



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

MARCEL DA SILVA NASCIMENTO

**ABORDAGEM FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO E
FRAÇÕES DA ENTRECASCA DA *Mimosa hostilis* Benth**

SÃO CRISTÓVÃO, SE

2013

MARCEL DA SILVA NASCIMENTO

**ABORDAGEM FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA
DO EXTRATO E FRAÇÕES DA ENTRECASCA DA
Mimosa hostilis Benth**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Charles dos Santos Estevam

SÃO CRISTÓVÃO

2013

Ficha catalográfica elaborada pela biblioteca central/UFS

N244a	<p>Nascimento, Marcel da Silva</p> <p>Abordagem fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante e antiinflamatória do extrato e frações da entrecasca da <i>Mimosa hostilis</i> Benth / Marcel da Silva Nascimento ; orientador : Charles dos Santos Estevam – São Cristóvão, 2014.</p> <p>46 f.</p> <p>Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) –Universidade Federal de Sergipe, 2013.</p> <p>1. <i>Mimosa hostilis</i>. 2. Atividade antioxidante. 3. Fitoquímica. I. Estevam, Charles dos Santos, orient. II. Título.</p> <p>CDU: 582.736.3</p>
-------	--

MARCEL DA SILVA NASCIMENTO

**ABORDAGEM FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA
DO EXTRATO E FRAÇÕES DA ENTRECASCA DA
Mimosa hostilis Benth**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Charles dos Santos Estevam

1º Examinador: Prof. Dr. Murilo Marchioro

2º Examinador: Prof. Dra. Sheyla Alves Rodrigues

RESUMO

Abordagem fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante e anti-inflamatória do extrato e frações da entrecasca da *Mimosa hostilis* Benth, Marcel da Silva Nascimento, São Cristóvão, 2013.

O uso de plantas medicinais para cura e prevenção de doenças é uma das práticas mais antigas da humanidade. Uma das plantas utilizadas na medicina popular é a *Mimosa hostilis* Benth conhecida como jurema preta e usada popularmente em problemas de pele e inflamações em geral. O presente trabalho teve por objetivo realizar a triagem fitoquímica e avaliar a atividade antioxidante e anti-inflamatória do extrato hidroetanólico (EHE) e das suas frações hexânica (FHX), clorofórmica (FCL), acetato de etila (FAE) e hidrometanólica (FHM) obtidas das entrecascas da *M. hostilis*. Para isso, o EHE e suas frações foram submetidos à prospecção fitoquímica clássica a qual envolveu reações químicas qualitativas que resultaram na confirmação de metabólitos pertencentes às classes dos flavonoides, taninos, xantonas, triterpenoides, esteroides livres, saponinas e fenóis. O teor de fenóis totais também foi realizado utilizando-se o método de Folin-Ciocalteu cujo resultado foi maior na FAE ($527,71 \pm 30,80$ mg de EAG.g⁻¹). Para avaliar a atividade antioxidante foram utilizados os métodos de sequestro do radical livre (2,2-difenil-1-picril-hidrazil-DPPH) e da inibição da lipoperoxidação quantificada por meio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O EHE e as FAE e FHM tiveram um maior percentual de inibição do radical livre DPPH com índices de 95,84%, 94,66% e 95,40% respectivamente. O EHE e FAE mostraram maior percentual de inibição da peroxidação lipídica quando induzida por AAPH enquanto a FHM, maior quando induzida por FeSO₄. A atividade biológica investigada foi a anti-inflamatória por meio da redução do edema de orelha e pela atividade da mieloperoxidase (MPO). O edema de orelha foi induzido pelo 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA, 1µg/orelha) e o efeito do EHE ou das frações foi avaliado pela coadministração dos mesmos, em doses de 1,0 e 3,0 mg/orelha, com o TPA na orelha direita. Na orelha esquerda foi administrado apenas o veículo (acetona). Após 6 h, os sítios de orelha foram retirados o edema expresso pela variação da massa da orelha direita pela orelha esquerda, bem como a atividade de mieloperoxidase (MPO) foi mensurada. A coadministração do EHE causou inibição significativa ($p < 0,001$) do edema e da atividade de MPO ($p < 0,05$) em ambas as doses. Por sua vez, FHX, FCL, FAE e FHM reduziram o edema de forma semelhante na dose de 3,0 mg/orelha com percentuais de inibição de 78%, 71%, 75% e 65%, respectivamente. A FAE e a FHM inibiram a atividade de MPO nas doses de 1,0 ou 3,0 mg/orelha (86% e 93% para 1,0 e 3,0 mg/orelha de FAE, respectivamente, $p < 0,001$; 40% e 52% para 1,0 ou 3,0 mg/orelha de FHM respectivamente, $p < 0,05$). A FCL causou inibição apenas na dose de 3,0 mg/orelha (72%, $p < 0,05$) e a FHX não alterou significativamente a atividade de MPO induzida pelo TPA. Se considerados conjuntamente estes resultados indicam que o EHE e suas frações possuem ação antioxidante e anti-inflamatória, viabilizando estudos futuros com esta planta para a obtenção de compostos bioativos.

Descritores: Atividade antioxidante; Fitoquímica, Anti-inflamatória; *Mimosa hostilis*

ABSTRACT

Phytochemical screening and antioxidant and antiinflammatory activity evaluation of the extract and fractions from inner bark *Mimosa hostilis* Benth, Marcel da Silva Nascimento, São Cristóvão, 2013.

The use of medicinal plants for healing and prevention diseases is one of the oldest practices of mankind. Among the many plants used in folk medicine, the *Mimosa hostilis* Benth known as jurema black popularly used in skin problems and inflammation in general. This study aimed to perform phytochemical screening and evaluate the antioxidant and antiinflammatory activity of hydroethanolic extract (HEE) and its fractions, hexane (HXF), chloroform (CLF), ethyl acetate (EAF) and hydromethanol (HMF) obtained from the inner bark of *M.hostilis*. For this, the HEE and their fractions were subjected to classic phytochemical trials which involved qualitative chemical reactions that resulted in the confirmation of metabolites belonging to the classes of flavonoids, tannins, xanthones, triterpenoids, free steroids, saponins and phenols. The total phenolic content was also performed using the Folin-Ciocalteu method which it was higher in EAF (527.71 ± 30.80 mg GAE.g⁻¹). To evaluate the antioxidant activity were used kidnapping free radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) and inhibition of lipid peroxidation quantified by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The HEE, EAF and HMF had a higher inhibition percentage of DPPH free radical with indices 95.84%, 94.66% and 95.40%, respectively. The HEE and EAF showed higher lipid peroxidation inhibition percentage when induced by AAPH, while HMF was higher when induce by FeSO₄. The biological activity investigated was antiinflammatory by reducing of ear edema and myeloperoxidase (MPO) activity. Ear edema was induced by 12-O-tetradecanoylphorbol acetate (TPA, 1µg/ear) and the HEE effect or their fractions was evaluated by co-administration there of in doses of 1.0 and 3.0 mg/ear, with TPA in the right ear. Left ear was administered only the vehicle (acetone). After 6 h, the ear sites were removed and the edema was expressed from the mass variation between left and right ear, as well the myeloperoxidase activity (MPO) was measured. Co-administration of HEE caused significant inhibition ($p<0.001$) swelling and MPO activity ($p<0.05$) at both doses. In turn, HXF, CLF, EAF and FHM reduced similarly edema at a dose of 3.0 mg/ear and percent inhibition de 78%, 71%, 75% and 65%, respectively. The FAE and FHM inhibited MPO activity at doses 1.0 and 3.0 mg/ear (FAE: 86% and 93% for 1.0 and 3.0 mg/ear [$p<0.001$], respectively; FHM: 40% and 52% for 1.0 and 3.0 mg/ear [$p<0.05$], respectively). The CLF caused inhibition at a dose of only 3.0 mg/ear (72%, $p<0.05$) and HXF did not significantly alter MPO activity induced by TPA. If taken together these results indicate that the HEE and its fractions have antioxidant and antiinflammatory, allowing future studies with this plant to obtain bioactive compounds.

Descritores: Antioxidant activity; Phytochemical; Antiinflammatory; *Mimosa hostilis*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Prospecção fitoquímica do extrato hidroetanólico (EHE) e das frações hexânica (FHX), clorofórmica (FCL), acetato de etila (FAE), e hidrometanólica (FHM) da entrecasca de <i>M. hostilis</i>	22
Tabela 2 Atividade antioxidante do extrato hidroetanólico (EHE) e das frações hexânica (FHX), clorofórmica (FCL), acetato de etila (FAE), e hidrometanólica (FHM) da entrecasca de <i>M. hostilis</i>	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Redução tetravalente do oxigênio molecular (O ₂) na mitocôndria até a formação de água (H ₂ O). Várias espécies reativas de O ₂ são formadas no processo..	6
Figura 2 Teor de fenóis totais do extrato hidroetanólico (EHE) e das frações hexânica (FHX), clorofórmica (FCL), acetato de etila (FAE) e hidrometanólica(FHM) da entrecasca de <i>M. hostilis</i>	24
Figura 3 Efeito do extrato hidroetanólico (EHE) e das frações hexânica (FHX), clorofórmica (FCL), acetato de etila (FAE), e hidrometanólica (FHM) da entrecasca de <i>M. hostilis</i> na lipoperoxidação induzida por AAPH.	26
Figura 4 Efeito do extrato hidroetanólico (EHE) e das frações hexânica (FHX), clorofórmica (FCL), acetato de etila (FAE), e hidrometanólica (FHM) da entrecasca de <i>M. hostilis</i> da entrecasca de <i>M. hostilis</i> na lipoperoxidação induzida por FeSO ₄ .27	27
Figura 5 Efeito do extrato hidroetanólico (EHE) da entrecasca de <i>Mimosa hostilis</i> (0,3, 1, 3 mg/orelha) ou dexametasona (Dexa; 0,05 mg/orelha) sobre o edema de orelha (A) e atividade da mieloperoxidase (MPO; B) em camundongos submetidos à administração tópica concomitante de TPA (1 µg/orelha).	28
Figura 6 Efeito das frações hexânica (A),clorofórmica (B), acetato de etila (C) ou hidrometanólica(D) da entrecasca de <i>M. hostilis</i> ou da dexametasona (Dexa; 0,05 mg/orelha) sobre o edema em orelha de camundongos submetidos à administração tópica concomitante de TPA (1 µg/orelha).	30
Figura 7 Efeito das frações hexânica (A), clorofórmica (B), acetato de etila (C) ou hidrometanólica (D) da entrecasca de <i>Mimosa hostilis</i> ou da dexametasona (Dexa; 0,05 mg/orelha) sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) em orelha de camundongos submetidos à administração tópica concomitante de TPA (1 µg/orelha).....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH	Dicloreto de 2,2'-azobis (2-amidino-propano)
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANOVA	Análise de variância
CAT	Catalase
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CE	Concentração efetiva em 50%
COX	Ciclo-oxigenases
DPPH	Radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazila
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EHE	Extrato Hidroetanólico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de Nitrogênio
ELAM-1	Molécula-1 de adesão de leucócitos endotelial
FT	Fenóis totais
FAE	Fração Acetato de Etila
FCL	Fração Clorofórmica
FHM	Fração Hidrometanólica
FHX	Fração Hexânica
FeCl ₃	Cloreto férrico
FeSO ₄	Sulfato ferroso
GSH	Glutaciona reduzida
GSH-Px	Glutaciona peroxidase
GSSG	Glutaciona oxidada
GSH-Rd	Glutaciona redutase
HCL	Ácido clorídrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
•OH	Radical hidroxila
HO ₂	Radical Hidroperoxila
HTAB	Hexadeciltrimetilamônio
IAA	Índice de atividade antioxidante

ICAM	Moléculas de adesão intercelular
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
LAFAPI	Laboratório de Farmacologia do Processo inflamatório
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LOX	Lipo-oxigenases
MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NOS	Óxido nítrico sintase
NO	Óxido nítrico
OH	Hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Ânion radical superóxido
PECAM	Molécula de adesão de célula endotelial e plaqueta
PG	Prostaglandinas
PI	Potencial de inibição
SOD	Superóxido dismutase
-SS	Pontes de dissulfetos
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substância reativa do ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-acetato
TNF	Fator de necrose tumoral
VCAM-1	Molécula-1 de adesão celular vascular

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu forças e coragem para concretizar mais essa etapa.

A minha mãe Ana Rita e meu padrasto Pacheco pela paciência, compreensão e apoio incondicional.

A Universidade Federal de Sergipe e ao programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas.

Ao Laboratório de Farmacologia do Processo Inflamatório (LAFAPI).

Ao Professor Dr. Charles dos Santos Estevam pela orientação, ensinamentos e compreensão diante das minhas dificuldades.

Ao Professor Dr. Enilton Aparecido Camargo pela orientação, atenção e todos os ensinamentos durante toda essa trajetória.

A Professora Andrea pelo apoio e orientação na conclusão do meu trabalho.

A Capes por fornecer a Bolsa de estudo.

A todos os alunos do Laboratório de Bioquímica e Química de Produtos Naturais (LBQPN).

A todos o meu muito obrigado!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Plantas medicinais	4
2.2 Radicais livres e Defesas antioxidantes.....	5
2.3 Inflamação.....	9
2.4 <i>Mimosa hostilis</i> Benth	12
3 OBJETIVOS.....	14
3.1 Objetivo geral	14
3.2 Objetivos específicos.....	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Coleta, identificação e processamento do material vegetal.....	15
4.2 Preparação do extrato e frações.....	15
4.3 Prospecção fitoquímica	15
4.3.1 Teste para taninos e fenóis	16
4.3.2 Testes para antocianinas, antocianidinas, flavonas, xantonas, chalconas, auronas e flavanonas.....	16
4.3.3 Teste para catequinas.....	16
4.3.4 Teste para saponinas.....	16
4.3.5 Teste para esteróides e triterpenoides.....	17
4.4 Quantificação de fenóis totais	17
4.5 Atividade antioxidante	17
4.5.1 Método do DPPH	17
4.5.2 Medida da lipoperoxidação (TBARS).....	18
4.6 Atividade anti-inflamatória	19
4.6.1 Obtenção e manutenção dos animais	19
4.6.2 Edema de orelha em camundongos	20

4.6.3 Ensaio de atividade da MPO.....	20
4.7 Análise estatística	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1 Prospecção fitoquímica.....	22
5.2 Quantificação de fenóis totais (FT).....	23
5.3 Atividade sequestradora de radical livre DPPH.....	24
5.4 Medida de lipoperoxidação(TBARS).....	26
5.5 Efeito do EHE da <i>M. hostilis</i> sobre o edema de orelha de camundongos ...	27
5.6 Efeito das frações de <i>M. hostilis</i> no edema de orelha de camundongos.....	29
5.7 Efeito das frações de <i>M. hostilis</i> na atividade de MPO em orelha de camundongos.....	32
6 CONCLUSÃO	35
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais para tratamento e cura de enfermidades é uma prática muito antiga, representando muitas vezes o único recurso terapêutico de várias comunidades e grupos étnicos e, por isso, tem despertado interesse entre diversas áreas de pesquisa como a botânica, farmacologia e fitoquímica com a finalidade de suprir cientificamente o uso popular. Associado a isso, existe uma enorme responsabilidade social para prevenir ou pelo menos conter o uso indiscriminado de plantas medicinais pela população já que os efeitos terapêuticos das plantas dependem da composição química qualitativa e quantitativa.

