACAGCACGAG
IL-6	CAGGCTCCGAGATGAACAAC	GGTGGAGAGCTTTCAGCTCATAT
GAPDH	TGAAGGTCGGTGTGAACGG	CGTGAGTGGAGTCATACTGGAA

Tabela 01: Primers utilizados na expressão gênica..

4. 10. Análise Estatística

Os dados obtidos nesse estudo foram submetidos ao teste de simetria das variâncias quantitativas de Kolmogorov-Smirnov, e para as variáveis com distribuição assimétricas utilizou-se teste paramétricos de one-way ANOVA. O nível de significância para todas as análises foi $p < 0,05$, realizados com auxílio

do programa estatístico Graphpad Prism, versão 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), 2013.

5. RESULTADOS

5.1 Rendimento do EHLd

O rendimento do EHLd foi de 18%, e calculado de acordo com Rodrigues et al. (2011), sendo o peso inicial da coleta de 400g, e o teste de massa seca liofilizada foi repetida três vezes com resultado mediano de 72,02g, utilizando a seguinte fórmula: $Re = (P_{ext} / P_{cascas}) \times 100$. Onde: Re = Rendimento total do extrato (%); P_{ext} = Peso do extrato seco (g); P_{cascas} = Peso das cascas (g).

5.2 Análise cromatografica do EHLd

A avaliação da cromatografia revelou a presença de metabólitos secundários no EHLd, e observou-se a presença de flavonoides e iridóide. Esses metabólitos secundários foram identificados através da cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa permitindo a quantificação dos compostos. Os picos majoritários foram identificados, confirmando a presença de compostos de acordo com Figura 02.

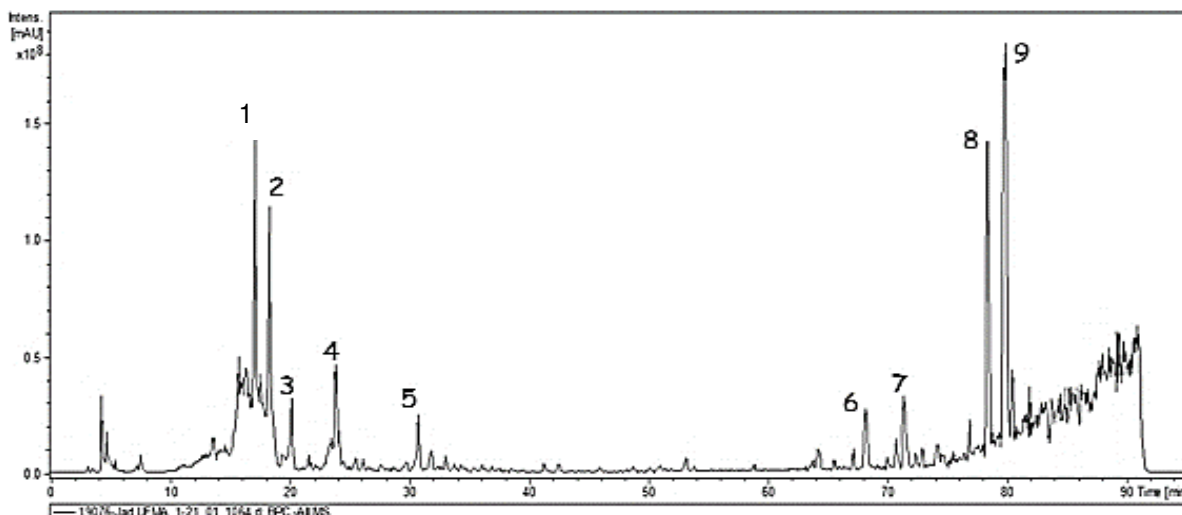


Figura 03. CLAE da EHLd - Identificação de picos marjoritários.

Tabela 02. CLAE da EHLd - compostos identificados.

Pico	TR	M - H	Composto
1	17,2	577	Rhoifolin - flavanoide
2	18,4	865	Isorhoifolin – flavanoide
3	20,3	579	Naringin – flavanoide
4	23,9	577	Não identificado
5	30,8	731	Não identificado
6	68,2	689	Não identificado
7	71,3	619	Não identificado
8	78,3	933	Kaempferol – 3 -O caffeoyl glucoside 7 – O Glucoside flavanoide
9	79,8	685	Nuzhenide – iridóide

5.3 Ensaios *in vitro*

5.3.1 Atividade Antioxidante pelo método do DPPH

A avaliação Antioxidante *in vitro* pelo ensaio de DPPH apresentou resultados de porcentagem de inibição de 22.5% determinado na concentração de 100µg/ mL e em adição na 250µg/ mL apresentou 54% de capacidade de captura de radicais livres. Os resultados obtidos na avaliação antioxidante foram

comparados ao composto controle Ácido Gálico que é um potente antioxidante bem conhecido na literatura.

De acordo com Lima et al. (2007), extratos que apresentam atividade antioxidantes superior a 70% são considerados eficazes, com resultados entre 60% a 70% sua ação é moderada e abaixo de 60% são avaliados como fracos gradualmente. Portanto a atividade antioxidante depende da concentração do extrato, sendo considerada a relação de aumento da capacidade oxidante com o aumento da concentração.

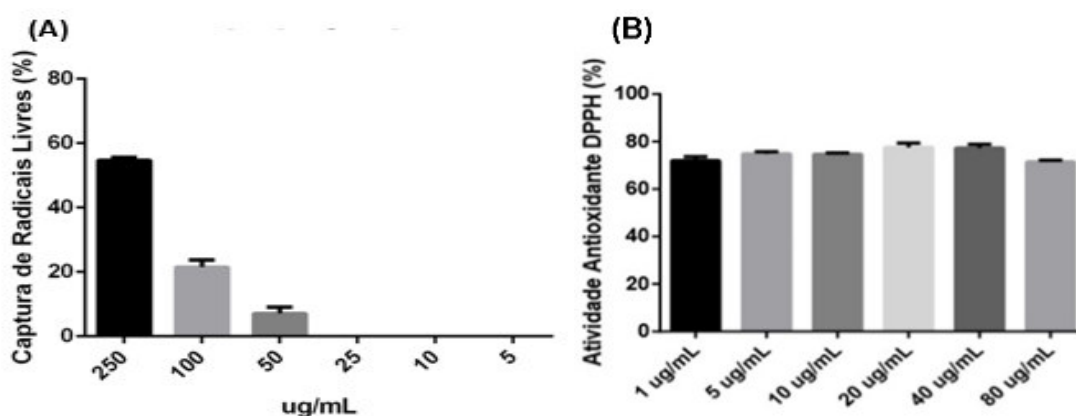


Figura 04 – Avaliação do efeito antioxidante da EHLd (A) através da captura de radicais livres pelo método DPPH. O Ácido Gálico foi utilizado como controle (B).

5.3.2 Citotoxicidade

Os resultados do teste de citotoxicidade pelo método MTT, demonstraram que todas as concentrações testadas apresentaram baixa citotoxicidade, ao observar a maior concentração do EHLd testada de 250 $\mu\text{g/mL}$ apresentou 75% de viabilidade.

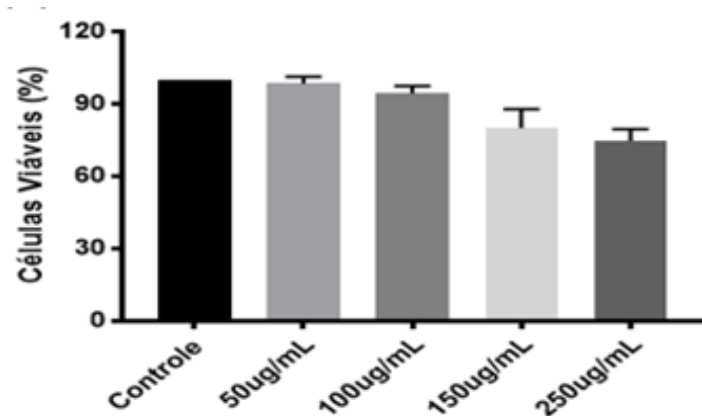


Figura 05 – Avaliação da viabilidade celular da EHLd em células Raw 264.7.

5.3.3 Óxido Nítrico – NO

A quantidade de nitrito presente no meio de cultura foi mensurada como um indicador da produção de NO por meio da Reação de Griess, e o LPS estimulou o aumento significativo de NO, $p < 0,05$ (figura 07). Todas as concentrações testadas do EHLd reduziram a produção de NO.

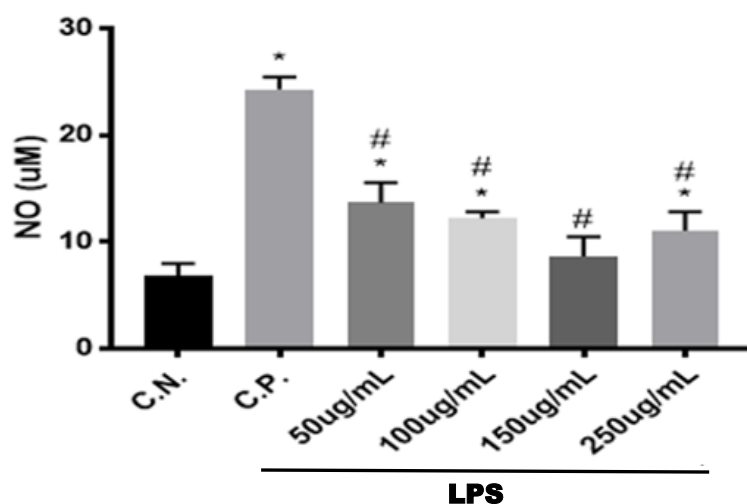


Figura 06 – Efeito do tratamento com o EHLd na produção de NO em macrófagos Raw 264.7. Os grupos foram identificados como: veículo+veículo C.N. - Controle Negativo; veículo+LPS C.P. – Controle Positivo; 50µg/ mL+LPS; 100µg/ mL+LPS; 250µg/ mL+LPS ; CP* $p < 0,05$ quando comparados com o grupo controle negativo. 50µg/ mL, 100µg/ mL e 250µg/ mL # $p < 0,05$ quando comparados com o grupo controle positivo - CP. (ANOVA)

5.3.4 Expressão Gênica

A figura 07 mostra a expressão gênica de IL 1b e IL6 em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS, e tratados com diferentes concentrações do EHLd, onde o LPS estimulou a expressão tanto do IL 1b quanto de IL6, nas concentrações do extrato da açoita cavalo (100, 150 e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), reduzindo os marcadores pró-inflamatórias.

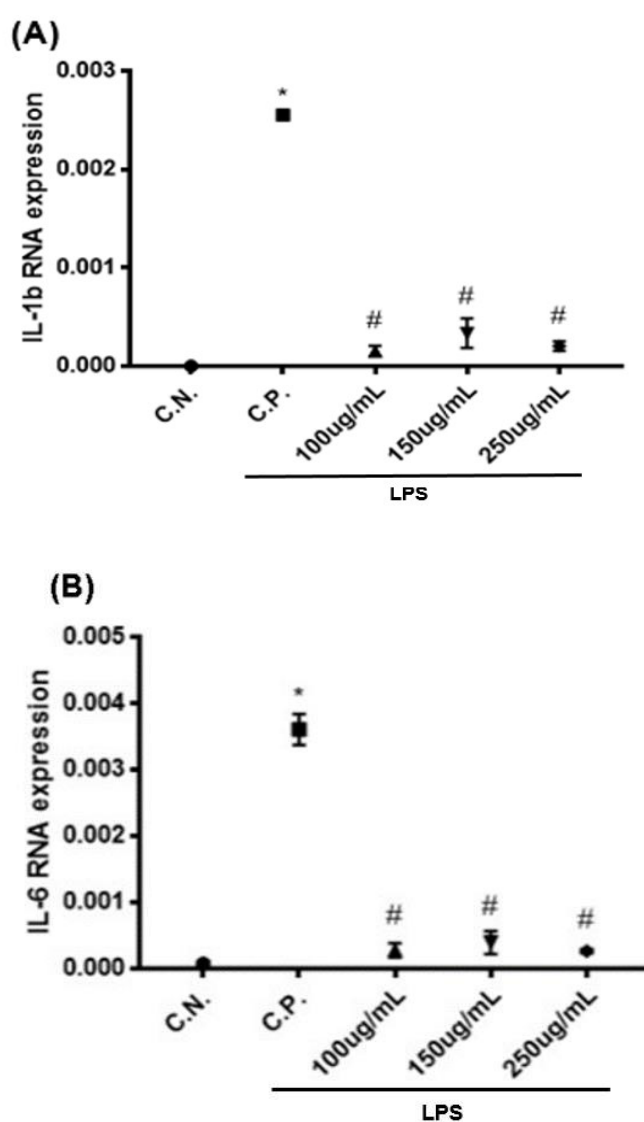


Figura 07 – Efeito do tratamento com o EHLd na Expressão Gênica de IL1 β (A) e IL 6(B) em macrófagos peritoneais RAW 264.7 estimulados com LPS.

5.4 Ensaios *in vivo* –

5.4.1 – Análise Histológica - Fígado

Nas administrações das doses de 50, 100 e 250 mg/kg (v.o.), não houve alteração significativa em relação ao fígado. Porém na dose de 250mg/kg, foi observado discreto infiltrado inflamatório. Nas demais estruturas, como capilares sinusóides e espaço porta, nenhuma alteração grave foi identificada. No geral não houve alterações histopatológicas crônicas nos animais tratados (24h).