No Brasil, atualmente, o mercado de medicamentos a base de plantas medicinais, ou seja, fitoterápicos, vem crescendo bastante (LOURENZANI; BATALHA, 2004). Aproximadamente 25% dos fármacos utilizados em países industrializados é proveniente de produtos naturais principalmente de plantas superiores (NEWMAN; CRAGG, 2007) e, apesar de cerca de 100 mil compostos já terem sido isolados, as plantas representam uma fonte quase que inesgotável para o fornecimento de novas moléculas bioativas.

As principais classes de constituintes químicos encontrados em plantas medicinais capazes de prevenir vários tipos de doenças são os compostos terpenoides, os compostos nitrogenados e os compostos fenólicos, estes últimos, vêm sendo amplamente estudados por sua ação antioxidante. Por serem compostos bastante diversificados, são normalmente agrupados em subclasses por analogia de suas estruturas químicas e, por isso, podem exercer papéis diferentes na atividade redox protetora, tanto por neutralização ou por sequestro dos radicais livres como na quelatação de metais de transição, em etapas de iniciação, propagação e terminação das reações oxidativas. Segundo Atoui *et al.* (2005), muitas evidências relacionam os radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo processo de envelhecimento, doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune, disfunções cerebrais e inflamações.

Os radicais livres derivados do metabolismo do oxigênio e nitrogênio são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) respectivamente e podem ser formados naturalmente durante o

metabolismo celular. Porém o organismo humano em condições fisiológicas normais consegue neutraliza-los através de sistemas de defesa antioxidante. No entanto, sabe-se que o desequilíbrio entre a formação de radicais livres e ação dos mecanismos de defesa resultam em estresse oxidativo, fazendo com que essas moléculas reajam com estruturas celulares causando efeito deletério e danos à saúde. Dentre eles, a manutenção de processos inflamatórios presentes na fisiopatologia de várias doenças como aterosclerose e câncer.

A inflamação é uma resposta imunológica não específica que pode ser causada por um agente infeccioso, isquemia, injúrias ocasionando lesão tecidual associada aos danos causados pelos radicais livres, formados principalmente a partir dos neutrófilos na presença da enzima mieloperoxidase (MPO) durante a fase tardia do processo inflamatório. A liberação de ERO e de ERN no local da lesão pode desempenhar um importante papel na modulação da resposta inflamatória como por exemplo, estimulando a liberação de citocinas, moléculas de adesão e agentes quimiotáticos, contribuindo ainda mais para manutenção da inflamação. Entretanto, plantas contendo em sua composição taninos, flavonoides e terpenos tem sido bastante utilizadas, nas diversas formas de preparo, com possível atividade anti-inflamatória. Segundo Mutoh *et al.* (2000) e Raso *et al.* (2001), alguns flavonoides como quercetina e apigenina tem efeito inibidor das NOS e COX-2, essa última desempenhando um papel fundamental na liberação de mediadores pró-inflamatórios como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos através da via do ácido araquidônico.

O nordeste do Brasil possui uma das vegetações mais ricas em propriedades medicinais que vem sendo explorada cientificamente com o objetivo de comprovar sua eficácia terapêutica. Associado a isso, existe a preocupação com o uso indiscriminado dessas plantas como forma de tratamento de doenças, uma vez que alguns compostos existentes podem causar efeitos colaterais indesejáveis como diarreia, vômito, problemas hepáticos e renais. Por outro lado também existe uma grande procura pelo desenvolvimento de novos fármacos mais seletivos e eficazes e, a investigação da composição química das plantas bem como sua atividade biológica, é uma dos principais objetivos dentro de diversos grupos de pesquisas.

Nesse sentido, espécies vegetais da *Mimosa* sp estão sendo muito exploradas devido às suas propriedades antimicrobianas, antifúngicas, cicatrizantes, anti-inflamatória, esta última ainda pouco explorada. Maia (2004) cita que a espécie

Mimosa hostilis conhecida popularmente por Jurema preta, uma arbórea típica das áreas do semi-árido brasileiro, é muito utilizada por tribos indígenas para fins terapêuticos principalmente em queimaduras e inflamações. Entretanto, o conhecimento científico comprobatório ainda não foi relatado bem como sua ação antioxidante e anti-inflamatória. Assim, estudar essas ações biológicas e o possível composto ou *pool* de compostos que possam ser responsáveis por elas, se torna uma etapa preliminar essencial não só para a geração de conhecimento científico acerca da espécie como também para o desenvolvimento de fármacos a partir da descoberta de estruturas químicas passíveis de aprimoramento sintético.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas medicinais

As plantas medicinais sempre foram utilizadas pela população de forma empírica para tratar vários tipos de doenças, e por isso têm despertado o interesse científico por parte de pesquisadores, com a finalidade de se descobrir novas moléculas potencialmente úteis no desenvolvimento de novos fármacos. Entretanto, pesquisas mostram que o uso empírico pode ocasionar danos à saúde pelo fato de que algumas dessas plantas conterem substâncias potencialmente perigosas sendo, portanto, necessários estudos no sentido de identificar seus constituintes químicos e respectivas ações farmacológicas (VEIGAS Jr; PINTO; MACIEL, 2005). No entanto, diante das dificuldades de acesso de fármacos alopáticos e da facilidade e tradição de uso, as plantas medicinais continuam sendo bastante utilizadas em países subdesenvolvidos, muitas vezes se tornando o único recurso terapêutico disponível. De acordo com Foglio *et al.* (2006), o Brasil tem a maior biodiversidade do planeta constituindo um excelente campo para o desenvolvimento de estudos com plantas usadas popularmente e, mesmo com o crescente aumento das pesquisas com espécies de origem vegetal os estudos ainda não são suficientes. O Brasil possui cerca de 100 mil espécies, no entanto, menos de 1% foram estudadas para fins medicinais. No Amazonas por exemplo, encontra-se 25 mil espécies de diferentes plantas sendo que suas propriedades farmacológicas ainda são pouco conhecidas pela comunidade científica (CITES, 2006).

Na década de 1990, um levantamento feito pela Organização Mundial de Saúde (OMS), verificou-se que 65 a 80% da população de países em desenvolvimento eram dependentes do uso de plantas para tratamentos de doenças e cuidados básicos de saúde (BUENO *et al.*, 2005; VEIGAS JR; PINTO; MACIEL, 2005). No Brasil, o aumento de produtos utilizados a base de plantas medicinais tem crescido de forma significativa e são vendidos em feiras livres, mercados e principalmente em regiões mais pobres do país (AMOROZO, 2002; MARCHESE *et al.*, 2004). O consumo normalmente é feito como chás, tinturas, óleo, xarope e pó sem qualquer tipo de controle trazendo possíveis efeitos colaterais pelo uso indevido, aumentando assim a importância em pesquisas com vegetais com

propósito de validar a terapêutica desses produtos (CASTRO, 2006; FERREIRA, 1993; VEIGA JR; PINTO; MACIEL, 2005). A OMS classifica plantas medicinais como todo e qualquer vegetal que possui em um ou mais órgãos substâncias que poderão ser usadas para fins terapêuticos, chamadas princípios ativos e de grande importância nos estudos com vegetais (DI STASI, 1996).

2.2 Radicais livres e defesas antioxidantes

Nos últimos anos muitas pesquisas têm direcionado seu interesse em investigar o papel dos radicais livres no envelhecimento e em diversas doenças crônicas degenerativas como câncer, aterosclerose e inflamação. De acordo com Halliwell e Gutteridge (2000), um radical livre é qualquer espécie capaz de existência independente e que contém um ou mais elétrons não pareados em sua última camada eletrônica. Alguns desses radicais livres derivados do oxigênio são chamados de espécies reativas de oxigênio (ERO) e outros advindos do metabolismo do nitrogênio são classificados como espécies reativas de nitrogênio (ERN). Essas espécies reativas são formadas durante o metabolismo aeróbio quando o O₂ molecular é reduzido aceitando quatro elétrons dando origem a formação de água. No entanto, durante essas reações também são formados diversas espécies reativas como radical ânion superóxido (O₂⁻), hidroperoxila (HO₂[·]), radical hidroxila (•OH) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) respectivamente conforme mostrado na (Figura 1). As reações de oxiredução ocorrem na tentativa de estabilização dos radicais livres e acontecem em cadeia com consequente danos nas estruturas e componentes celulares alterando suas funções (VALKO *et al.*, 2007). Entretanto, algumas moléculas derivadas de reações radicalares podem não apresentar elétrons desemparelhados, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio, porém possuem alta instabilidade e por consequência se tornam bastante reativos, com tempo de meia vida bastante curto (RIBEIRO *et al.*, 2005).

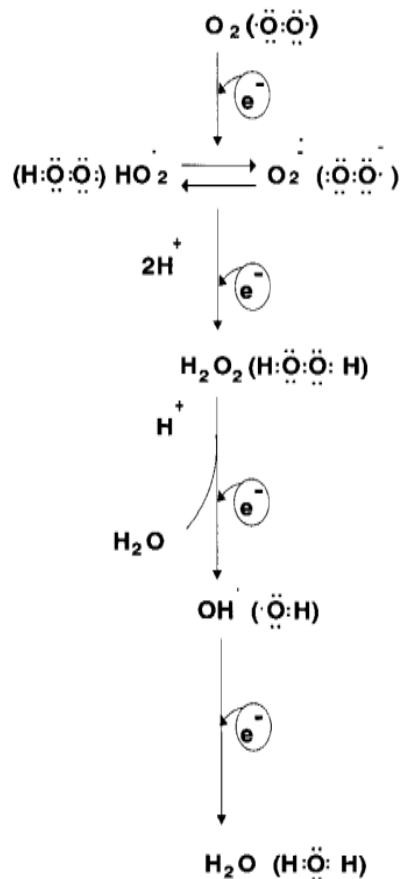


Figura 1 Redução tetraivalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O). Várias espécies reativas de O_2 são formadas no processo. Fonte: Ferreira e Matsubara (1997).

O radical superóxido é formado quando ocorre a primeira redução do O_2 . Isso acontece na maioria das células aeróbicas sendo produzidos durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). No entanto, pode ser considerado pouco reativo em soluções aquosas, porém, têm sido observadas lesões biológicas secundárias em sistemas geradores de O_2^- . seja enzimático, fagocítico ou químico. Em meio aquoso, a principal reação é a dismutação produzindo uma molécula de peróxido de hidrogênio e outra de oxigênio. Apesar de apresentar efeito deletério o radical superóxido O_2^- . tem papel importante em algumas células do sistema imune protegendo-o contra infecções por vírus, fungos e bactérias.

O radical hidroperoxila está representado como a forma protonada do radical superóxido. Algumas evidências mostram que o hidroperoxila pode ser mais reativo que o superóxido, pela sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas (VALKO *et al.*, 2007).

O radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) é considerado o mais reativo entre as ERO tendo poder de oxidar qualquer molécula biológica. As vias principais que levam a formação desse radical são pela reação com o peróxido de hidrogênio e quando ocorre a combinação extremamente rápida com metais de transição e outros radicais no próprio local onde foi produzido tornando sua reatividade ainda mais alta (RIBEIRO *et al.*, 2005; VALKO *et al.*, 2007). Portanto, quando ocorre a produção do radical hidroxila próximo ao DNA e ao mesmo tempo fixada a um metal, podem ocorrer algumas alterações de bases purínicas e pirimidínicas, podendo levar à inativação ou mutação do DNA. Além disso, a ($\bullet\text{OH}$) pode inativar várias proteínas e enzimas pela redução dos grupos sulfidrilas a pontes dissulfetos (-SS), e também reduzir ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares processo conhecido como lipoperoxidação ou peroxidação lipídica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986).

Teoricamente, o peróxido de hidrogênio não pode ser considerado um radical livre devido à ausência de elétrons desemparelhados na sua última camada eletrônica, no entanto, por ser um metabólito do oxigênio considera-se extremamente deletério, pois participa da reação que dá origem ao radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$). Além disso, apesar de ser uma molécula mais estável que a hidroxila, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tem vida longa e grande capacidade de ultrapassar a camada lipídica, permitindo reagir com alvos biológicos através de reações enzimáticas como também em locais distantes de sua formação.

Vários estudos sobre estresse oxidativo em animais experimentais têm demonstrado a ocorrência de lesões oxidativas em biomoléculas (JENKINS, 2000). Segundo Valko *et al.* (2007), o prejuízo causado pelos radicais livres como o estresse oxidativo ocorre quando há formação exacerbada dessas espécies impedindo assim que o sistema de defesa antioxidante consiga neutralizá-las ou seja, quando ocorre um desequilíbrio entre formação desses moléculas em relação as defesas antioxidantes (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Além disso, também podem ser geradas em várias patologias e estímulos externos como exercício físico, ingestão de medicamentos, oxidação do LDL colesterol, isquemias e inflamações (VALKO *et al.*, 2007). Por outro lado, segundo Roberts e Sindhu (2009), a baixa formação dessas espécies tem papel importante para o metabolismo celular tornando-se indispensável em alguns processos bioquímicos e fisiológicos como sinalização celular, apoptose, resposta imunológica, diferenciação celular entre outros.

Com relação aos ataques oxidativos, nosso organismo dispõe de alguns mecanismos de defesa antioxidante classificados como de prevenção, que atuam detoxificando o agente antes de causar lesão, e de reparação que atuam após a lesão ocorrida e que podem ainda, ser divididos em enzimáticos e não enzimáticos (RIBEIRO *et al.*, 2005; VALKO *et al.*, 2007).

O termo antioxidante é bastante antigo e se referia a todos os inibidores de processos oxidativos. Porém nos dias atuais, qualquer inibidor de radicais livres pode ser considerado antioxidante (DENISOV, 2005). De acordo com Bianchi e Antunes (1999), os antioxidantes são substâncias que mesmo produzidos em baixa concentração podem inibir as taxas de oxidação.

No mecanismo de prevenção, há a participação das enzimas superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona-peroxidase (GSH-Px) e da glutaciona-redutase (GSH-Rd) bem como dos compostos ácido ascórbico e glutaciona reduzida (GSH).

A SOD está presente nas células humanas em três isoformas: citosólica, extracelular ambas contendo zinco e cobre como também a mitocondrial constituída por manganês. Através da reação de dismutação essa enzima remove o radical superóxido levando a formação de peróxido de hidrogênio e posteriormente em hidroxila. A catalase é uma hemoproteína dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) presente no citoplasma das células como também em alguns dos principais órgãos como o fígado e em algumas células como os eritrócitos que são responsáveis pela catálise da conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (HALLIWELL; GUTTERRIDGE, 1999).

A GSH-Px é responsável por catalisar a degradação de hidroperóxidos, pela GSH, formando assim a glutaciona oxidada (GSSG) e água, reação que depende da redução de GSSG pela GSH-Rd. Existem dois tipos de GSH-Px, uma localizada principalmente na matriz mitocondrial dependente de selênio como co-fator e outra independente de selênio encontrada apenas no citosol que metaboliza somente hidroperóxidos orgânicos.

A GSH-Rd é uma flavoproteína dependente de NADPH (HEBBEL, 1986). Portanto, quando ocorre redução da disponibilidade de NADPH pode haver prejuízo na ação dessa enzima (GILBERT; MC LEAN, 1990). A GSH-Rd participa da recuperação da GSH quando ela é oxidada por qualquer agente oxidante, para que seja mantido o sistema de proteção celular preservado.

Os antioxidantes não enzimáticos mais conhecidos são o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol (vitamina E), a GSH e os compostos fenólicos. Porém, os mais conhecidos são a GSH, que age como oxidante na presença do grupo sulfidril produzindo GSSG e o ácido ascórbico (vitamina C) que participa da hidroxilação de várias reações bioquímicas das células além de ser facilmente encontrado nos alimentos de origem vegetal como frutas e legumes. Além disso, pode ter ações tanto antioxidantes como pró-oxidantes como na reação de fenton participando da redução dos íons férrico para o estado ferroso (DENISOV, 2005).

A ação antioxidante dos compostos fenólicos está bem estabelecida, apesar de poder exercer ação pró-oxidante a depender de determinados fatores tais como o potencial de redução de metal, pH e das características de solubilidade (DECKER, 1997). Os flavonoides, maior classe de fenólicos vegetais, agem como aceptores dos radicais livres (HUSAIN; CILLARD; CILLARD, 1987; YUTING *et al.*, 1990) e servem para a alimentação humana bem como os ácidos fenólicos e os polifenóis (ANGELIS, 2001).

2.3 Inflamação

A Inflamação é um processo que envolve vários eventos que podem ser ocasionados por numerosos estímulos. Dentre estes estão agentes infecciosos, isquemia/reperfusão, traumas e lesões químicas, térmicas ou mecânicas. A resposta inflamatória aguda pode ocorrer em três fases distintas mediadas por diferentes mecanismos como: vasodilatação local, aumento da permeabilidade vascular e migração leucocitária. Além disso, se mantido o quadro inflamatório por longo período pode ocorrer ainda uma fase crônica, no qual ocorre lesão tecidual e fibrose (ROTELLI *et al.*, 2003).

A vasodilatação arteriolar característica do quadro inflamatório agudo acontece no primeiro momento, causada por mediadores inflamatórios, como a prostaglandina (PG) E₂, sendo considerada a primeira fase. Na segunda fase acontece liberação de mediadores que aumentam a permeabilidade vascular e extravasamento de plasma, dando origem ao edema, característico desta fase da inflamação (BIGNOLD; LYKKE, 1975). E por fim, ocorre aumento da expressão de moléculas de adesão com consequente migração de leucócitos para o local inflamado, que contribuem com mediadores que intensificam o processo inflamatório e levam ao aparecimento da dor inflamatória, em ação conjunta com outros

mediadores formados pelas células residentes teciduais (LEY, 2003). Assim, com a ocorrência de lesão tecidual algumas células são direcionadas para o local específico da lesão como: neutrófilos, macrófagos, mastócitos monócitos e eosinófilos sendo de fundamental importância na modulação do processo inflamatório por liberar diversas substâncias reguladoras da fase aguda como as citocinas: interleucina -1(IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF-alfa) (AKIRA *et al.*, 1990).

Os neutrófilos são os primeiros a migrarem principalmente nas vinte e quatro horas iniciais e tem papel fundamental na defesa do hospedeiro e resolução do quadro inflamatório (ALVES-FILHO; SPILLER; CUNHA, 2010). Esses neutrófilos agem como primeira linha de defesa contra microrganismos invasores através da fagocitose, além de produzirem várias substâncias como espécies reativas de oxigênio. Estas células contem várias enzimas em seus grânulos azurófilos, a exemplo da mieloperoxidase (MPO) e, uma vez ativadas no tecido inflamado, pode ocorrer o processo de desgranulação. A MPO pode facilitar a formação espécies reativas de oxigênio a partir, por exemplo, do peróxido de hidrogênio, assim contribuindo para o estresse oxidativo e manutenção tanto da inflamação como de diversos processos patológicos (ROMAN; WENDLAN; POLANCZYK, 2007).

Os macrófagos são células com grande importância na resposta imune e na fisiopatologia da inflamação promovendo a fagocitose de microrganismos como também a liberação de mediadores do processo inflamatório, dentre eles a IL-1 β , TNF-alfa, como também o óxido nítrico (NO) (CAVAILLON, 1994; NEWMAN; HENSON; HENSON, 1982). Além disso, tanto a IL-1 e o TNF-alfa podem ativar células endoteliais produzindo selectinas, que dão início ao processo de adesão dos leucócitos ao endotélio (ADAMS, 1996; ALBELDAS; BUCK, 1990).

Os mastócitos são células do sistema imune, residentes no tecido, que possuem em sua composição estrutural grânulos. Estas células, quando ativada, sofrem desgranulação acompanhada pela liberação de mediadores pró-inflamatórios como a histamina, serotonina, leucotrienos e citocinas (AMIN, 2012). Muitas destas substâncias causam vasodilatação e dessa forma, facilitam a migração de outras células, como os neutrófilos (THEOHARIDES *et al.*, 2012).

Os monócitos são células mononucleares, considerados precursores dos macrófagos. Sua participação no quadro inflamatório depende da presença da proteína quimiotática para monócitos (MCP-1) uma proteína importante na

expressão de moléculas de adesão, sendo que sua produção é gradativa justificando assim a lenta migração dos macrófagos (YAMASHIRO; KAMOHARA; YASHIMURA, 1999).

Já os eosinófilos estão presentes em respostas alérgicas, situação na qual sua migração é estimulada por citocinas específicas, como IL-5 e eotaxina, dentre outras. Estes leucócitos causam a liberação de mediadores inflamatórios, tendo importância na fisiopatologia e terapêutica de processos inflamatórios importantes, como o envolvido na asma (GLEICH, 1990).

A quimiotaxia (migração de leucócitos) é desencadeada no sentido de solucionar o quadro inflamatório e ocorre em fases sequenciais: (i) marginação, (ii) rolamento, (iii) adesão firme ao endotélio, e (iv) transmigração ou diapedese. Este processo inicia-se nas veias pós-capilares, onde ocorre redução do fluxo sanguíneo, permitindo a ligação do leucócito ao endotélio. De maneira geral, o processo de quimiotaxia é regulado pela ação de quimiocinas e outras citocinas, que medeiam primeiramente o rolamento dos leucócitos no endotélio, mediado por selectinas, como a P-, E- ou L-selectina. Após este processo, ocorre a adesão firme do leucócito ao endotélio mediada por integrinas, como a molécula-1 de adesão intercelular (ICAM) ou a molécula-1 de adesão celular vascular (VCAM), e a travessia do leucócito pela barreira endotelial (transmigração), mediada, por exemplo, pela molécula de adesão de célula endotelial e plaqueta [PECAM-1] (HYNES, 2012; PETRI, 2006).

É interessante ressaltar que o óxido nítrico (NO) é um mediador importante neste processo. O NO é historicamente conhecido por ser um gás que possui ação vasodilatadora e é sintetizado por meio de três isoformas: óxido nítrico sintase induzível (iNOS), endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS). Essas enzimas são expressas em diferentes tipos de células e conseqüentemente tem ações biológicas distintas (IALENTI *et al.*, 1992). Estudos tem demonstrado a ação anti-inflamatória de baixas concentrações de NO geralmente associadas à produção basal via eNOS, que causa diminuição da quimiotaxia pela redução da expressão de moléculas de adesão, como as selectinas (AHLUWALIA *et al.*, 2004). Porém, o NO também possui ações pró-inflamatórias, principalmente associadas a condições nas quais ocorre alta produção deste mediador. Por exemplo, a iNOS pode ser expressa em macrófagos e neutrófilos após ser induzida por um estímulo inflamatório, como IL-1 e TNF-alfa e, assim, desempenha papel importante na indução de lesão, não

apenas para o patógeno, mas também para as células do tecido (ESPLUGUES, 2002; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; MURAD, 1986).

Vários estudos já foram realizados com plantas medicinais demonstrando atividade anti-inflamatória. Alguns constituintes encontrados nas plantas podem ser os responsáveis por essas propriedades como flavonóides, taninos, triterpenos entre outros. Estudo utilizando extrato alcoólico proveniente das folhas de *Garcinia gardneriana* apresentou atividade anti-inflamatória redução do edema induzido por carragenina no modelo experimental de edema de pata (CASTARDO *et al.*, 2008).

O extrato metanólico das folhas de *Mallotus peltatus* também se mostrou efetivo na inibição do edema induzido por dextran em ratos em modelo de inflamação aguda (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2002). Em outro estudo utilizando modelo de inflamação crônica o extrato etanólico da casca de *Syzygium cumini* apresentou atividade anti-inflamatória em ratos induzidos por peletes de algodão (MURUGANANDAN *et al.*, 2001). Utilizando extrato aquoso da casca do caule de *Tabebuia avellanedae* demonstrou efeito anti-inflamatório na inibição do edema de orelha induzido por ácido araquidônico (BYEON *et al.*, 2008).

2.4 *Mimosa hostilis* Benth

A *Mimosa hostilis* conhecida popularmente como Jurema preta é pertencente à família Leguminosae–subfamília Mimosoideae em que se inclui mais de 400 espécies de ervas e arbustos, típica da caatinga, ocorrendo praticamente em quase todo nordeste brasileiro, principalmente nos estados de Pernambuco, Ceará, Sergipe e Bahia. Em alguns países como México e Venezuela, o gênero *Mimosa* também é bastante conhecida (CAMARGO, 2000). No México, por exemplo, no ano de 1984 o pó da casca da *Mimosa* foi utilizado empiricamente no alívio do sofrimento de vítimas de uma explosão de gás natural facilitando a regeneração da pele e recuperação de queimaduras nesses pacientes, aumentando a atenção sobre essa fonte natural com objetivo de verificar a presença de compostos bioativos (LOZOYA *et al.*, 1989).

Algumas partes da planta como a casca e as folhas da *M. hostilis* são muito utilizadas na medicina popular principalmente no tratamento de queimaduras, acne e outros problemas de pele (MAIA, 2004), além de apresentar efeitos antimicrobiano, analgésico, regenerador de células e adstringente peitoral. Em alguns rituais religiosos de grupos indígenas, uma bebida preparada da casca conhecida como

(ajucá) é tradicionalmente utilizada sendo relatado alguns efeitos psicoativos atribuído a presença do alcaloide N, N Dimetiltriptamina. No ano de 1990, estudos fitoquímicos e farmacológicos mostraram que existem compostos naturais bioativos com propriedades cicatrizante e antimicrobiana contra vários grupos de microrganismos (LOZOYA *et al.*, 1998). Alguns grupos de compostos já foram encontrados e vem sendo estudados e publicados com sua conhecida atividade biológica, dando destaque à espécie no sentido de avançar no conhecimento químico e farmacológico. Rivera-Arce *et al.* (2007) relataram que dentre estes compostos, pode-se citar principalmente os taninos (proantocianidinas) e os alcaloides indólicos.

Alguns estudos utilizando o gênero *Mimosa* demonstraram propriedades farmacológicas importantes. Estudo com extrato etanólico extraído da casca da *Mimosa tenuiflora* mostrou ser ativo contra as bactérias *Micrococcus luteus* e *Bacillus subtilis* (HEINRICH *et al.*, 1992). De acordo com Meckes-Lozoya, Lozoya e Gonzales (1990) compostos como taninos e flavonóides encontrados no extrato acetato de etila de *Mimosa tenuiflora*, mostraram ser responsáveis pela atividade antimicrobiana da planta. No mesmo trabalho também foram isolados alcaloides indólicos, 5-hidroxitriptamina (Serotonina) e N,N-Dimetiltriptamina.

O mesmo extrato, em outro estudo, mostrou ser efetivo contra *Cândida albicans* (LOZOYA *et al.*, 1989). Foi também demonstrado a efetividade do tratamento tópico do pó da *Mimosa tenuiflora* no eczema e nas inflamações em humanos (TELLEZ; DUPOY de GUITARD, 1990). Em estudo semelhante utilizando o pó da casca da *M. tenuiflora* foi demonstrado efeito sobre a cicatrização como também sobre doença ulcerativa de perna (RIVERA-ARCE *et al.*, 2007). Experimentos utilizando spray da casca da *Mimosa* mostrou a inibição do peristaltismo intestinal devido ao relaxamento dos músculos liso tecidual em ratos (MECKES-LOZOYA; LOZOYA; GONZALES, 1990).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antioxidante e anti-inflamatório do extrato hidroetanólico e frações obtidas da entrecasca da *Mimosa hostilis*.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a prospecção fitoquímica do extrato e frações obtidas da entrecasca de *M. hostilis*;
- Quantificar a concentração de fenóis totais do extrato e frações obtidas da entrecasca de *M. hostilis*;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato e das frações obtidas da entrecasca de *M. hostilis*;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato e das frações obtidas da entrecasca de da *M. hostilis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta, identificação e processamento do material vegetal

A entrecasca da espécie em estudo foram coletadas em 23 de abril de 2008, no município de Piranhas, Estado de Alagoas, Lago do Xingó (09° 37' 25"S 37°45' 24" O), conduzida ao Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioquímica pertencente ao Departamento de Fisiologia/ Universidade Federal de Sergipe (UFS), onde foram colocada em estufa (modelo MA-037) a 37°C, com renovação e circulação de ar por 48h até completa desidratação. Após, foram reduzidas a pó utilizando-se um moinho de facas e armazenada até o momento das análises.

Um espécime foi identificado botanicamente pela Dr^a Ana Paula do Nascimento Prata no Departamento de Biologia da UFS e devidamente registrado no herbário da mesma com o número ASE 13166.

4.2 Preparação do extrato e frações

A entrecasca seca (4,828 kg) foi submetida à extração com etanol a 90% por 5 dias, por maceração exaustiva. Após este período, o material foi filtrado e concentrado em rota-evaporador sob pressão reduzida a uma temperatura de 50 °C, obtendo-se o extrato hidroetanólico (EHE) com rendimento de 1%. Parte deste extrato foi dissolvido em metanol a 40% e submetido a extração líquido-líquido (partição) com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila (3x300mL, para cada) consecutivamente, obtendo as frações hexânica (FHX), clorofórmica (FCL), acetato de etila (FAE) e hidrometanólica (FHM), as quais foram submetidas à prospecção fitoquímica, quantificação de fenóis totais, atividade antioxidante e atividade anti-inflamatória *in vivo*.