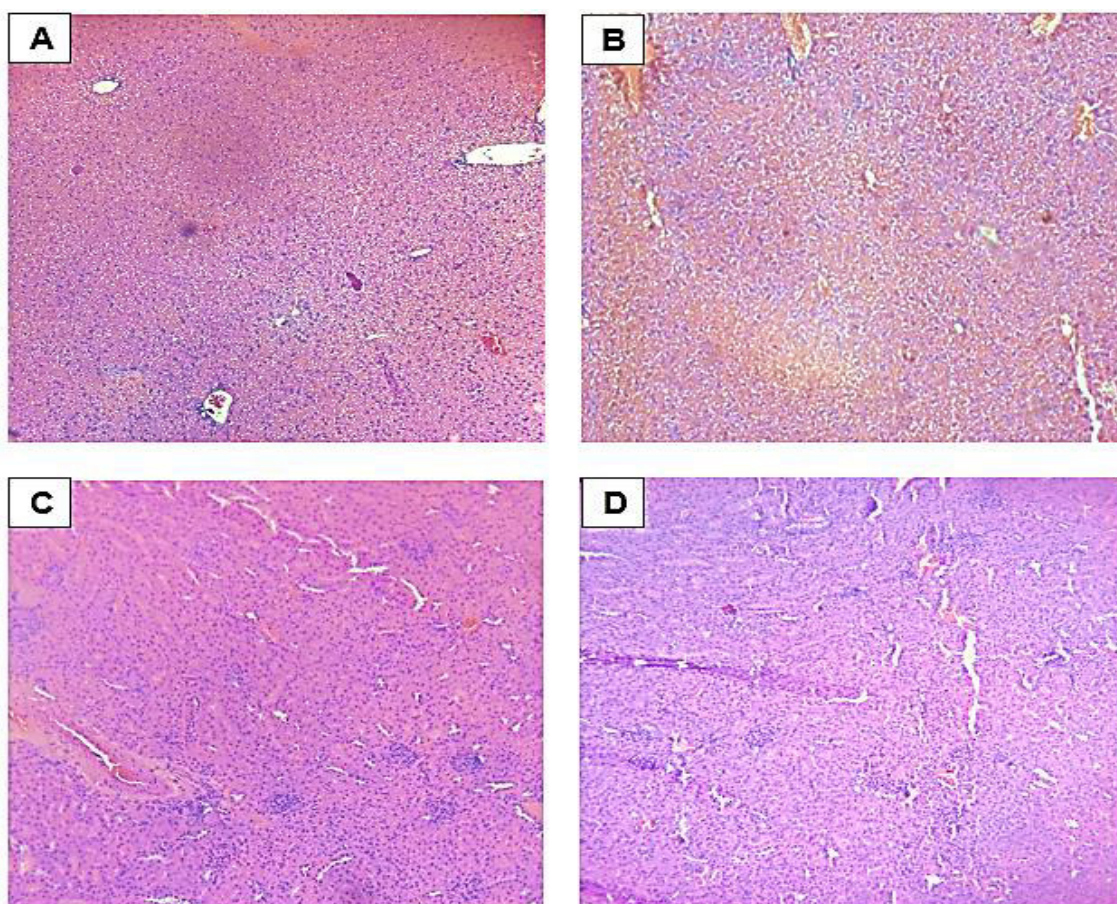


Figura 08: Análise histológica 10x: Fígado (A) CN - sem congestão vascular e com hepatócitos pouco vacuolizados; Fígado (B) LPS+EHLd 50mg/kg - 24 horas: com pouca congestão vascular, alguns hepatócitos mais volumosos; Fígado (C) LPS+EHLd 100mg/kg - 24 horas: com pouca congestão vascular, hepatócitos mais volumosos, pouca circulação sanguínea; Fígado (D) - LPS+EHLd 250mg/kg - 24 horas: com pouca congestão vascular, alguns hepatócitos com perda das ligações celulares, circulação sangue diminuída.

5.4.2 – Análise Histológica - Rim

Os resultados analisados nas lâminas do rim coletado, figura 09, foi de aspecto sem danos tecidual agudo, e observado em todos os grupos, submetendo-se que o intervalo de tempo estudado talvez não foi suficiente.

Nas doses 50, 100, 250mg/kg (v.o.), nenhuma alteração significativa foi observada, porém na dose de 250mg/kg observou-se congestão vascular na cortical em pequena quantidade e na dose de 100mg/kg notou-se também uma discreta congestão vascular e discreto infiltrado inflamatório entre os glomérulos. Diante do exposto, também foi observado que os animais não apresentarem alterações clínicas, além de apresentarem comportamento discreto em relação a anatomopatológicas.

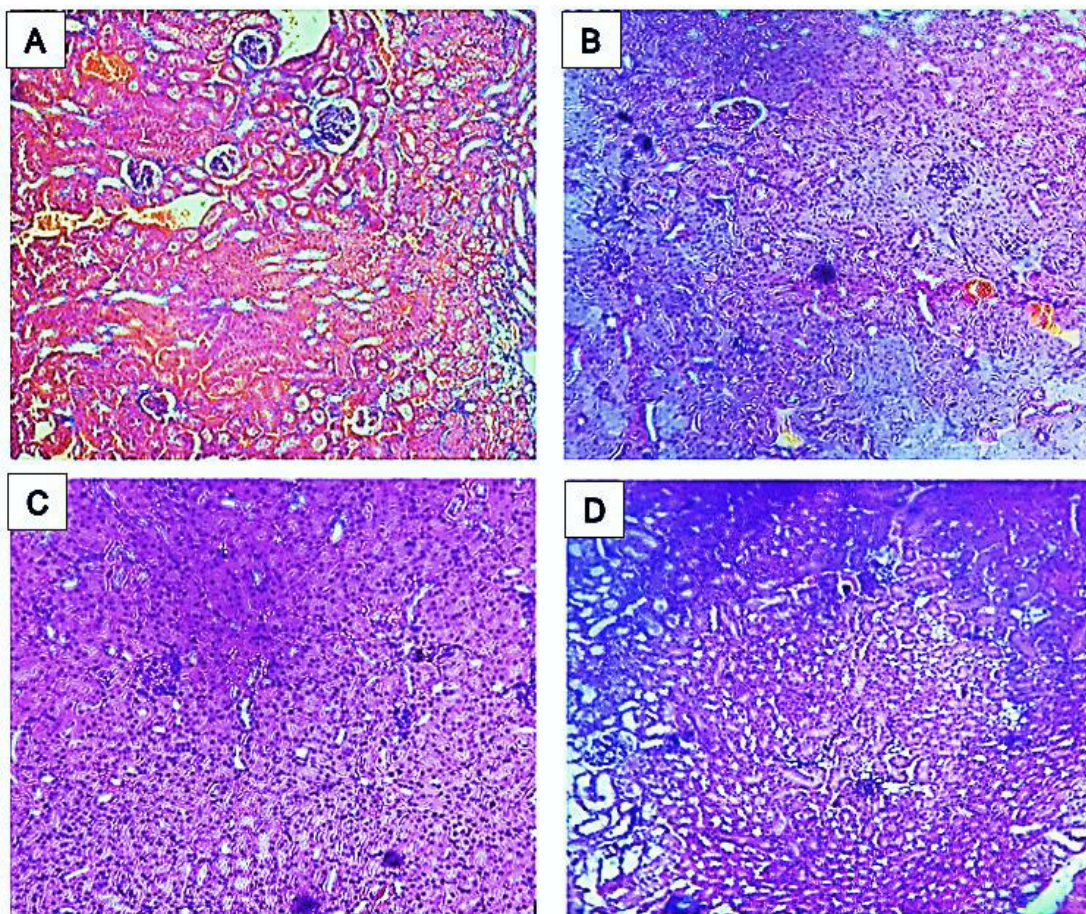


Figura 09: Análise histológica 10x: Rim (A) CN - túbulos renais preservados, apresentando corpúsculo renal e glomérulo bem preservados; Rim (B) LPS+EHLd 50mg/kg - 24 horas, região cortical pouco congesta, túbulos renais preservados; Rim (C) LPS+EHLd 100mg/kg - 24 horas: Rim apresentando corpúsculo renal com presença de alguns vasos congestos, mas com aspecto morfológico preservado; Rim (D) - LPS+EHLd 250mg/kg - 24 horas com região cortical preservada com presença de alguns vasos congestos com algumas áreas corticais com congestão vascular, com corpúsculo com aspecto normal.

5.4.3 – Análise Histológica - Pulmão

A Análise histológica dos pulmões estão ilustradas nas figuras de A – F, onde foram confeccionadas 48 lâminas, correspondentes ao número de animais do experimento. O Grupo Negativo - Salina, apresentou um aspecto histológico compatível com a normalidade, com o parênquima consistindo de alvéolos conectados a ductos alveolares, separados um do outro apenas por septos alveolares finas. Já os pulmões dos camundongos do Grupo CP – salina + LPS, observou-se que apresentaram áreas de ruptura de septos alveolares e congestionamento da área demonstrando dano pulmonar agudo.

Foi observado nesse estudo, através da análise do lavado brocoalveolar a presença de neutrófilos, confirmando a indução por LPS, além do que o neutrófilo faz um papel importante na fagocitose de material necrosado como também no recrutamento de outras células inflamatórias, ambos os eventos são associados com o sucesso na resposta regenerativa do pulmão (Teixeira et al., 2003). Os bronquíolos respiratórios são estruturas diferenciadas dos bronquíolos terminais pelo fato de suas paredes serem associadas aos alvéolos. Esses conjuntos de alvéolos formam estruturas semelhantes a sacos ou corredores denominados ductos alveolares ao qual se abrem nos bronquíolos respiratórios. Em relação a este estudo, os testes *in vivo* os pulmões dos grupos E 50 e E100 (EHLd 50mg/kg + LPS, EHLd 100mg/kg + LPS), tiveram um padrão histológico reduzido em

relação grupo controle CP. Já para o Grupo E250, LPS+EHLd 250mg/kg, foram observadas diferenças em relação as fibras colágenas dos alvéolos, bronquíolos e pulmões, quando comparados com o grupo controle CP – salina + LPS. Podemos observar melhor na figura 09, o efeito das diversas concentrações testadas do EHLd.

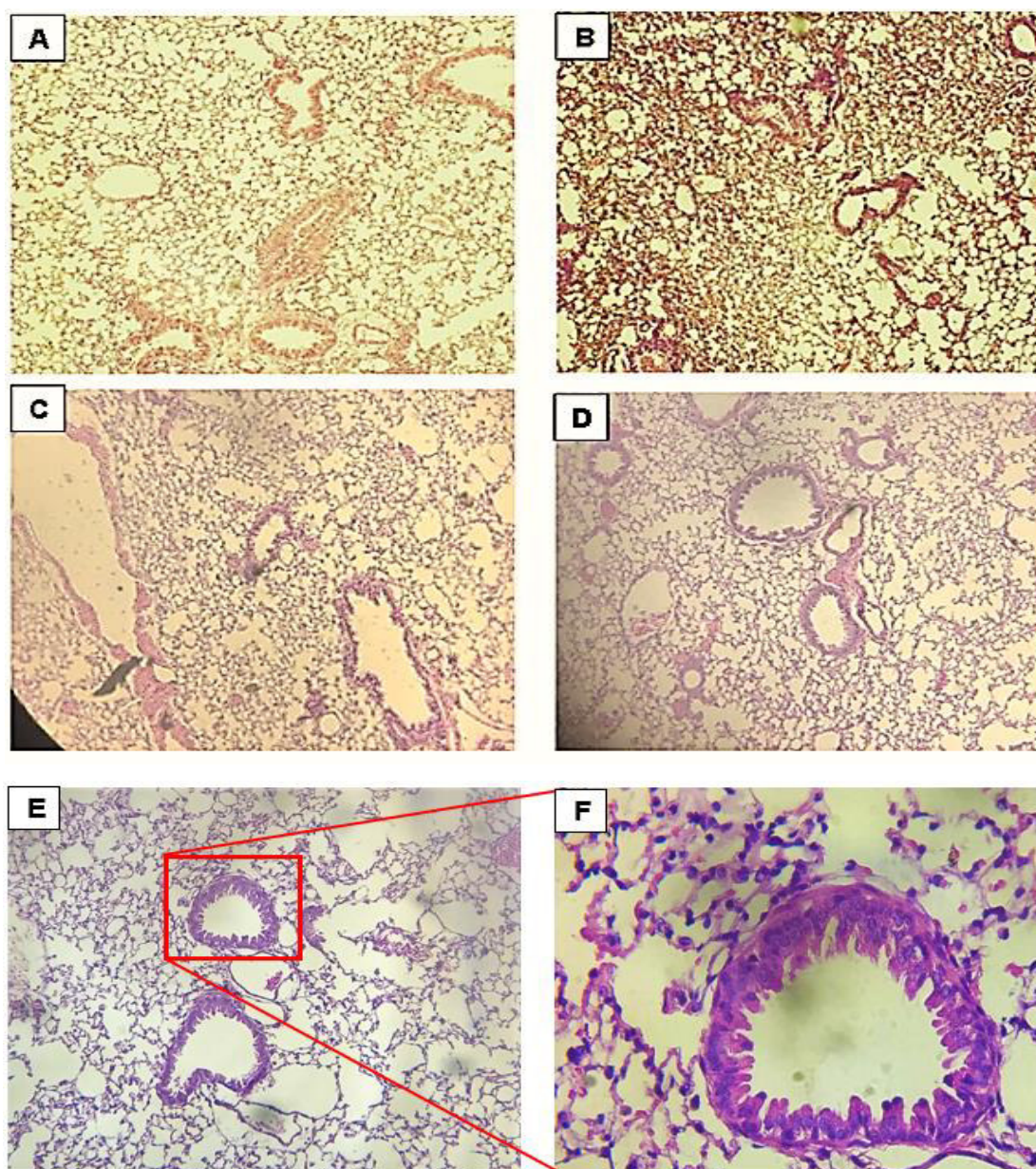


Figura 10 – Análise Histológica 10X – Pulmão - Efeito do tratamento com EHLd no acúmulo de leucócitos e formação de edema nos pulmões obtidos de camundongos tratados com: Salina (A), LPS (B), EHLd 50mg/kg + LPS(C), EHLd 100mg/kg + LPS (D) e EHLd 250mg/kg + LPS (E), e na objetiva de 40X o EHLd 250mg/kg + LPS (F).

5.4.4 – Lavado Broncoalveolar

No presente estudo, o achado mais consistente relacionado com os testes *in vivo* é a celularidade do LBA, onde observou-se as taxas reduzidas e significantes de neutrófilos no grupo E250 (LPS+EHLd 250mg/kg) nas figuras (A) e (F) em comparação ao grupo controle positivo nas figuras (A) e (C).