4.3 Prospecção fitoquímica

Para a determinação das classes dos compostos químicos foram aplicados métodos e reações químicas clássicas, descritas a seguir, que resultaram no desenvolvimento de coloração e ou precipitação característicos de acordo com metodologia descrita por Matos (2009). Para todos os ensaios realizados com solução do extrato ou frações, a concentração utilizada foi de 1 mg.mL⁻¹ de metanol.

4.3.1 Teste para taninos e fenóis

Em um tubo de ensaio, foram adicionados 3 mL da solução do extrato ou frações e 3 gotas de solução alcoólica de FeCl₃ 1%. Agitou-se e comparou-se ao branco (metanol e solução alcoólica de FeCl₃ 1%). A mudança de coloração ou formação de precipitado foi indicativo de resultado positivo.

4.3.2 Testes para antocianinas, antocianidinas, flavonas, xantonas, chalconas, auronas e flavanonas

Em três tubos de ensaio, foram adicionados 4 mL da solução do extrato ou frações. O primeiro tubo foi acidificado até pH 3.0, o segundo alcalinizado até pH 8.5 e o terceiro até pH 11.0. A identificação foi feita conforme o aparecimento da coloração descrita a seguir.

Testes	pH = 3.0	pH = 8.5	pH = 11.0
Antocianinas/Antocianidinas	Vermelho	Lilás	azul-púrpura
Flavonas/Flavonóis/Xantonas	-	-	Amarela
Chalconas/Auronas	Vermelho	-	vermelho-púrpura
Flavanonas	-	-	vermelho-alaranjado

4.3.3 Teste para catequinas

Em um tubo de ensaio foram adicionados 4 mL de solução do extrato ou frações. Acidificou-se até pH 3.0, aqueceu-se com auxílio de uma lâmpada de álcool durante 2-3 minutos e observou-se a formação de coloração amarelada, indicativo de catequinas.

4.3.4 Teste para saponinas

Em um tubo de ensaio com tampa, foram adicionados 5 mL de solução do extrato ou frações e 1mL de etanol 80% (v/v). Dilui-se até 15 mL com água destilada e agitou-se vigorosamente. A persistência da espuma formada, por no mínimo 30 minutos, foi considerada indicativo de saponina.

4.3.5 Teste para esteroides e triterpenoides

O extrato ou frações (5 mg) foram dissolvidos em 3 mL de clorofórmio e filtrados. Após, adicionou-se 2 mL de anidrido acético, agitou-se suavemente e adicionou-se pelas paredes do tubo, 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. O aparecimento de uma sucessão de cores formando anéis foi considerado resultado positivo para esteroides livres (azul e verde persistente) e triterpenoides (laranja e vermelho persistente).

4.4 Quantificação de fenóis totais

Para a determinação do teor de fenóis totais (FT) foi utilizado o reagente Folin-Ciocalteu, de acordo com a metodologia de Sousa *et al.* (2007) modificada. Uma alíquota de (100 μ L) do EHE e frações em concentração (1 mg/ ml de metanol) foi transferida para um tubo falcon juntamente com 6 mL de água destilada e 500 μ L do reagente Folin-Ciocalteu¹ N, sendo agitada por 1 minuto. Depois da adição de 2 mL de Na₂CO₃ 15%, a mistura foi agitada por 30 segundos. A solução foi então diluída com água destilada para um volume final de 10 mL, incubada por 120 minutos a 23 °C e a absorbância das amostras foi lida por espectrofotômetro bioespectro UV-VIS, modelo SP22, em comprimento de onda de 750 nm contra o branco, utilizando-se cubetas de quartzo. O teor de FT foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração utilizando-se como padrão ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico (AG) por g de extrato ou fração. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.5 Atividade antioxidante

4.5.1 Método do DPPH

O EHE e as frações FHX, FCL, FAE e FHM foram solubilizadas em metanol para obtenção de uma solução estoque de 0,5 mg.mL⁻¹, e alíquotas foram retiradas e adicionadas a uma solução de DPPH[•] 40 μ g.mL⁻¹ para obtenção das concentrações finais de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 μ g.mL⁻¹ chegando ao volume de 3 mL. O controle negativo e o controle positivo foram feitos por meio do mesmo

procedimento, porém utilizando-se metanol e DPPH e ácido gálico e DPPH, respectivamente.

A curva de calibração do DPPH[•] foi construída tendo como base os valores de absorvância a 515 nm, medida em espectrofotômetro de bioespectro UV-VIS, modelo SP22, obtidos com todas as soluções medidas em cubetas de quartzo. As medidas de absorvância foram realizadas em tempo de 1, 5 e 10 min e depois a cada 10 min até completar 60 min. Com a equação da curva de calibração e com os valores de absorvância, no tempo de 60 minutos para cada concentração testada, foi determinada a porcentagem de DPPH remanescente (%DPPH_{REM}), calculada de acordo com Brand-Willams *et al.* (1995) a partir da equação:

$$\%DPPH_{REM} = [DPPH]_T / [DPPH]_{T0} \times 100,$$

em que $[DPPH]_T$ é a concentração do radical no meio reacional após a reação com a amostra e $[DPPH]_{T0}$ a concentração inicial de DPPH.

A concentração efetiva de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial do radical DPPH em 50% (CE₅₀) foi calculada usando a %DPPH_{REM} no tempo de 60 minutos, em oposição às concentrações das amostras. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1} \pm$ desvio padrão.

As absorvâncias medidas na concentração de 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ L e no tempo de 60 minutos foram transformadas em percentual de inibição (PI).

A atividade antioxidante foi expressa também pelo índice de atividade antioxidante (IAA), calculado de acordo com Scherer e Godoy (2009) com base na equação:

$$IAA = \text{DPPH estoque } (\mu\text{g.mL}^{-1}) / \text{CE}_{50} (\mu\text{g.mL}^{-1}).$$

Sendo a atividade antioxidante considerada fraca quando o valor da IAA é inferior a 0,5, moderada quando o IAA é entre 0,5 e 1,0, forte quando o IAA é entre 1,0 e 2,0 e muito forte quando o valor da IAA é superior a 2,0.

4.5.2 Medida da lipoperoxidação (TBARS)

A capacidade do extrato e frações de inibir a peroxidação lipídica foi determinada por meio do monitoramento da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em meio rico em lipídios, de acordo com o protocolo

descrito por Silva *et al.* (2007). A quantificação de TBARS foi realizada conforme o protocolo de Lapenna *et al.* (2001).

Inicialmente foi obtida uma solução lipídica (1% v/v) a partir da homogeneização de gema de ovo em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4) no sonicador (10s na potência 4) e misturada com soluções recém preparadas do EHE, frações e controle na concentração de 200 µg.mL⁻¹. A peroxidação lipídica foi induzida com a adição de 0,1 mL de solução de AAPH [dicloreto de 2,2-azobis-(2-amidinopropano) 0,17 M] e solução de FeSO₄ [sulfato ferroso 0,17 M] em diferentes momentos. Foi utilizado como controle positivo o Trolox e como controle negativo metanol, ambos substituindo o extrato. As reações foram executadas por 30 minutos à temperatura de 37°C. Depois de atingir a temperatura ambiente, as amostras (0,5 mL) foram centrifugadas na presença de 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 15% a 1200 rpm por 10 minutos. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi misturada com 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% e aquecida até 95 °C por 60 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, as absorbâncias foram medidas utilizando um espectrofotômetro de bioespectro UV-VIS, modelo SP22, em comprimento de onda de 532 nm. Os resultados foram obtidos por triplicatas e expressos em percentual de inibição da formação de malondialdeído (MDA).

4.6 Atividade anti-inflamatória

4.6.1 Obtenção e manutenção dos animais

Os testes foram realizados utilizando camundongos da linhagem Swiss (20-30 g), machos, oriundos do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. Os protocolos experimentais foram realizados no Laboratório de Farmacologia do Processo Inflamatório (LAFAPI) e aprovados no Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFS com protocolo de N° 52/12.

Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (30cm de comprimento, 19cm de largura e 13cm de altura) e grades metálicas apropriadas, em pequenos grupos (não excedendo 10 animais por gaiola). A temperatura do local foi de 21 ± 2°C. A iluminação foi artificial, com uma alternância de 12 horas de luz e 12 horas de obscuridade. Os animais tiveram livre acesso a alimentação (ração específica) e água. Foram identificados de forma inequívoca e aclimatados às condições do biotério durante pelo menos dois dias.

Ao final dos experimentos, as carcaças dos animais foram acondicionadas em sacos plásticos e guardadas em freezer reservado para este fim até o descarte definitivo conforme a rotina do Departamento de Fisiologia, pelo serviço de coleta seletiva de lixo biológico da UFS.

4.6.2 Edema de orelha em camundongos

O edema de orelha foi induzido por 12-O-tetradecanoilforbol-acetato (TPA) em camundongos, de acordo com os estudos prévios de De Young *et al.* (1989), Otuki *et al.* (2005) e Boller *et al.* (2010). Os animais foram anestesiados com isoflurano (1-3%) pela via inalatória com o uso de um vaporizador calibrado. Em seguida, foram tratados topicamente na orelha direita com o EHE da *M. hostilis* (0,3, 1 ou 3 mg/orelha), FHX, FCL, FAE ou FHM (1,0 ou 3,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,05 mg/orelha; controle negativo) e veículo (acetona, 20 µL/orelha). Cada uma dessas substâncias foram administradas topicamente ao mesmo tempo que o estímulo inflamatório utilizado (TPA, 1 µg/orelha). Na orelha esquerda de cada animal foram administrados topicamente 20 µL de acetona e cada animal serviu como seu controle para a medida de edema. A eutanásia foi realizada por excesso de isoflurano inalatório (5%) 6 h após a indução da inflamação. Após os sítios das orelhas terem sido recortados circularmente com 8 mm de diâmetro, foi feita a medida da massa dos sítios. Os valores de edema foram expressos em variação (mg) da massa da orelha direita e da massa da orelha esquerda (orelha direita - orelha esquerda).

4.6.3 Ensaio de atividade da MPO

O recrutamento de neutrófilos foi indiretamente investigado pela dosagem da atividade da MPO. Esta medida foi realizada nas mesmas orelhas utilizadas para as medidas anteriores. Amostras da orelha dos animais provenientes do experimento anterior foram coletadas, pesadas, cortadas em pedaços pequenos e mantidas em tubos teste na presença de tampão fosfato (50 mM, pH 6,0 contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio [HTAB]). As amostras foram homogeneizadas e alíquotas do homogenato centrifugadas. Os sobrenadantes obtidos foram submetidos à análise da atividade de MPO, conforme descrito a seguir.

Em placa de 96 poços, os sobrenadantes foram adicionados à solução de di-hidroclorato de *o*-dianisidina (0,167 mg/mL, preparada em tampão fosfato de

potássio 50 mM contendo 0,005% de H₂O₂). As alterações nos valores de absorbância a 460 nm tiveram o registro a cada 15 s durante um período de 5 min e os resultados foram expressos como unidades de MPO (UMPO/mg de tecido), considerando-se 1 UMPO como a quantidade de enzima que degrada 1 μmol de H₂O₂ à 25 °C, gerando variação de absorbância de 0,0113 unidades de absorbância, conforme previamente descrito por Bradley *et al.* (1982).

4.7 Análise estatística

Os resultados das análises *in vitro* de composição química e atividade sequestradora do radical livre DPPH foram expressos como média ± desvio padrão (D.P.). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Tukey. Os resultados das análises *in vivo* foram apresentados como média ± erro padrão da média (E. P. M.), com os dados avaliados por ANOVA de uma via, seguido do teste de Dunnett. Todos os testes foram realizados através do programa GraphPad Prism 5.0 e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Prospecção fitoquímica

A triagem fitoquímica permite um conhecimento preliminar dos compostos químicos existentes no extrato e frações, facilitando assim um posterior isolamento e caracterização de substâncias presentes no extrato. Assim, foi observado a presença de compostos fenólicos como flavonoides, taninos, xantonas, esteroides e triterpenoides apenas no EHE e nas frações FAE e FHM (Tabela 1)

Tabela 1 Prospecção fitoquímica do extrato hidroetanólico (EHE) e das frações hexânica (FHX), clorofórmica (FCL), acetato de etila (FAE), e hidrometanólica (FHM) da entrecasca de *M. hostilis*.

COMPONENTES	EHE	FHX	FCL	FAE	FHM
FENÓIS	+	-	-	+	+
TANINOS	+	-	-	+	+
FLAVONOIDES	+	-	-	+	+
XANTONAS	+	-	-	+	+
CATEQUINAS	-	-	-	-	-
TRITERPENOIDES PENTACÍCLICOS E ESTERÓIDES LIVRES	+	+	+	+	+
SAPONINAS	-	-	-	+	+

Alguns constituintes químicos encontrados como fenóis, taninos, esteroides e triterpenoides também foram observados em outras espécies do gênero *Mimosa*. Entre os fenólicos, já foi detectada a presença de flavonas C-glicosiladas, flavonas O-glicosiladas e taninos (SUKANYA *et al.*, 2009). Segundo Meckes-Lozoya, Lozoya e Gonzales (1990), estudando as propriedades farmacológicas de *Mimosa tenuiflora* demonstraram ser esses compostos os responsáveis pela ação antimicrobiana, antifúngica e contra vírus e protozoários. Outro estudo conduzido pelos mesmos

autores demonstrou que a abundância de taninos e flavonóides encontrados na casca da *Mimosa tenuiflora*, eram os principais responsáveis por sua atividade antimicrobiana. Esses resultados corroboram com o perfil fitoquímico encontrado na espécie estudada no presente trabalho em que foi encontrado taninos e flavonóides. Algumas espécies estudadas do gênero *Mimosa* que são utilizadas na medicina popular mostraram ser fontes de vários compostos químicos de relevância farmacológica como alcaloides, terpenoides, flavonoides e carotenoides (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2008). A presença de flavonoides e terpenoides também foi encontrada no teste fitoquímica no presente estudo, corroborando assim com estudos anteriores. Estudo realizado por Vepsalainen *et al.* (2005) foi feita análise fitoquímica, ressonância magnética nuclear e Cromatografia líquida de alta eficiência e verificou-se a presença de um novo fitoindólico isolado da casca do caule da *M. tenuiflora*. Enquanto que em outro estudo foi demonstrado a presença de duas chalconas :2',4'-dihydroxi- 3',4 dimetoxichalcona 2',4',4-trihydroxi-3'-metoxichalcona (CAMARGO-RICALDE, 2000). Dentre muitas substâncias três esteróides foram isolados a partir do caule da *M. tenuiflora*: campesterol-3-O-beta-D-glucopiranosil (ANTON *et al.*, 1993). Três saponinas também já foram identificadas pelo mesmo autor. Corroborando com esse estudo nossos resultados também apresentaram presença de esteroides livres e saponinas na prospecção fitoquímica demonstrando um diversidade nos seus constituintes químicos.