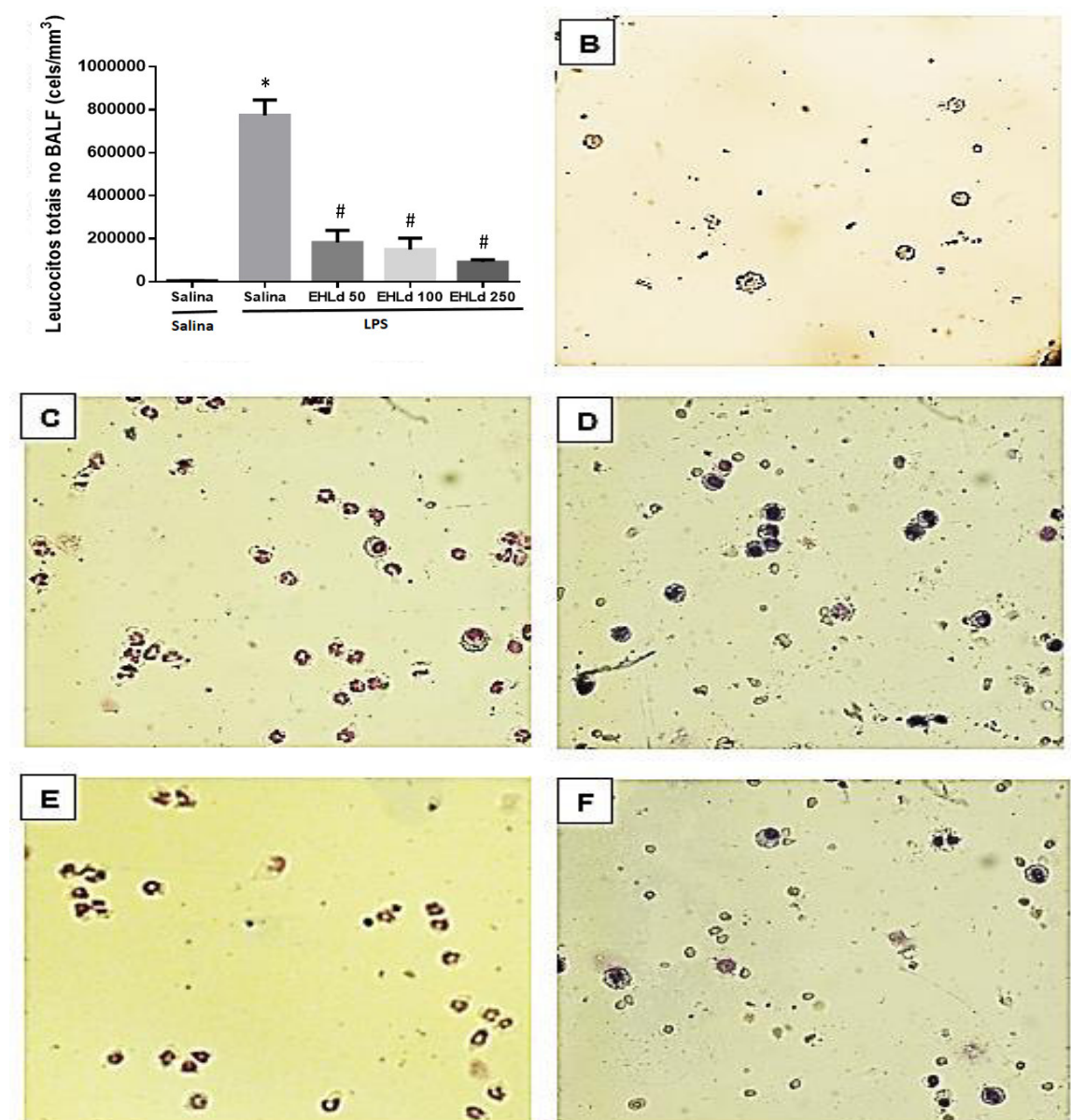


Figura 11 – Efeito do tratamento com EHLd com número de leucócitos totais do LBA (A). Os painéis B, C, D, E e F mostram figuras ilustrativas das células presentes no LBA de camundongos tratados com Salina (B), Salina+LPS (C), LPS+EHLd 50mg/kg (D), LPS+EHLd 100mg/kg (E), LPS+EHLd 250mg/kg (F), sendo essa última significativamente menor que Salina+LPS (C).

6. DISCUSSÃO

A *Luehea divaricata* é uma planta utilizada na medicina popular no Brasil, e as partes mais utilizadas são as aéreas (folhas, flores e casca), e apesar de seu potencial anti-inflamatório existem poucos estudos com a espécie.

Segundo Tanaka (2005), ela é usada contra disenteria, reumatismo, além da infusão das flores que é usada contra bronquite. Por outro lado, estudos de Rai (2003) confirmaram que as partes aéreas de *L. divaricata* são usadas popularmente para feridas cutâneas e para higiene íntima. Em relação ao uso nas diferentes regiões do Brasil, podemos concluir que a *Luehea divaricata* tem grande importância na medicina popular.

Corroborando com nosso estudo, Bessa et al (2013), relataram uma citação do açoita-cavalo como sendo de utilidade para o tratamento de úlcera na comunidade rural do Assentamento Green Vale, no Estado do Tocantins, Brasil Central. Em outro estudo similar de BIESKI et al (2012), pesquisa etnofarmacológica de plantas medicinais do Pantanal (Mato Grosso, Brasil), relataram que a *L. divaricata* está entre as espécies com maior valor de importância relativa. Corroborando sobre uso da *L. divaricata*, pesquisas de MONTELES e PINHEIRO (2007), realizaram um estudo etnodirigido no Quilombo Sangrador, Estado do Maranhão, Nordeste do Brasil, a açoita-cavalo foi uma das espécies de maior importância, com indicações para o tratamento de doenças do aparelho geniturinário.

O EHLd desse estudo apresentou as classes flavonoides e iridóide em sua composição de metabólitos químicos secundários. Neste contexto, pesquisas realizadas por Arantes (2012), também analisou o extrato etanólico de folhas de *Luehea divaricata* coletadas no sul do Brasil, e através da CLAE

relatou a identificação de flavonóides como a quercetina, rutina, ácidos aromáticos ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico e kaempferol, sendo esse último composto também identificado em nosso estudo. Outra pesquisa similar desenvolvida por Albuquerque et al. (2014), realizaram análise fitoquímica no extrato das folhas de *Luehea divaricata* coletada em feiras de Belém - PA, e conseguiram observar a presença de taninos, catequinas, flavonóides, carotenóides, esteróides, triterpenóides e saponinas.

Por outro lado, Bertucci et al. (2008) em pesquisas por triagem fitoquímica com extratos etanólicos das folhas e caule, também observaram a presença de flavonóides, taninos, saponinas e triterpenos. Outra pesquisa em questão, foi a desenvolvida por Vargas et al. (1991), que conseguiram confirmar a presença de taninos, flavonóides e saponinas nas folhas e casca de *L. Divaricata*, sendo quercetina e kaempferol os flavonoides descritos, assim como em nosso estudo em que a ELHd também apresentou o flavanoide kaempferol.