5.2 Quantificação de fenóis totais (FT)

A Figura 2 mostra os valores médios dos fenóis totais obtidos no extrato e nas frações da entrecasca de *M. hostilis*. O EHE não apresentou diferença significativa em relação a fração FCL, porém apresentou diferença em relação as frações FAE, FHM e FHX. A FCL não diferiu estatisticamente da FHX porém diferiu-se das demais. O maior valor médio de fenóis foi observado na FAE seguida da FHM.

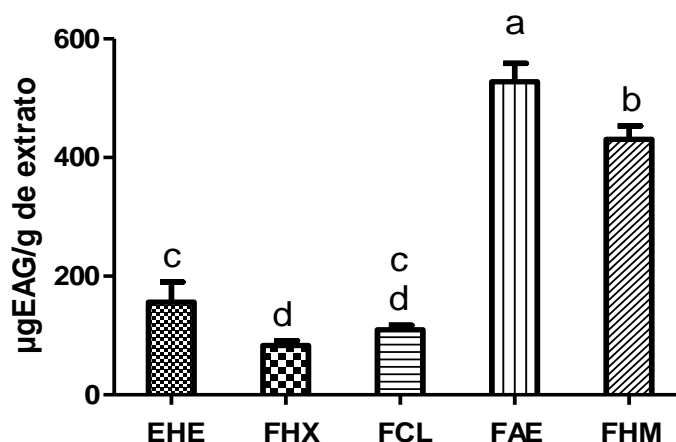


Figura 2 Teor de fenóis totais do extrato hidroetanólico (EHE) e das frações hexânica (FHX), clorofórmica (FCL), acetato de etila (FAE) e hidrometanólica (FHM) da entrecasca de *M. hostilis*. Letras iguais indicam semelhança entre os grupos (n = 3; ANOVA seguido pelo teste de Tukey, $p < 0,05$).

A maior concentração de fenólicos presentes nas frações FAE e FHM pode ser justificada pela polaridade do líquido extrator. Os compostos fenólicos poliidroxilados, por serem substâncias mais polares, têm maior afinidade por esses solventes, pois são capazes de se ligarem por pontes de hidrogênio ao extrator tornando-se solúveis neles. Este fato não acontece quando o solvente extrator é hexano ou clorofórmio, embora este último tenha polaridade, porém baixa. Entretanto, como observado, o EHE extraído por uma mistura hidroalcolólica, altamente polar, apresentou baixo teor de fenólicos que pode ser explicado pela diversidade química de compostos existentes que exercem uma interação competitiva pelos reagentes utilizados no ensaio (AINSWORTH; GILLESPIE, 2007).

5.3 Atividade sequestradora de radical livre DPPH

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos da atividade antioxidante para a captura do radical livre DPPH (1,1- difenil- 2-picril-hidrazila). O teste estatístico mostrou que para CE_{50} o EHE e as frações FAE e FHM foram mais efetivos e não diferiram entre si, mas diferiram significativamente das frações FHX e FCL. Os compostos fenólicos existentes atuam como sequestradores de radicais pela capacidade de doar hidrogênio ao elétron não emparelhado, produzindo radical

fenoxila que é estabilizado pela ressonância molecular do anel aromático presente em sua estrutura (PROCHÁZKOVÁ; BOUSOVÁ; IWILHELMOVÁ, 2011).

Tabela 2 Atividade antioxidante do extrato hidroetanólico (EHE) e das frações hexânica (FHX), clorofórmica (FCL), acetato de etila (FAE), e hidrometanólica (FHM) da entrecasca de *M. hostilis*. Letras iguais indicam semelhança entre os grupos (n = 3; ANOVA seguido pelo teste de Tukey, p < 0,05).

AMOSTRAS	CE ₅₀ (µg/mL) ¹	PI (%) ²	IAA ³
EHE	7,63±122 ^b	95,84	5,34
FHX	31,19±0,84 ^c	51,40	1,28
FCL	44,98±3,28 ^d	34,84	0,89
FAE	5,88±0,19 ^b	94,66	6,79
FHM	6,21±0,22 ^b	95,40	6,44
Ácido Gálico	1,05±0,20 ^a	92,06	38,09

¹Concentração efetiva ²Percentual de inibição da formação do radical livre. ³ Índice de atividade antioxidante.

O EHE e as frações FAE e FHM apresentaram o IAA maior que 2,0, portanto considerado muito forte. Segundo Scherer e Godoy (2009), o índice de atividade antioxidante IAA pode representar com maior exatidão a capacidade sequestradora do radical livre. O percentual de inibição (PI %) também mostrou que o EHE e as frações FAE e FHM foram mais efetivas em relação as frações FHX e FCL. Estes resultados parecem estar relacionados principalmente pela abundância de flavonóides e taninos presentes nessas frações como também sugerido por FABRI *et al.* (2011).

Em estudo conduzido por Pessuto *et al.* (2009) em que avaliou-se a atividade antioxidante pelo método de DPPH dos extratos e taninos condensados isolados das folhas da *Maytenus ilicifolia*, foi demonstrado que a FAE apresentou maior atividade antioxidante em comparação com o extrato bruto alcoólico devido ao maior conteúdo de polifenóis existente nessa fração. Porém, contrapondo em parte com esses resultados, nossos experimentos não mostraram diferença significativa entre a FAE e EHE o que pode ser explicado pela diferença química estrutural entre os compostos presentes neste experimento e naqueles realizados pelo referido autor. Souza *et al.* (2007) relatam que a composição e o grau de hidroxilação são fatores importantes para a atividade antioxidante dos polifenóis.

Estudos anteriores descrevem que os compostos fenólicos contribuem significativamente para a capacidade antioxidante das plantas medicinais (DJERIDANE *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2008; MELO *et al.*, 2010; MOURA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011; VAHER *et al.*, 2010).

5.4 Medida de lipoperoxidação(TBARS)

A medida de lipoperoxidação induzida por AAPH pode ser vista na Figura 3. Os resultados obtidos mostram que tanto o EHE como a fração FAE, tiveram um percentual de inibição de 96% e 95% respectivamente em relação ao controle positivo (TROLOX) enquanto as frações FHM, FCL e FHX, 44%, 40% e 6%.

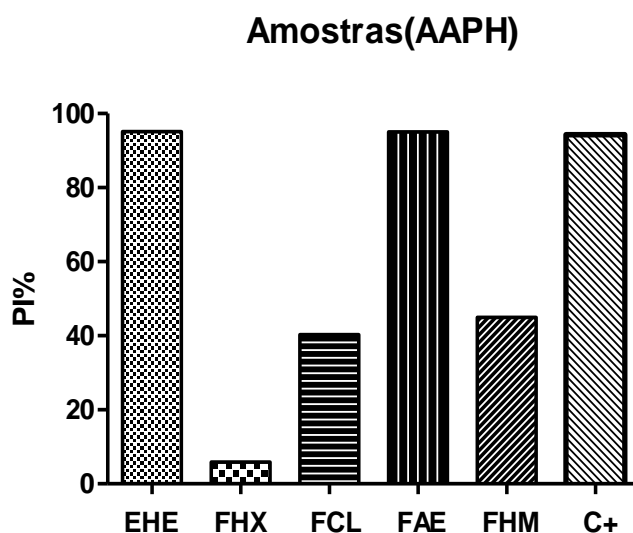


Figura 3 Efeito do extrato hidroetanólico (EHE) e das frações hexânica (FHX), clorofórmica (FCL), acetato de etila (FAE), e hidrometanólica (FHM) da entrecasca de *M. hostilis* na lipoperoxidação induzida por AAPH.

De forma diferente, quando o indutor é FeSO_4 não se observa o mesmo comportamento (Figura 4) pois PI (%) por EHE e FAE, mostrou valores em torno de 25%, inclusive menores do que a FHX indicada com menor PI (%) frente ao indutor APPH. A fração que demonstrou ser mais efetiva ao inibir a lipoperoxidação por FeSO_4 foi a FHM com PI (%) de 64% em relação ao controle.

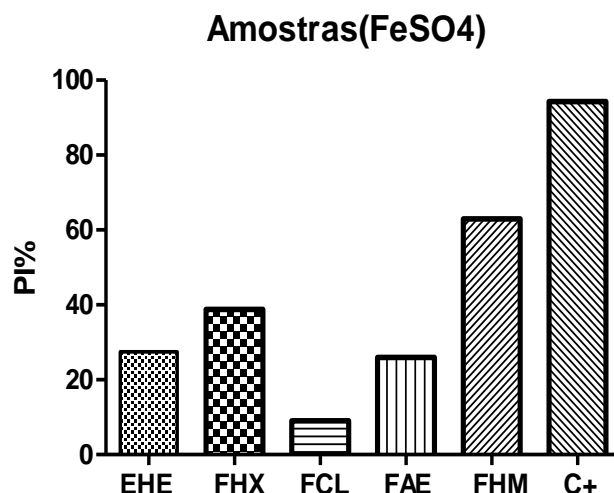


Figura 4 Efeito do extrato hidroetanólico (EHE) e das frações hexânica (FHX), clorofórmica (FCL), acetato de etila (FAE), e hidrometanólica (FHM) da entrecasca de *M. hostilis* na lipoperoxidação induzida por FeSO₄.

Sabe-se que o FeSO₄ ao reagir com o oxigênio, forma radical ânion superóxido, que, através da reação de Fenton, pode sofrer dismutação à peróxido de hidrogênio, originando o radical hidroxila (BARREIROS; DAVID, 2006), sendo esse o responsável por iniciar a lipoperoxidação (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Assim, esses resultados sugerem que os compostos presentes na FHM atuem predominantemente durante a fase de iniciação da peroxidação lipídica diferentemente da FAE e do EHE em que os compostos existentes atuam principalmente na fase de propagação. De acordo com Silva *et al.* (2006), o AAPH sofre decomposição à temperatura fisiológica na presença de oxigênio e ataca radicais peroxil, os quais abstraem hidrogênio a partir de lipídios peroxidáveis. Isso poderia explicar em parte as diferenças encontradas nos dois protocolos.

5.5 Efeito do EHE da *M. hostilis* sobre o edema de orelha de camundongos

O modelo utilizado para avaliação da atividade anti-inflamatória foi o de edema de orelha. Esse modelo permite avaliar a atividade de agentes anti-inflamatórios esteroidais ou não esteroidais administrados topicamente (SCHIANTARELLI *et al.*, 1982). O principal agente indutor da inflamação é o acetato de tetradecainolforbol (TPA), um composto ativo do óleo de cróton (SARAIVA *et al.*, 2010). Neste modelo, foram avaliados tanto o edema de orelha quanto a atividade

de MPO. A atividade de MPO pode ser utilizada como uma medida indireta do influxo de neutrófilos (BRADLEY *et al.*, 1982).

Os resultados obtidos para o EHE mostraram que este extrato exerce efeito anti-inflamatório, demonstrado pela redução significativa do edema e da atividade de MPO nas doses de 1,0 mg ou 3,0 mg/orelha (Figura 5).

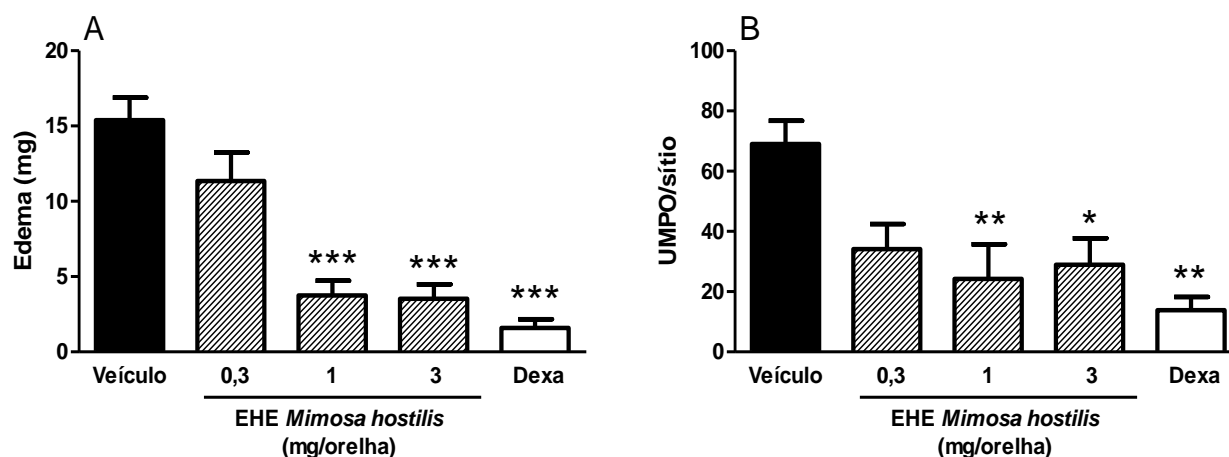


Figura 5 Efeito do extrato hidroetanólico (EHE) da entrecasca de *Mimosa hostilis* (0,3, 1, 3 mg/orelha) ou dexametasona (Dexa; 0,05 mg/orelha) sobre o edema de orelha (A) e atividade da mieloperoxidase (MPO; B) em camundongos submetidos à administração tópica concomitante de TPA (1 μ g/orelha). Os dados são mostrados como média \pm E.P.M. do edema (mg) ou MPO (UMPO/sítio) para n=6 animais. *p<0,05, **p<0,01 ou ***p<0,001 vs o respectivo veículo. ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett.

A prospecção fitoquímica indicou a presença de flavonóides, taninos, esteróides e triterpenos no EHE (Tabela 1). Esta composição química variada indica a presença de compostos que podem estar envolvidos na inibição do processo inflamatório. Segundo Meotti (2006) e Guimarães *et al.* (2010), os compostos inibidores de radicais livres, como os compostos fenólicos, estão envolvidos em diversos processos patológicos e fisiológicos, incluindo a inflamação, devido às suas propriedade antioxidante e estrutura química. De fato, como observado na Tabela 2 e na Figura 4, o EHE foi considerado efetivo tanto no sequestro de radicais livres como na inibição da etapa de iniciação radicalar.

Vários estudos tem relacionado a atividade antioxidante e a atividade anti-inflamatória à atuação dos compostos fenólicos sobre os radicais livres. Por exemplo, um estudo feito com o polifenol resveratrol demonstrou inibição *in vitro* da

expressão gênica das enzimas COX-2 e NOS induzível (iNOS;) e das moléculas de adesão, como a molécula-1 de adesão intercelular (ICAM-1), molécula-1 de adesão de leucócitos endotelial (ELAM-1) e molécula-1 de adesão celular vascular (VCAM-1) (RAHMAN; BISWAS; KIRKHAM, 2006). Outros compostos também exercem estas ações. A COX-2 e a iNOS são responsáveis pela geração de prostaglandinas e NO, respectivamente, que são mediadores vasodilatadores e pró-inflamatórios (SERHAN; WARD; GILROY, 2010). Assim, pode-se especular que o EHE apresenta compostos bioativos capazes de exercer ação inibitória sobre essas enzimas e que, dessa forma, iniba a vasodilatação induzida por prostaglandinas e NO, exercendo atividade antiedematogênica. Além disso, a modulação negativa da expressão de moléculas de adesão seria a responsável pela redução da migração de leucócitos polimorfonucleares, como observado pela diminuição da atividade de MPO nas orelhas. Este efeito levaria a menor lesão tecidual, com menor liberação e ação de mediadores inflamatórios derivados destes leucócitos, o que também contribui para o efeito antiedematogênico. Entretanto, outros eventos causados pela ação antioxidante de compostos presentes no EHE também podem estar relacionados à menor formação local de mediadores na lesão induzida pelo TPA.

Algumas plantas tem se mostrado eficiente na redução da inflamação, como, por exemplo, a *Garcinia gardneriana*. O tratamento de camundongos com o extrato hidroalcoólico das folhas desta planta causou efeito anti-inflamatório sobre o edema de pata induzido por carregenina, o que foi atribuído à presença de biflavonoides, além de esteróides e triterpenos (CASTARDO *et al.*, 2008).

Da mesma forma, o extrato metanólico das folhas de *Mallotus peltatus*, nas doses de 50 mL/kg administrado por via oral, provocou redução significativa no edema de pata induzido por dextran em ratos, com percentual de inibição de 60%, semelhante à inibição provocada pela indometacina (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2002). No mesmo estudo, a análise química apresentou constituintes tais como flavonas, taninos, triterpenos e saponinas.

5.6 Efeito das frações de *M. hostilis* no edema de orelha de camundongos

Uma vez que o edema e a atividade de MPO foram reduzidos pelo EHE, foi considerado importante avaliar o efeito das frações deste extrato, para avançar no entendimento de quais compostos podem ser responsáveis pelo efeito observado com o extrato bruto. Isto pode ser explicado pelo fato do fracionamento com

diferentes solventes levar a extração de compostos de acordo com sua polaridade. Nestes experimentos foram escolhidas as doses de 1,0 e 3,0 mg/orelha, que foram as doses de EHE que causaram redução significativa da inflamação na orelha induzida por TPA.

A Figura 6 demonstra que as frações FHX, FCL, FAE e FHM apresentaram efeito antiedematogênico nas doses de 1,0 mg ou 3,0 mg/orelha reduzindo de forma significativa o edema em relação ao controle (veículo). Pode-se especular que de maneira geral a atividade antiedematogênica foi semelhante entre as frações. Na dose de 3,0 mg/orelha houve percentual de inibição de 78%, 71%, 75% e 65% para as frações FHX, FCL, FAE e FHM, respectivamente.

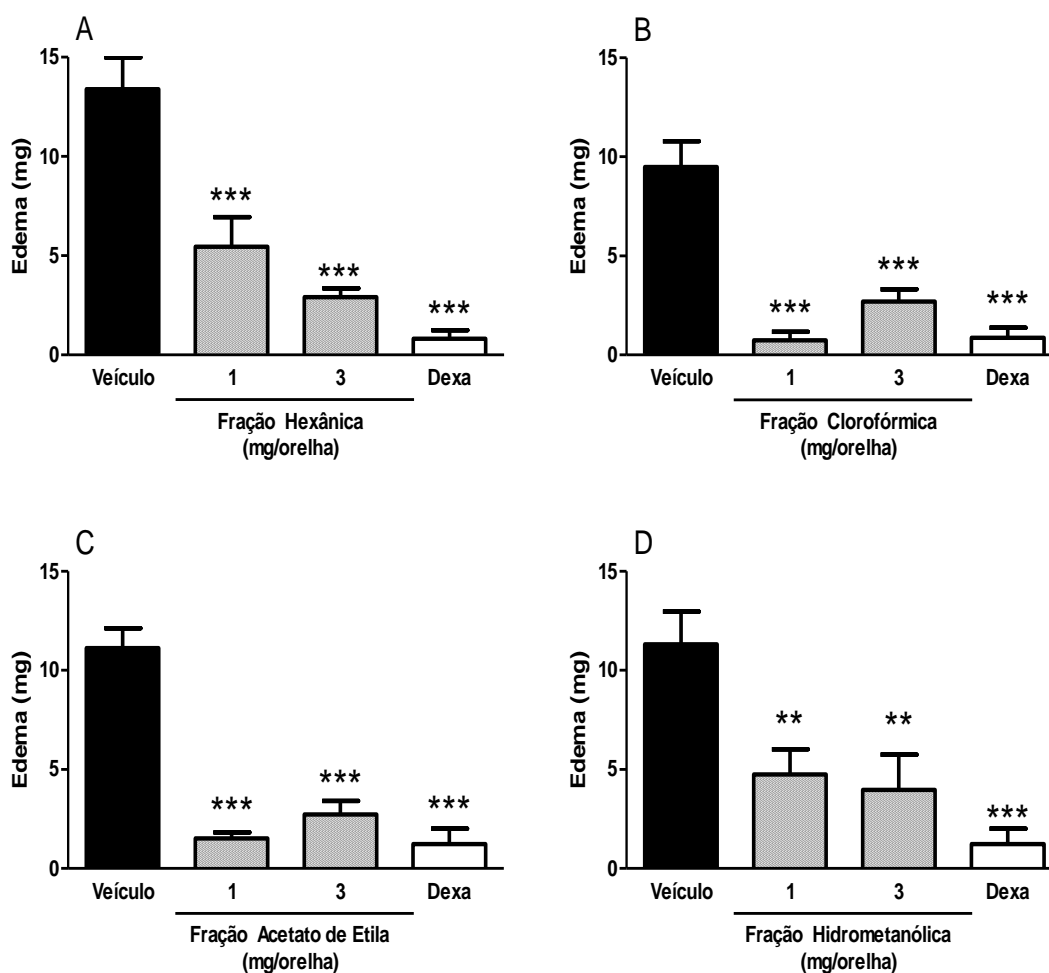


Figura 6 Efeito das frações hexânica (A), clorofórmica (B), acetato de etila (C) ou hidrometanólica (D) da entrecasca de *M. hostilis* ou da dexametasona (Dexa; 0,05 mg/orelha) sobre o edema em orelha de camundongos submetidos à administração tópica concomitante de TPA (1 µg/orelha). Os dados são mostrados como média ± E.P.M. do edema (mg) para n=6 animais. **p < 0,01 ou ***p < 0,001 vs o respectivo veículo. ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett.

No teste fitoquímico realizado no presente estudo, o EHE e as frações FAE e FHM mostraram a presença de taninos, flavonoides e fenóis totais. Esses constituintes exercem atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória (DI CARLO *et al.*, 1999). Alguns autores relatam que os flavonóides são eficazes no tratamento da inflamação e dor, relacionando sua ação à inibição de fosfolipase A₂, COX, LOX e iNOS, que reduz a liberação de mediadores inflamatórios formados pela via do ácido araquidônico (as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos), bem como de NO (VALÉRIO *et al.*, 2009). Vale salientar que compostos como taninos, flavonoides, esteroides e triterpenos já possuem atividade antioxidante reconhecida e foram detectados nas frações da *M. hostilis*, podendo contribuir para o efeito antiedematogênico das frações.

Na fração FAE foi encontrado um maior conteúdo de compostos fenólicos (Figura 2) justificando sua grande capacidade de reduzir o edema e consequentemente o processo inflamatório. Já a presença de triterpenos pentacíclicos nas frações FCL e FHX, justifica seu efeito sobre redução do edema, possivelmente atuando pelo sequestro dos radicais livres. Compostos terpênicos são conhecidos pela sua ação antioxidante e anti-inflamatória. Estudo realizado com carvacrol, um monoterpene, mostrou que ele pode impedir a formação de peroxinitrito e tem capacidade de sequestrar ERO e ERN além de induzir efeito anti-inflamatório em modelo de edema de pata ou pleurisia induzida por carragenina em camundongos (GUIMARÃES *et al.*, 2012). O linalol, outro monoterpene, demonstrou ação anti-inflamatória, anestésica local e antioxidante (PEANA *et al.*, 2006).

Análises fitoquímicas do gênero *Mimosa* tem demonstrado a presença fenóis, taninos, antocianidinas, antocianinas, flavonoides, flavanonas flavonóis, flavanonóis, xantonas, esteroides, triterpenoides, saponinas e alcaloides. Alguns desses compostos exercem atividade antimicrobiana, antiviral, anti-ulcerogênica, anti-hepatotóxica, hipolipidêmica, antineoplásica, e anti-inflamatória, esta última também pela inibição das enzimas envolvidas no processo inflamatório (MATOS, 1997). Segundo Furstenberger e Marks (1980) e Kondoh, Sato e Kanoh (1995), o mecanismo inflamatório envolvido na resposta do TPA envolve a ativação da fosfolipase A₂ que, em diferentes tecidos, promove a liberação dos diferentes mediadores inflamatórios envolvidos tanto na formação do edema como na quimiotaxia. Assim, os compostos presentes nas frações estudadas podem não só

atuar como antioxidantes, mas também como inibidores da formação dos mediadores inflamatórios derivados da cascata do ácido araquidônico.

5.7 Efeito das frações de *M. hostilis* na atividade de MPO em orelha de camundongos

A Figura 7 mostra que a FCL, FAE e FHM, mas não FHX, causaram redução significativa da atividade de MPO na orelha de camundongos que receberam administração concomitante de TPA.

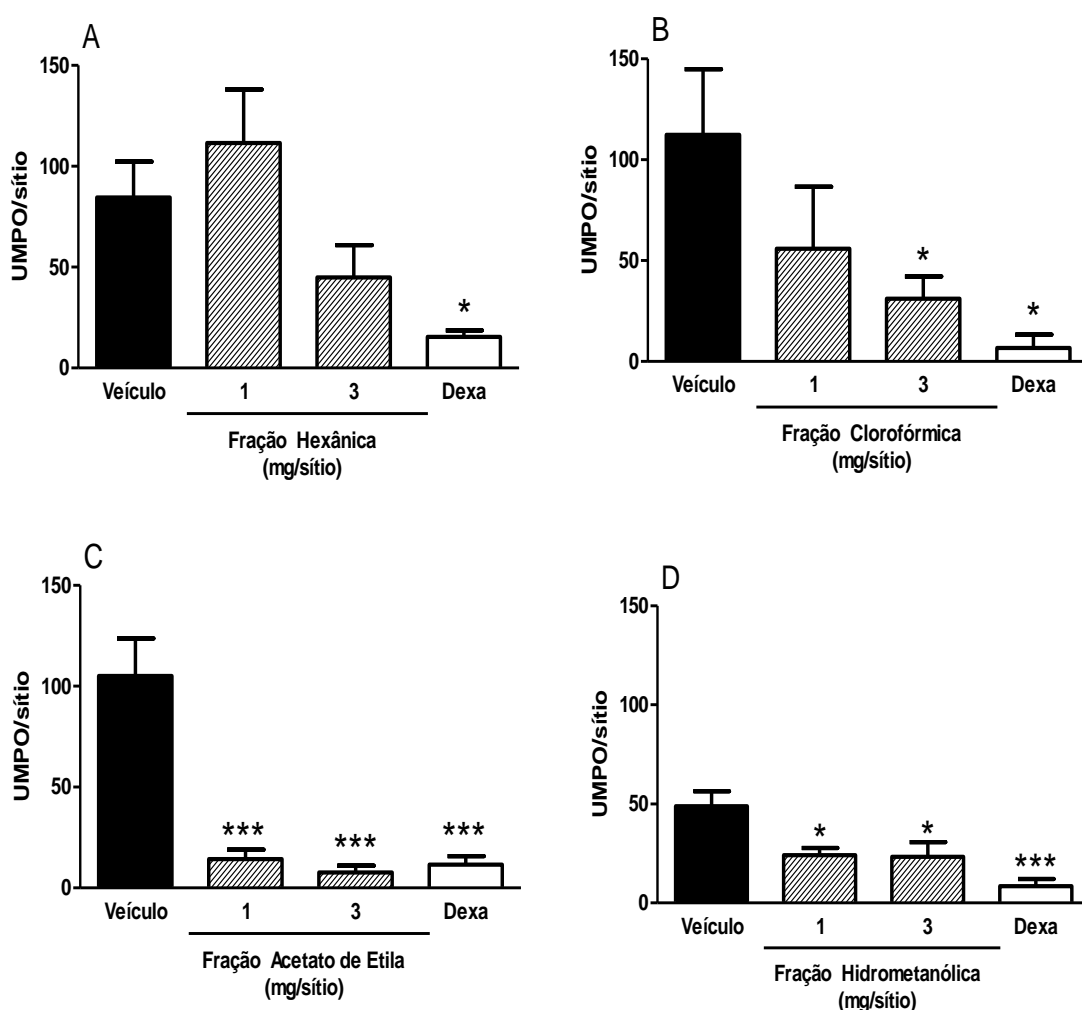


Figura 7 Efeito das frações hexânica (A), clorofórmica (B), acetato de etila (C) ou hidrometanólica (D) da entrecasca de *Mimosa hostilis* ou da dexametasona (Dexa; 0,05 mg/orelha) sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) em orelha de camundongos submetidos à administração tópica concomitante de TPA (1 µg/orelha). Os dados são mostrados como média ± E.P.M. da atividade de MPO (UMPO/site) para n=6 animais. *p<0,05 ou ***p<0,001 vs o respectivo veículo. ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett.

A fração que induziu maiores valores de percentual de inibição em relação ao veículo, foi a FAE, que causou aproximadamente 86% e 93% de inibição para as doses de 1,0 mg/orelha ou 3,0 mg/orelha respectivamente (Figura 7C). Por sua vez, a coadministração de FHM com o TPA causou inibição de aproximadamente 40% e 52% nas doses de 1,0 mg/orelha ou 3,0 mg/orelha respectivamente (Figura 7D). Para a FCL apenas a dose de 3,0 mg/orelha causou inibição significativa da atividade de MPO (aproximadamente 72%, Figura 7B). Observa-se ainda que a fração FHX não diminuiu a atividade de MPO induzida pelo TPA (Figura 7A).