Em relação a citotoxicidade do EHLd, foi observado que este possuiu baixa citotoxicidade no ensaio utilizando macrófagos Raw 246.7. Por lado um estudo realizado por Bianchi et al. (1996), observaram que o extrato etanólico das folhas da *Luehea divaricata*, apresentavam toxidade na dose de 500mg/kg, quando administrado via oral, ocasionando a morte de 25% dos camundongos. A atividade fitotóxica de *Luehea divaricata* foi claramente demonstrada por Souza et al. (2005), onde os autores apontam o teste com extrato aquoso de folhas coletadas em Pelotas, RS, e mostrou efeito inibitório na germinação de *Lactuca sativa*. No entanto, extratos de *L. divaricata* demonstram *in vivo* falta de toxicidade ou mutagenicidade.

Em relação ao efeito antioxidante da *Luehea divaricata*, esse estudo observou que o EHLd pode ser utilizado para tratar doenças em que a produção de radicais livres é deletéria. Essas mesmas propriedades antioxidantes foram observadas por Müller (2006) em folhas de *L. divaricata*, utilizando o método DPPH, o autor observou o extrato bruto com ação antioxidante semelhante à quercetina. Por outro lado, Arantes (2012) mostrou atividade antioxidante em baixas concentrações de extrato etanólico das folhas desta espécie, e seu efeito protetor contra a peroxidação lipídica.

Pesquisa envolvendo atividade anti-inflamatória e citotoxicidade foi realizada por Lopes (1990), que investigou a ação anti-inflamatória de *L. divaricata* através de experimento utilizando o extrato aquoso obtido das folhas secas da planta, com teste de edema de pata de rato induzido por carragenina e segundo o autor, houve redução no edema. Por outro lado, Siqueira (2006), utilizando o extrato hidroalcoólico de *L. divaricata* reduziu taxa de lesões ulcerativas produzidas por indometacina e etanol. Nossa pesquisa indica que o mecanismo de ação anti-inflamatória do EHLd está relacionado à atividade antioxidante confirmada pela captura dos radicais livres, e que a análise fitoquímica do extrato apresentou polifenóis na casca da planta. Corroborando com nossa pesquisa, estudos de Bianchi (1996), realizou teste de toxicidade aguda e subaguda com extratos dessa espécie e fez uso de ratos Swiss machos. O extrato alcoólico foi administrado por via intraperitoneal e foi observado que 50% dos animais morreram em 48 horas. Em outro teste de toxicidade subaguda, intraperitoneal, administrada uma vez por semana durante 8 dias, desencadeou a morte de um animal após a 8ª dose, ao contrário do extrato alcoólico que nesta dose não causou nenhuma morte.

Sendo assim a atividade anti-inflamatória observada *in vitro* e *in vivo* com uso do extrato bruto da *Luehea divaricata*, pode ser resultado do efeito isolado ou sinérgico desses fitoquímicos. A síntese dos flavonoides antioxidantes e anti-inflamatórias em algumas plantas é um processo natural de fotoproteção e estresse ao período seco, e está diretamente relacionada a presença de altas quantidades dos flavonoides quercetina e/ou kaempferol (TREUTTER, 2006).

Foram observados durante nossa pesquisa que o tratamento com EHLd causou uma redução da contagem diferencial do lavado broncoalveolar de dois tipos celulares: macrófagos e neutrófilos. Existiu uma migração significativa de neutrófilos, no lavado broncoalveolar dos animais testados, o mesmo foi relatado em pesquisas de XU, M. et al. (2015).

De modo geral, podemos concluir que os resultados *in vitro* e *in vivo* obtidos nesse estudo, do extrato da *Luehea divaricata* testado, foi capaz de reduzir a formação do edema pulmonar, evidenciando mais uma vez, o potencial da atividade anti-inflamatória.

7. CONCLUSÃO

Os testes fitoquímicos (CLAE) demonstraram a presença de flavanóides e iridóide no extrato da casca da *Luehea divaricata*.

O EHLd apresentou baixa citotóxicidade entre as concentrações de 50µg/mL, 100µg/mL, 150µg/mL e 250µg/mL.

Nos ensaios de atividade antioxidante, o EHLd apresentou mediana capacidade de captura de radicais livres em relação ao controle ácido gálico.

O EHLd reduziu a migração de leucócitos, principalmente de neutrófilos, nos pulmões dos camundongos com inflamação pulmonar aguda.

Os testes com macrófagos RAW 264.7 confirmaram ação anti-inflamatória, e reduziram significativamente a produção de NO nas concentrações de 50 ug/mL, 100 ug/mL, e 250 ug/mL, frente ao EHLd.

Houve redução significativa da expressão genica de IL1 β e IL6 com tratamento do EHLd nas concentrações de 100, 150 e 250 µg/mL.

REFERÊNCIAS

- Agier, J.; Efenberger, M.; Brzezinska-Blaszczyk, E. **Cathelicidin impact on inflammatory cells**. Cent Eur J Immunol, v. 40, n. 2, p. 225-35, 2015.
- Albuquerque, U. P. A.; Monteiro, J. M.; Ramos, M. A.; Amorim, E. L. C.; Alves, R. N. **Ethnobiological Research in Public Markets**, 2014.
- Alice C. B., G. A. A. B. Silva, N. C. S. Siquei Ra, And L. A. Mentz, **Levantamento fitoquímico de alguns vegetais utilizados na medicina popular do Rio Grande do Sul**. Cadernos de Farmácia, vol. 1, no. 2, pp. 83–94, 1985.
- Alves, C. Q., David, J. M., David, J. P., Bahia, M. V., Aguiar, R. M. **Métodos para Determinação de Atividade Antioxidante *in vitro* em Substratos Orgânicos**, Química Nova, 33(10) 2202-2210, 2010
- Arantes L. P., **Atividade antioxidante *in vitro* do extrato etanólico das folhas de *Luehea divaricata* Mart**, UFSM, Santa Maria, Brazil, 2012.
- Backes, P.; Irgang, B. **Árvores do sul: guia de identificação e interesse ecológico**. Santa Cruz do Sul: Clube da Árvore, 2002.
- Bessa N., J. Borges, F. Beserra et al., **Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento Vale Verde—Tocantins**, Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, vol. 15, no. 4, pp. 692–707, 2013
- Bianchi, N.R. et al. **Estudo da toxicidade de *Luehea divaricata***. Revista Brasileira de Farmacologia, v.77, n.2, 49-50, 1996.

Bieski I. G. C., F. R. Santos, R. M. De Oliveira Et Al., **Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (Mato Grosso, Brazil)**, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012.

BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC no 84**, de 17 de junho de 2016. Aprova o Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira – disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/2909630/Memento+Fitoterapico/a80ec477-bb36-4ae0-b1d2-e2461217e06b>

BRASIL ANVISA - **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. RENISUS.

Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. **Portal da Saúde. Ministério da Saúde, 2014**. Disponível em.: . Acesso em 27 de abril de 2015. BRASIL. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2014. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – 9. ed. rev. e atual– Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BRASIL. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS. Secretaria de Atenção à Saúde**. Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos. Secretaria de Ciência, Tecnológica e Insumos Estratégicos**. Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. **Portaria no. 971, de 03 de maio de 2006**. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde, Diário Oficial da União, Brasília, DF, 4 de maio de 2006.