Interações celulares entre neutrófilos e endotélio vascular são mediadas por conjuntos de moléculas de adesão e ativadores quimiotáticos para formar uma "cascata de adesão." Na fase inicial da migração de leucócitos, ocorre o rolamento dessas células em vénulas pós-capilares, sendo mediado por selectinas (SPERANDIO, 2006). Posteriormente, ocorre forte adesão de neutrófilos através da interação com as integrinas CD11/CD18(β_2) (HYNES, 2002). Finalmente, ocorre a transmigração leucocitária através do endotélio, mediada principalmente por molécula de adesão de célula endotelial e plaqueta (PECAM) e CD31 (MULLER, 2003). Todo este processo de quimiotaxia é regulado minuciosamente pela expressão das moléculas de adesão, que são formadas pela ação de vários mediadores quimiotáticos. Se as frações do extrato da *M. hostilis* induziram a redução da migração de neutrófilos causada pelo TPA na orelha dos camundongos, é possível que os compostos presentes nas mesmas interfiram na geração e/ou ação destes mediadores. É importante considerar que devido às características de solubilidade dos compostos fenólicos, estes devem estar presentes em maior proporção na FAE e na FHM. Dessa forma, o maior efeito inibitório sobre a atividade de MPO por estas frações poderia ser causado pela presença de compostos fenólicos. Estudos têm demonstrado que certos polifenóis podem bloquear os processos biosintéticos dos eicosanoides. Tais mecanismos de inibição exercidos pelos flavonoides sobre as enzimas COX e LOX estão sendo bastante pesquisados (NIJVELTD *et al.*, 2001), por seu papel fundamental na síntese de mediadores pró-inflamatórios. Alguns flavonoides como quercetina e apigenina possuem ação anti-inflamatória por causar inibição da COX-2 e de iNOS (MUTOH *et al.*, 2000; PEANA *et al.*, 2006; RASO *et al.*, 2001). De acordo com Friesenecker, Tsai e Intagliatta (1995), flavonoides como a quercetina e a luteolina têm a capacidade de reduzir a ativação do sistema complemento, e diminuir a adesão de células inflamatórias ao

endotélio, resultando em uma redução da resposta inflamatória. A identificação dos compostos fenólicos presentes no EHE ou frações ainda não foi realizada, entretanto, baseado no conhecimento da atividade anti-inflamatória dos compostos fenólicos, a exemplo dos supracitados, pode ser sugerido que estes compostos sejam os principais responsáveis pela modulação da resposta inflamatória, mais especificamente relacionada a migração de neutrófilos.

Várias plantas de outros gêneros e espécies tem mostrado uma correlação positiva entre a quantidade de fenóis encontrada e atividade anti-inflamatória. Segundo Rosa *et al.* (2010), muitos trabalhos tem demonstrado que alguns extratos vegetais reduzem o recrutamento de células polimorfonucleares para o tecido inflamado. Estudo *in vitro* feito com curcumarina, um pigmento fenólico de cor amarelada, mostrou que este composto modula a expressão gênica do fator de transcrição nuclear κ B(NF- κ B), das moléculas de adesão, como a (ICAM-1, ELAM-1, e VCAM-1) responsáveis pela migração de leucócitos (RAHMAN; BISWAS; KIRKHAM, 2006).

Assim, pode-se sugerir que a inibição do recrutamento de neutrófilos, medida pela atividade de MPO, das frações FAE e FHM está diretamente ligada à abundância de compostos fenólicos. Esses compostos bioativos podem estar envolvidos na inibição de algumas enzimas (COX e LOX) que dão origem a mediadores pró-inflamatórios como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos formados através do metabolismo do ácido araquidônico, reação iniciada pela fosfolipase A₂ (RAHMAN; BISWAS; KIRKHAM, 2006). Esses mediadores podem ativar moléculas de adesão, levando a quimiotaxia. Por isso, outro mecanismo sugerido para uma menor atividade da MPO seria a inibição das moléculas de adesão ICAM-1, ELAM-1 ou VCAM-1. Por sua vez, a ausência (ou presença em pequenas quantidades) de compostos fenólicos nas frações FHX e FCL estariam ligadas a menor inibição da migração de neutrófilos, mas não ao efeito antiedematogênico, que possivelmente poderia ser atribuído aos triterpenoides e esteroides livres.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram que o EHE da entrecasca da *Mimosa hostilis* e suas frações (FHX, FCL, FAE e FHM) possuem determinados grupos de compostos bioativos com atividade antioxidante e anti-inflamatória. Dessa forma, esta planta pode ser considerada importante na busca de novas moléculas bioativas para o tratamento do quadro inflamatório como também beneficiando na terapêutica e prevenção de várias doenças crônicas degenerativas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS DH, NASH GB - Disturbance of leucocyte circulation and adhesion to the endothelium as factors in circulatory pathology. **British Journal of Anaesthesia**, 77: 17-31, 1996.

AHLUWALIA A, FOSTER P, SCOTLAND RS, MCLEAN PG, MATHUR A, PERRETTI M, MONCADA S, HOBBS AJ Anti-inflammatory activity of soluble guanylate cyclase: cGMP dependent down-regulation of P-selectin expression and leukocyte recruitment **Proceedings of the National Academy of sciences USA** 101: 1386-1391, 2004.

AINSWORTH, E.A.; GILLESPIE, K.M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. **Nature Protocols**, v. 2, p. 875–877, 2007.

ALBELDA S.M, BUCK, C.A - Integrins and other cell adhesion molecules. **Faseb Journal**, 4:2868-2880.1990.

ALBUQUERQUE, U. P. AND CHIAPPETA, A. A. O uso de plantas e a concepção de doença e cura nos cultos afro-brasileiros. **Ciência e Trópico**, v. 22, p. 197-209, 1994.

ALVES- FILHO, J. C.; SPILLER, F.; CUNHA, F. Q. Neutrophil paralysis in sepsis. *Shock* (Augusta, Ga.), Suppl 1, v. 34, p. 15-21, set. 2010.

AMOROZO, M. C. de M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio de Leverger, MT, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v.16, n.2, p.1- 6, abr. 2002.

AMIN, K. The role of mast cells in allergic inflammation. **Respiratory Medicine**, v. 106, n. 1, p. 9-14, jan. 2012.

ANTON, R.; JIANG, Y.; WENIGER, B.; BECKER, J. P.; RIVIER, L. Pharmacognosy of *Mimosa tenuiflora* (Willd.)Poirot. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 38, p. 153-157, 1993.

ANGELIS, R.C. Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas. **São Paulo: Ed. Atheneu**, p. 295, 2001.

ARGOLO, A.C.C.; SANT'ANA, A.E.G.; PLETSCHE, M.; COELHO, L.C.B.B. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresource Technology**, v. 95, n. 2, p. 229-233, 2004.

ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S. e BEINER, R.P.C. Plantas Medicinais de Uso Caseiro– Conhecimento Popular e Interesse por Cultivo Comunitário. **Revista Espaço para Saúde**, v.6,n.2,p.1- 6, jun.2005.

AKIRA, S., ISSHIKI, H., SUGITA, T., TANABE, O., KINOSHITA, S., NISHIO, Y., NAKAJIMA, T., HIRANO, T. And KISHIMOTO T. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. **Embo Journal**. 9,1897-1906, .1990.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A; BOSKOU, G.; KEFALAS. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**.v 89, p. 27-36 2005.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BARBOSA-FILHO J.M.; ALENCAR, A.A, NUNES, X.P.; TOMAZ ACA, SENA-FILHO JG, ATHAYDE-FILHO P.F.; SILVA M.S; SOUZA MFV, DA-CUNHA EVL. Sources of alpha-,beta-,gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 135-154, 2008.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BIGNOLD, L.P.; LYKKE, A. W. Increased vascular permeability induced in synovialis of the rat by histamine, serotonin and bradykinin. **Experientia**, v. 31, n. 6, p. 413-420, ago. 1984.

BOLLER S. SOLDI C.; MARQUES,MC.; SANTOS E.P PIZZOLATTI MG.; OTUKI MF. Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated compounds from *Baccharis illinita* DC in acute skin inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**.,v. 130, n. 2, p. 262-6, 2010.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT DA, CHRISTENSEN RD, ROTHSTEIN G Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal Invest Dermatology**. v. 78, p. 206-9, 1982.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n.1, p. 25-30, 1995.

BYEON, S.E.; CHUNG, J.Y.; LEE, Y.G.; KIM, B.H.; KIM, K.H., CHO, J.Y. In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of taheebo, a water extract from inner bark of *Tabebuia avellanedae*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 145-152. 2008.

BUENO, N. R; CASTILHO, R. O; COSTA, R. B.; POTT, A.; POTT, V. J.; SHEIDT G. N.; BASTISTA M. S. Plantas medicinais usadas pelas populações indígenas kaiowá e Guarani na Reserva de Caarapó, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**., v. 19, n.1, p. 39-44, jan./mar. 2005.

CAMARGO-RICALDE, S. L. Descripción, distribución, anatomía, composición química y usos de *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae-Mimosoideae) en México. **Revista de Biología Tropical**, v. 48, p. 939-954, 2000.

CASTARDO, J.C.; PRUDENTE, A.S.; FERREIRA, J.; GUIMARÃES, C.L.; MONACHE, F.D.; CECHINEL-FILHO, V.; OTUKI, M.F.; CABRINI, D.A. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia*

gardneriana leaves in mouse paw 59 oedema. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 405-411, 2008.

CASTRO, D. L. L. **Aspectos toxicológicos das plantas medicinais utilizadas no Brasil: um enfoque qualitativo no Distrito Federal**. 2006. 63 f. Monografia (Especialização em Qualidade de Alimentos) – Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

CAVAILLON, J. M. Cytokines and macrophages. **Biomedicine & Pharmacotherapy**; V. 48, N. 10, P. 445-453, 1994.

CHATTOPADHYAY, D.; ARUNACHALAM, G.; MANDAL, A.B.; SUR, T.K.; MANDAL, S.C.; BHATTACHARYA, S.K. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotuspeltatus* leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p. 229-237, 2002.

CITES World - Official Newsletter of the Parties. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild. **Fauna and Flora**. n. 17, 2006.

CORBETT, C. E. **Farmacodinâmica**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1977.

CUNHA, F. Q.; VERRI JÚNIOR, W. A. Quercetin Reduces Inflammatory Pain: Inhibition of Oxidative Stress and Cytokine Production. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 11, p. 1975-1979, 2009.

DJERIDANE, A.; YOUSFI, M.; NADJEMI, B.; BOUTASSOUNA, D.; STOCKER, P.; VIDAL, N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 97, n. 4, p. 654-660, 2006.

DE YOUNG L.M. KHEIFETS, J.B.; BALLARON, S.J.; YOUNG, J.M. Edema and cell infiltration in the phobol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions**, v. 26, n. 3-4, p. 335-41, 1989.

DECKER, E. A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Review**, v. 55, p. 396-407, 1997.

DENISOV, E.T. Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology Boca Raton: **CRC.Taylor & Francis Group**, p. 981, 2005.

DIAS, A. S., 2012. **Perfil químico, atividade antioxidante e antibacteriana do extrato hidroetanólico e frações da entrecasca da *Abarema cochliacarpus* (GOMES)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2012

DI STASI, L. C. Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: **Unesp**, 1996.

DUKE, J. A. Handbook of Medicinal Herbs, **CRC Press**, INC., Florida, 2000.

ESPLUGUES, J. V. NO as a signaling molecule in the nervous system. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, n. 5, p. 1079-1095, mar. 2002.

FABRI RL, NOGUEIRA MS, MOREIRA JD, BOUZADA ML. Scio E. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds of Lippia species by bioautography. **Journal of Medicinal Food.**, v. 14, n. 7-8, p. 840-6, 2011.

FERREIRA, S.H. The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics. **Drugs**, v. 46, n. 1, p. 1-9, 1993.

FERREIRA A.L.A.; MATSUBARA, L.S.; Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 43 (1): p. 61-8, 1997.

FURSTENBERGER, G.; MARKS, F. Early prostaglandin E synthesis is an obligatory event in the induction of cell proliferation in mouse epidermis in vivo by phorbol ester TPA **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.92, p.749-56, 1980.

FOGLIO, M.A.;QUEIROGA, C.L SOUSA I.M.; RODRIGUES R.A. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Divisão de Fitoquímica**, CPQBA/UNICAMP. Campinas- SP. Disponível em: http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_04_7.pdf Acesso em: 29 jun. 2012.

FRISCHER H, AHMAD T. Consequences of erythrocyticgluta-thionereductase deficiency. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 109, p. 583-8, 1987.

FRIESENECKER, B.; TSAI, A. G.; INTAGLIETTA, M. Cellular basis of inflammation, edema and the activity of Daflon 500 mg. **international Journal of Microcirculation. Clinical and experimental**. v. 15, p. 17-21, 1995.

GUIMARÃES, A.G.;XAVIER, M.A.;SANTANA, M.T.;CAMARGO, E.A.;SANTOS, C.A;BRITO, F.A.;BARRETO, E.O.;CAVALCANTI, S.C.;ANTONIOLLI, A.R.;OLIVEIRA, R.C.QUINTANS, L.J. Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. Naunyn-Schmiedeberg's **Archives of Pharmacology**, v. 385, n. 3, p. 253–263, mar. 2012.

GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, G. F.; MELO, M. S.; CAVALCANTI, S. C. H.; ANTONIOLLI, A. R.; BONJARDIM, L. R.; SILVA, F. A.; SANTOS, J. P. A.; ROCHA, R. F.; MOREIRA, J. C. F.; ARAÚJO, A. A. S.; GELAIN, D. P.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 107, n. 6, p. 949-957, 2010.

GILBERT HF, MC LEAN VM. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Advance in Enzymology and related areas of Molecular Biology**, v. 63, p. 69-172, 1990.

GLEICH, G. J. The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 85, n. 2, p. 422-436, fev. 1990.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 246, p. 501-14, 1986.

HALLIWELL, B.; GUITTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. 3th.ed. New York: **Oxford Science Publications**, p. 936, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERRIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. **Oxyford University** press Inc New York, 3rd edition, 1999.

HEBBEL RP. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 107, p. 401-4, 1986.

HEINRICH, M.; KUHN, M.; WRIGHT, C. W.; RIMPLER, H; PHILLIPSON, J. D.; SCHANDELMAIER, A.; WARGURST, D. C., Parasitological and Microbiological Evaluation of Mixe Indian Medicinal Plants (Mexico). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, p. 81-85, 1992.

HUSAIN, S.R.; CILLARD, J.; CILLARD. P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2489-2491, 1987.

HYNES R.O Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. **Cell**, v. 110, n. 6, p. 673–687, set. 2002.

J. G. M.; ROCHA, J. B. T.; TOMÉ, A. R.; CAMPOS, A. R.; MENEZES, I. R. A. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp-pressed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 504-10, 2010.

JENKINS RR. Exercise and oxidative stress methodology: a critique. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, p. 670, 2000.

KATAN MB. Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, p. 771-785, 1997.

KATZUNG BG *Farmacologia: básica e clínica*. 6 ed., **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, p. 854, 1998.

KONDOH, H.; SATO, Y.; KANO, H. Arachidonic acid metabolism in cultured mouse keratinocytes. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.85, p.64-9, 1995.

LAPENNA, D.; CIOFANI, G.; PIERDOMENICO, S.D.; GIAMBERARDINO, M.A.; CjUCCURULLO, F. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. **Free Radical Biology Medicine**, v. 31, n. 3, p. 331-335, 2001.

LEY, K. The role of selectins on inflammation and disease. **Trends in molecular Medicine**, v. 9, n. 6, p. 263-268, jun. 2003.

LI, H. B.; WONG, C. C.; CHENG, K. W.; CHEN, F. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 3, p. 385-390, 2008.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 1998.

LOZOYA, X. Therapeutic effectiveness of a *Mimosa tenuiflora* cortex extract in venous leg ulceration treatment. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 523-28, 2007.

LOURENZANI A.E.B.S.; LOURENZANI, W.L.; BATALHA, M.O. Barreiras e oportunidades na comercialização de plantas medicinais provenientes da agricultura familiar. **Informa Economics**, v. 34, p. 15-25, 2004.

LOZOYA,X.; NAVARRO, V.; ARNASON, J. T. AND KOURANY, E. Experimental evaluation of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Tepeschohuite) I. screening of the antimicrobial properties of bark extracts. **Archivos de Investigación Medica**, v. 20, p. 87-93, 1989.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR., V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAIA, G.N. Caatinga - árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo, **Ed. D&Z**. p.237-246, 2004.

MARCHESE J. A.; BROETTO, F.; MING, L. C. Perfil dos consumidores de plantas medicinais e condimentares de do município de Pato branco (PR). **The journal Horticultura Brasileira.**, v. 22, n. 2, p. 332- 335, abr./ jun. 2004.

MATÉS, J.M.; GÓMEZ,C.P.;CASTRO,I.N. Antioxidants enzymes and their implication in pathophysiology. **Clinical biochemistry**, v. 32, n. 8, p. 595-603,1999.

MATOS, F.J.A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 3 ed. Fortaleza: **Ed. UFC**, p. 148, 2009.

MECKES-LOZOYA, M.; LOZOYA, X.; MARLES, R.; SOUCY-BREAU, C. And AVALOKITESVARASEN, A. J. N,N-Dimethyltryptamine alkaloid in *Mimosa tenuiflora* bark (Tepeschohuite). **Archivos de Investigación Medica**,v. 21, p. 175-177, 1990.

MECKES-LOZOYA M.;LOZOYA,X .GONZALEZ, J .Propriedades farmacológicas *in vitro* de alguns extractos de *Mimosa tenuiflora* (tepescouhite) **Archivos de Investigacion Medica**, v.21, p. 163-169, 1990.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E.Glutathione. **Review of Biochemistry**, v. 52, p. 711-60, 1983.

MELO, J. G.; ARAÚJO, T. A. S.; CASTRO, V. T. N. A.; CABRAL, D. L. V.; RODRIGUES, M. D.; NASCIMENTO, S. C; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Antiproliferative Activity, Antioxidant Capacity and Tannin Content in Plants of Semi-Arid Northeastern Brazil. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8534-8542, 2010.

MEOTTI, F. C. Análise dos mecanismos de ação antinociceptiva e anti-inflamatória do flavonóide miricitrina: estudos *in vivo e in vitro*. 2006 156 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

MOURA, A. C. S.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* LINN. (FABACEAE) por CLAE-IES-EM (tof) e avaliação da atividade anti-radicalar. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1136-1140, 2011.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, n. 2, P. 109-142, jun. 1991.

MURUGANANDAN, S.; SRINIVASAN, K.; CHANDRA, S.; TANDAN, S.K.; LAL, J., RAVIPRAKASHM V. Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* bark. **Fitoterapia**, v. 72, p. 369-375. 2001.

MURAD, F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 78, n. 1, p. 1-5, jul. 1986.

MUTOH, M.; TAKAHASHI M.; FUKUDA K.; KOMATSU H.; ENYA T.; MATSUSHIMA-HIBIYA Y.; MUTOH H.; SUGIMURA T.; WAKABAYASHI K. Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**. v. 91, p. 686-91, 2000.

MULLER.A.W, Leukocyte–endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. **Trends in immunology**,v.24, n.6, p. 326–333, jun. 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-77, 2007.

NEWMAN, S. L.; HENSON, P. M. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte-derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 156, n. 2, p. 430-442, 1 ago. 1982.

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

OLIVEIRA, M.R.; RODRIGUES, J.M.E.;CHIAVONE-FILHO, O., MEDEIROS, J.T.N. Estudo das condições de cultivo da Algaroba e Jurema preta e determinação do poder calorífico. **Revista de Ciência & Tecnologia**,v.14, p. 93-104, 1999.

O'REILLY JD.; MALLET AJ.; MCANLIS GT.; YOUNG IS.; HALLIWELL B.; SANDERS TA. & WISEMAN H. Consumption of flavonoids in onions and black tea lack of effect on flavonoids from *Stachyschrysantha* and *Stachys candida*. **Biological Pharmaceutical Bulletin** v. 23, p. 47-53, 2000.

OTUKI M.F. Topical anti-inflammatory effects of the ether extract from *Protium klainii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**. v. 507, n. 1-3, p. 253-9, 2005.

PANTHONG, A., NORKAEW, P., KANJANAPOTHI, D., TAESOTIKUL, T., ANANTACHOKE, N., REUTRAKUL, V. Antiinflammatory, analgesic and antipyretic activities of the extract of gamboges from *Garcinia hanburyi* Hook f. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 335-340, 2007.

PESSUTO, M. B.; COSTA, I. C.; SOUZA, A.B.; NICOLI, F. M.; MELLO, J. C. P. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. **Quimica Nova**, Vol. 32, No. 2, 412-416, 2009.

PEANA, A.T.; DE MONTIS, MG.; SENCHI, S.; SIRCANA, G.; D'AQUILA, P. S;PIPIA, P. Effects of (-)-linalool in the acute hyperalgesia induced by carrageenan, L-glutamate and prostaglandin E2. **European Journal of Pharmacology**, v.497, n.3, p.279-84, 2004.

PETRI B, BIXEL MG: Molecular events during leukocyte diapedesis. **FEBS JOURNAL**, 273:4399, 2006.

PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **Journal of natural products**, v. 63, p.1035-1042, 2000.

PINTO, S. A. H.; PINTO, L. M. S.; GUEDESA, M. A.; CUNHAA, G. M. A.; CHAVES, M. H.; SANTOSA, F. A.; RAOA, V. S. Antinoceptive effect of triterpenoid a,b-amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 630–634, 2008.

PROCHÁZKOVÁ, D.;BOUSOVÁ, IWILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, p. 513-523, 2011.

RAHMAN I.; BISWAS S.K.; KIRKHAM P.A. Regulation of inflammation 30. and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochemistry Pharmacology**., v. 72, n. 11, p.1439-52, 2006.

RASO, G. M.;MELI,R.;DI CARLO,G.;PACILIO,M.,DI CARLO,R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. **Life Science journal**. v. 68, p. 921–31, 2001.

RIBEIRO, S. M. R.QUEIROZ J.H.; PELÚZO M.C.; COSTA M.N.; MATTA S.L QUEIROZ, M.E A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21.n.3,p.133-149, 2005.

RIVERA-ARCE, E.; CHAVEZ-SOTO, M. A.; HERRERA-ARELLANO, A.; ARZARTE, S.; AGUERO, J.; FERIA ROMERO, I.A; CRUZ- GUZMÁN, A.; ROBERTS, C. K.; SINDHU, K.K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life sciences**, n. 84, p. 705-712, 2009.

RIVERA-ARCE, E.; GATTUSO, M.; ALVARADO, R.; ZARATE, E.; AGUERO, J.; FERIA, I. AND LOZOYA, X. Pharmacognostical studies of the plant drug *Mimosae tenuiflorae* cortex. **Journal of Ethnopharmacology**.,v. 113, p. 400-408, 2007.

ROSS D, MOLDEUS P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): Membrane lipid oxidation. 1th ed. Boca Raton, CRC Press, p.151-70, 1991.

ROSA E. A, SILVA B.C, SILVA F.M, TANAKA C.M.A, PERALTA R.M, OLIVEIRA C.M.A, KATO K, FERREIRA H.D, SILVA C.C. Flavonoides e atividade antioxidante em *Palicourea rígida* Kunth, Rubiaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*.; v.20(4): p. 484- 488. Ago-set , 2010.

ROTELLI, A.E.; GUARDIA T.; DE LA ROCHA, A.O.; N.E., PELZER, L.E Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacological Research**, v.48, p.601-06, 2003.

ROMAN, M.R., WENDLAN. E. A., POLANCZYK. C. Z. Mieloperoxidase e Doença Arterial Coronariana: Da Pesquisa à Prática Clínica. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. V. 91 n. 13, p. 12-19, 2007.

ROBERTS, C. K.; SINDHU, K.K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life sciences** n . 84, p. 705-712, 2009

SANTOS, T. L; AMARAL F.M; DUTRA, R.P; JUNIOR L.M; CUNHA, M. S; RIBEIRO M.N. Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *Tephrosiaincerea* (L.) Pers. (Fabaceae). **Revista Ciência e Saúde coletiva**, v.13, n. 2, p. 114-122, jul-dez. 2011.

SARAIVA, R. A.; ARARUNA, M. K. A.; OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, K. D. P.; LEITE, G. O.; KERNTOPF, M. F.; COSTA, J. G. M.; ROCHA, J. B. T.; TOMÉ, A. R.; CAMPOS, A. R; MENEZES, I. R. A. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **Journal of Ethnopharmacology** , v. 136, n. 3, p. 504-10, 2010.

SERHAN, C.N.; WARD, P.A.; GILROY, D.W.; **Fundamentals of Inflammation**. 1 ed p. 45. New York, 2010.

SILVA, A. L. G.; CHAVES, S. R.; BRITO, J. M. Reproductive biology of *Bowdichia virgilioides* Kunth (Fabaceae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 33, n. 4, p. 463-470, 2011-a.

SILVIA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, p. 669-682, 2010.

SILVA, E.G., BEHR, G.A., ZANOTTO-FILHO, A. Antioxidant activities and free radical scavenging potential of *Bauhinia microstachya* (raddi) MACBR. (Caesalpinaceae) extracts linked to their polyphenol content. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 8, p. 1488-1496, 2007.

SILVA, J. N.; BEIRÃO, T.; FILIPE, P.; FERNANDES, A. Efeito de flavonóides no stresse oxidante e foto-oxidante no eritrócito humano. **Boletim da Sociedade Portuguesa Hemorreologia e Microcirculação**, v. 21, n. 1, p. 6-28, 2006.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, V. H.; BARBOSA, A. O.; CARDOSO, G.C.; MARRETO, R. N.; BARRETO-FILHO, J. A. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS M. R.V. Avaliação do Potencial Antidiabético de Cinco Plantas Medicinais em Ratos. **Latin American Journal of Pharmacy (formerly Acta Farmacéutica Bonaerense)**, v. 28, n. 4, p. 609-12, 2009.

SOLER-RIVAS, C.; SPIN, J. C.; WICHERS, H. J. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of food stuffs. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 1-9, 2000.

SGARBI, M. W. M.; SILVA JUNIOR, B. A.; HUNGRIA NETO, J. S. Importância da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) no prognóstico dos pacientes politraumatizados. **Revista Brasileira de Ortopedia**. v. 41, n. 1-2, p.1-6, 2006.

SCHULTES, R. E.; HOFMANN, A. The botany and chemistry of hallucinogens. **Charles Thomas Publishers**, Springfield, 1980.

SCHIANTARELLI, P.; CADEL, S.; ACERBI, D.; PAVESI, L. Antiinflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. **Arzneimittel Forschung / Drug Research**, v. 32, n. 3, p. 230-35, 1982.

SCHERER, R., GODOY, H.T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v. 112, p. 654-658, 2009.

SPERANDIO, M.; PIKARD, J UNNIKRIISHNAN S, ACTON ST, LEY K. Analysis of leukocyte rolling in vivo and in vitro. **Methods Enzymology**., v. 416, p. 346-71, 2006.

SUKANYA, S.L.; SUDISHA, J.; HARIPRASAD, P.; NIRANJANA, S.R.;PRAKASH, HS; FATHIMA S.K. Antimicrobial activity of leaf extracts of Indian medicinal plants against clinical and phytopathogenic bacteria. **African Journal of Biotechnology**., v.8, n. 23, p. 6677-82, 2009.

SHAN, X., AW, T.Y., JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 47, p. 61-71, 1990.

TELLEZ, P. J.; DUPOY de GUITARD, J. Pharmaceutical preparation containing *Mimosa tenuiflora* extract with skin-regenerating properties. **Patent European**., v. 349, p. 469, 1990.

TIJBURG LBM.; MATTERN T.; FOLTS JD.; WEISGERBER UM. & KATAN MB. Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, p. 771-785, 1997.

THEOHARIDES, T. C. SISMANOPOULOS N, DELIVANIS DA, ALYSANDRATOS KD, ANGELIDOU A, THERIANOU A, KALOGEROMITROS D. Mast cell and inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1822, n. 1, p. 21-33, jan. 2012.

- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D MONCOL, J CRONIN, M.T.; MANZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological function and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p. 44- 130, 2007.
- VALÉRIO, D. A.; GEORGETTI, S. R.; MAGRO, D. A.; CASAGRANDE, R.; CUNHA, T. M.; VICENTINI, F. T. M. C.; VIEIRA, S. M.; FONSECA, M. J. V.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; VERRI JÚNIOR, W. A. Quercetin Reduces Inflammatory Pain: Inhibition of Oxidative Stress and Cytokine Production. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 11, p. 1975-1979, 2009.
- VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. 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, p. 1323-1338, 2007.
- VAHER, M.; MATSO, K.; LEVANDI, T.; HELMJA, K.; KALJURAND, M. Phenolic compounds and the antioxidant activity of the bran, flour and whole grain of different wheat varieties. **Procedia Chemistry**, v. 2, p. 76-82, 2010.
- VEIGA JUNIOR V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, v. 28, n .3 p.519-528, maio/jun.2005
- VEPSALAINEN, J. J.; AURIOLA, S.; TUKIAINEN, M.; ROPPONEN, N. And CALLAWAY, J. C. Isolation and characterization of yuremamine, a new phytoindole. **Planta Médica.**, v. 71, p. 1053, 2005.
- YAMASHIRO, S.; KAMOHARA, H. ; YOSHIMURA, T. MCP- 1 is selectively expressed in the late phase by cytokine- stimulated human neutrophils: TNF- alpha plays a role in maximal MCP-1 mRNA expression. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 65, n 5, p. 671- 679, maio. 1999.
- YUTING, C.; RONGLIANG, Z.; ZHONGJIAN, J.; YONG, J. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 9, p. 19-21, 1990.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

DECLARAÇÃO

2ª Via

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado **“QUANTIFICAÇÃO DOS MARCADORES POR CLAE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIINFLAMATÓRIA DO EXTRATO E FRAÇÕES DA MIMOSA HOSTILIS.”**, sob coordenação do Profº. Drº. **CHARLES DOS SANTOS ESTEVAM** (protocolo **CEPA 52/2012**) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 19/10/2012.

São Cristóvão, 26 de novembro de 2013.

Prof. Dr. FLÁVIA TEIXEIRA SILVA
Presidente do CEPA/UFS

Cidade Universitária "Prof. Aloísio de Campos"
Jardim Rosa Elze - São Cristóvão - SE
49100-000
Fones: 3212 6661/6606