BRASIL. **Presidência da República; Decreto Nº 5.813 de 22 de junho de 2006**. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas, Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 de junho de 2006.

BRASIL. **Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006.** Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, Seção 1, p. 2. 23 jun. 2006.

Bruning, M.C.R.; Mosegui, G.B.G.; Viana, C.M.M. **A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde.** *Ciência e Saúde coletiva*, v. 17, n. 10, p. 2.675-2.685, 2012.

Carvalho, P.E.R. **Espécies Arbóreas Brasileiras.** Coleção Espécies Arbóreas Brasileiras, vol. 1. Brasília: Embrapa Informações Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2003.

Carvalho, A.C.B; Bino, E.E; Maciel, A; Perfeito, J.P.S. **Situação do Registro de Medicamentos Fitoterápicos no Brasil. Paraíba, Brasil.** *Revista Brasileira de Farmacognosia.* Curitiba/ PR, v.18, n. 2, p. 314-319. 2008.

Chen, H. Et al. **Anti-inflammatory and antinociceptive properties of flavonoids from the fruits of black mulberry,** *PLoS ONE*, v. 11, n. 4, p. 1–14, 2016.

Collins, C. H.; Braga, G. I.; Bonato, Perina, S. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas: Editora da Unicamp, 2006.

Cunha, L. H. De S.; Brandao, M.; Laca-Buendía, J.P. Del C.; Gavilanes, M. L. **Plantulas, frutos/sementes e sementes de plantas daninhas em pastagens naturais de cerrado, no Estado de Minas Gerais.** In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTANICA, 36., 1985.

Diniz, A.C.B.; Astarita, L.V.; Santarém, E.R. **Alteração dos metabólitos secundários em plantas de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento.** *Acta bot. bras.* v. 21, n.2, p. 443-450, 2007.

Ferreira Junior, W. S.; Almeida, J. L.; Albuquerque, U. P. **Urbanização e serviços públicos**. In: ALBUQUERQUE, U. P. (Ed.). Introdução à Etnobiologia. Recife: NUPEEA, p. 175-179, 2014.

Figueredo, C.A. **Fitoterapia**. João Pessoa: Núcleo de Estudo e Pesquisas Homeopáticas e Fitoterápicas, 2011.

Firmo, Wellyson da Cunha Araújo et al. **Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais**. Cadernos de Pesquisa, 2012. Disponível em: <https://goo.gl/L9PorU> Acesso em: 08.abril.2018.

Freires, I.A. et al. **Atividades antibacteriana e antiaderente *in vitro* de tinturas de Schinus terebinthifolius (aroeira) e Solidago microglossa (arnica) frente a bactérias formadoras do biofilme dentário**. Odontologia Clínico-científica. V. 9, p. 139-143, 2010.

Golan De, Armstrong Ej, Armstrong AW **Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy**, 2017.

Green, L. C. et al. **Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids**. *Analytical Biochemistry*, v. 126, p. 131-138, 1982

Guler, B.; Kumustekin, G.; UgurLU, E. **Contribution to the Traditional Uses of Medicinal Plants of Turgutlu (Manisa - Turkey)**. *J Ethnopharmacol*, Oct 19 2015.

Guo, B. J. et al. **Biological and clinical implications of herbal medicine and natural products for the treatment of inflammatory bowel disease**. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1401, n. 1, p. 37-48, 2017.

IBGE. Censo Demográfico 2010 – **Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), 2010. Resultados do Panorama – Economia**. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ma/panorama>. Público acesso em 16 de junho de 2018.

Jardim, P. M.S. **Plantas Medicinais e Fitoterápicos: Guia Rápido Para a Utilização de Algumas Espécies Vegetais**. 2 Ed. Brasília – DF. Universidade de Brasília. 98 p. 2016

Jorge L.I.F; Markmann B.E.O. **Exame químico e microscópico de Schinus terebinthifolius Raddi (Aroeira)**. Ciênc. Farm. V.17, p.139-45, 1996.

Kok, E. T. et al. **Resistance to Antibiotics and Antifungal Medicinal Products: Can Complementary and Alternative Medicine Help Solve the Problem in Common Infection Diseases? The Introduction of a Dutch Research Consortium**. Evid Based Complement Alternat Med, v. 2015.

Lima A, Silva Amo. Tridande Ra. Torres Rp. Mancini-Filho J. **Chemical composition and biocative compounds in the pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb) Pulp and almond**. Revista Brasileira de Fruticultura, 2007.

Lopes E., **Avaliação das Atividades Biológicas de *Luehea divaricata***, Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos. Faculdade de Farmácia, São Paulo, Brazil, 1990.

Lorenzi, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum,. 352 p. 1992.

Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C. & Veiga, V.E. **Plantas medicinais:a necessidade de estudos multidisciplinares**. Química Nova v.23: 429-438, 2002.

Mansuri, M. L. et al. **Flavonoids in modulation of cell survival signalling pathways**. Genes Nutr, v. 9, n. 3, p. 400, May 2014.

Marodin, S.M.; Baptista, L.R.M. **O uso de plantas com fins medicinais no município de Dom Pedro de Alcântara, Rio Grande do Sul, Brasil**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.4, n.1, p.57-68, 2001.

Menezes, S.M.S. **Avaliação da eficácia antimicrobiana do extrato hidroalcoólico dos frutos de Punica granatum L. (romã) na placa bacteriana.** 80p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia Clínica), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, 2004.

Monteles R. E Pinheiro B. U. C., **Plantas medicinais em um quilombo maranhense: uma perspectiva etnobotânica,** Revista de Biologia e Ciências da Terra, vol. 7, pp. 17–37, 2007

Napolitano, D.R.; Mineo J.R.; Souza M.A.; Paula, J.E.; Espindola, L.S.; Espindola, F.S. **Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude extracts from Brazilian Cerrado.** J. Ethnopharmacol., v.99, p.37-41, 2005.

Ortega, L. S. **Temperamento de luz de los arboles del alto Paraná y potencial de regeneración forestal.** Assunción, v. 11, n. 1, p. 16-20, 1995.

Ribeiro, F.A.Q.; Guaraldo, L.; Borges, J.P.; Zacchi, F.F.S.; Eckley, C.A. **Clinical and histological healing of surgical Wounds Treated With Mitomycin C.** Laryngoscope, v. 114, p.148-152, 2004.

Rodrigues, T. S.; Guimarães, S. F.; Rodrigues-Das-Dôres, R. G.; Gabriel, J. V. **Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de Plectranthus barbatus (boldo-da-terra) e P. ornatus (boldo-miúdo).** Rev. Bras. Pl. Med., v.13, especial, p.587-590, 2011

Sales, M.D.C. **Avaliação e caracterização de insumos bioativos da aroeira (Schinus terebinthifolius Raddi) com potencial econômico para o desenvolvimento tecnológico de bioprodutos** [Tese de Doutorado]. Vitória (ES): Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), 2013.

Souza S. A. M., Cattelaia L. V., and Vargas D. P., **Efeitos de extratos aquosos de plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul sobre a germinação de sementes de alface**, *Biologia & Saúde*, vol. 11, pp. 29–38, 2005.

Saraiva, A. M. **Estudo Farmacognóstico e Determinação da Atividade Biológica de *Caesalpinia pyramidalis* Tull. e *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA Multirresistentes**. Dissertação de Mestrado. Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2007. 58 p.

< <http://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/3522>>

Silva, F.L.A.; Oliveira, R.A.G.; Araújo, E.C. **Uso de plantas medicinais pelos idosos em uma Estratégia de Saúde da Família**. *Revista de Enfermagem da UFPE*, v.2, n.1, p.9-16, 2008.

Silva, N.L.A.; Miranda, F.A.A.; Conceição, G.M. **Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão**. *Scientia Plena*. São Cristóvão, v. 6, n. 2, p. 1- 17, 2010.

Siqueira M. G., **Atividade antiulcerogênica do extrato bruto hidroalcoólico da *Luehea divaricata* Martus et Zuccarini**, Campinas, UNICAMP, 2006.

Siqueira, J. I. A.; Lemos, J. R. **Importancia del Rescate de la Memoria Biocultural Local: Diálogos entre la Etnobotánica y Experiencia Vivida en Brasil**. En: CONGRESO COLOMBIANO DE BOTÁNICA, 2017, Tunja, Boyacá, Colombia. *Revista Ciencia en Desarrollo* p. 281., 2017.

Stowe, L. G. **Allelopathy and its influence on distribution of plants in Illinois old-field**. *J. Ecol.*, v. 67, n. 4, p. 1065-1085, 1979

Tanaka, J. C. A. et al. **A new Tormentonic Acid derivative from *Luehea divaricata* Mart, (Tiliaceae)**. *J.Braz. Chem. Soc.*, v.14, n.3, 475-478, 2003.

Tanaka, J. C. A. et al. **Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Martius, (Tiliaceae)**. Química Nova, vol.28, n.5, 834-837, 2005.

Teixeira Cf, Zamuner Sr, Zuliani Jp, Fernández Cm, Cruz–Hofling Ma, Fernandes I, Chaves F, Gutiérrez Jm. **Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with Bothrops asper snake venom**. Muscle Nerve 28: 449–59, 2003.

Tidd, J., & Bessant, J. **Gestão da inovação** , Bookman. Porto Alegre, 2015.

Tribess, B. et al. **Ethnobotanical study of plants used for therapeutic purposes in the Atlantic Forest region, Southern Brazil**. J Ethnopharmacol, v. 164, p. 136-46, Apr 22 2015.

Vaccaro, S. et al. **Aspectos da composição florística e categorias sucessionais do estrato arbóreo de três subseres de uma floresta estacional decidual, no município de Santa Tereza – RS**. Ciência Florestal, Santa Maria, v.9, n.1, p.1-18, 1999.

Vargas V. M., R. R. Guidobono, And J. A. Henriques, **Genotoxicity of plant extracts**, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, vol. 86, pp. 67–70, 1991.

Yao, L.; Jlang, Y.; Datta, N.; Singanusong, R.; Liu, X.; Duan, J., **HPLC analyses of flavonols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camelia sinensis*) grown in Australia**. Food Chemistry, v. 84, p. 253-263, 2004.

Yunes, Rosendo A.; Pedrosa, Rozangela Curi; Cechinel Filho, Valdir. **Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil**. Química nova, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

Yunes, R.A.; Cechinel Filho, V. In: Yunes, R.A.; Calixto, J.B. (Org.). **Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

ANEXO



15/08/2018 870180051365
11:35
29409161805799125

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2018 012207 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 06279103000119

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária Dom Delgado, Av. dos Portugueses, 1966, Vila Bacanga.

Cidade: São Luis

Estado: MA

CEP: 65080-805

País: Brasil

Telefone: (98) 32728710

Fax:

Email: nit-dapi@ufma.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 15/08/2018 às 11:35, Petição 870180051365

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS DO EXTRATO DA CASCA DA Luehea divaricata

Resumo: A Luehea divaricata popularmente conhecida como açoita cavalo, é bastante utilizada na medicina popular devido a sua possível ação anti-inflamatória. Portanto, esse invento tem por objetivo disponibilizar através de método de extração os componentes secundários do extrato hidroalcoólico da casca da Luehea divaricata, liofilizando tornando-o seco, com ação anti-inflamatória para o tratamento e prevenção de processos inflamatórios, além da simples manipulação, baixo custo de produção em laboratório, e por se tratar de produto natural não possuindo restrições de resíduos ao meio ambiente. Os efeitos colaterais são consequências do uso crônico de drogas comerciais, portanto o método de extração justifica a procura contínua por novos fármacos, visando o uso para pacientes com diversas restrições e como método alternativo de tratamento das diversas inflamações.

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 4**Nome:** JADIEL DE ABREU PIMENTA LINS**CPF:** 61798468304**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Agrônomo e afins**Endereço:** |**Cidade:** São Luís**Estado:** MA**CEP:** 65067-090**País:** BRASIL**Telefone:** (98) 988 232166**Fax:****Email:** jadiellins@ig.com.br**Inventor 2 de 4****Nome:** ANTONIO CARLOS ROMÃO BORGES**CPF:** 23718331349**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins**Endereço:** |**Cidade:** São Luís**Estado:** MA**CEP:** 65075-775**País:** BRASIL**Telefone:** (98) 992 084446**Fax:****Email:** romao.antonio@ufma.br**Inventor 3 de 4**

Nome: MARILENE OLIVEIRA DA ROCHA BORGES

CPF: 22729880215

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço:

Cidade: São Luís

Estado: MA

CEP: 65075-775

País: BRASIL

Telefone: (98) 991 344445

Fax:

Email: morborges@yahoo.com.br

Inventor 4 de 4

Nome: LÍDIO GONÇALVES LIMA NETO

CPF: 89706803300

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço:

Cidade: São Luís

Estado: MA

CEP: 65077-160

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: lidio.neto@ceuma.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Relatório Descritivo	RELATÓRIO DESCRITIVO.pdf
Reivindicação	REIVINDICAÇÕES.pdf
Resumo	RESUMO.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	comprovante de pagamento.PDF

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Positiva de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, realizado a partir de 30 de junho de 2000, e que foram cumpridas as determinações da Lei 13.123 de 20 de maio de 2015, informando ainda:

Número da Autorização de Acesso: A2F6F77

Acesso:

Data da Autorização de Acesso: 03/05/2018

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

EXAME PRELIMINAR

N.º do Pedido: BR102018012207-0 **N.º de Depósito PCT:**
Data de Depósito: 15/06/2018

O pedido atende formalmente as disposições legais, especialmente quanto ao Art. 19 da LPI e o Instrução Normativa nº 31/2013, estando apto a ser protocolado.

Condições do Pedido	S	N
Requerimento de depósito com os campos obrigatórios preenchidos	X	
Idioma Português	X	
Relatório Descritivo	X	
Reivindicações	X	
PI e C – Apresenta desenhos citados ou não cita nem apresenta desenhos. MU – Apresenta desenhos.	X	
Resumo	X	
Formatado no padrão exigido	X	
Valor correto de Recolhimento	X	

Rio de Janeiro, 24 de setembro de 2018.

Patricia Paiva Carvalho
Mat. Nº 1535837
DIRPA / COSAP/SEFOR