

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE
***Lacistema pubescens* MART.**
(LACISTEMATACEAE)

Josiane Mello da Silva

Juiz de Fora
2015

JOSIANE MELLO DA SILVA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE
***Lacistema pubescens* MART.**
(LACISTEMATACEAE)

Tese de Doutorado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dra Elita Scio Fontes
Coorientadora: Prof^a Dra Maria Christina Marques Nogueira Castañon

Juiz de Fora
2015

JOSIANE MELLO DA SILVA

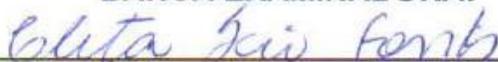
Contribuição ao estudo químico e farmacológico de *Lacistema pubescens*

Mart. (Lacistemataceae)

Tese de Doutorado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 13 / 03 / 2015.

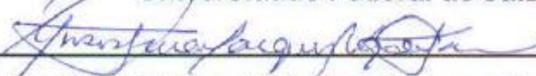
BANCA EXAMINADORA:



Prof.ª Dr.ª Elita Scio Fontes

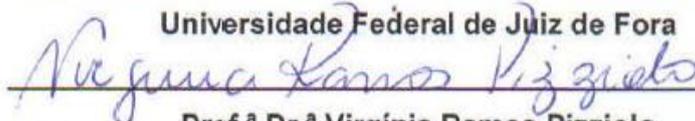
Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora



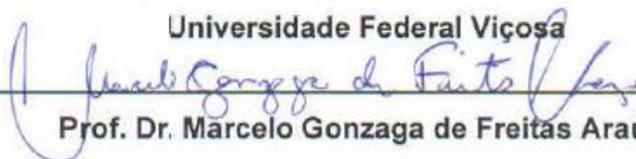
Prof.ª Dr.ª Maria Christina Marques Nogueira Castañon

Universidade Federal de Juiz de Fora



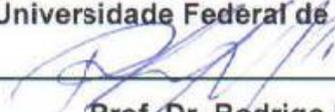
Prof.ª Dr.ª Virginia Ramos Pizziolo

Universidade Federal Viçosa



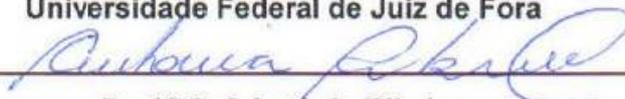
Prof. Dr. Marcelo Gonzaga de Freitas Araújo

Universidade Federal de São João del Rei



Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof.ª Dr.ª Antônia Ribeiro

Dedicatória

Aos meus queridos pais,

João Batista e Genilda Mello, e ao meu noivo,

Eleusis Cunha, com muito amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por ter permitido que eu realizasse esse sonho.

Ao programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas pelo apoio prestado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF, pelo fornecimento dos animais.

A Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), pela realização dos estudos de Cromatografia Gasosa.

Agradeço imensamente e tenho a grande honra ter a professora Elita Scio como orientadora. Dentre outras coisas, agradeço: pelo crescimento científico e profissional; pela disposição para tirar dúvidas e atendimento; pelos valiosos ensinamentos de vida e paciência durante meus momentos de dificuldade e, sobretudo, pelo carinho e amizade. Nunca me esquecerei de que ela é um exemplo de pesquisadora, professora, mãe e mulher guerreira.

À minha querida coorientadora, professora Dra. Maria Christina Castañon, pela confiança, paciência e pelos conhecimentos e ensinamentos despendidos durante a realização deste trabalho.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Produtos Naturais Bioativos (LPNB), Renata Mendes e Nicolás Pinto, pela amizade, ajuda na execução dos experimentos e por todos os conhecimentos compartilhados.

À aluna de iniciação científica, Jéssica Leiras, que com muita dedicação e competência me acompanhou e ajudou durante toda a realização deste trabalho.

A todos os outros colegas do departamento de Bioquímica pela agradável convivência e presteza em ajudar, sempre que precisei.

À Prof^a Dra. Antônia Ribeiro, pela amizade e pelos ensinamentos de Química de Produtos Naturais.

À Prof^a Dra. Elaine Coimbra e sua aluna de Doutorado, Luciana Antinarelli, do Departamento de Parasitologia do ICB da UFJF, pela realização da atividade leishmanicida.

À Prof^a Dra. Elaine Fagundes do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB da UFMG, pela realização da atividade antitumoral.

A todos os técnicos e docentes do Departamento de Bioquímica pelo apoio técnico e ensinamentos.

Aos colegas da Secretaria do ICB pelo suporte e gentileza toda vez em que recorria a eles.

A todos aqueles, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta tese, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A espécie arbórea e nativa *Lacistema pubescens* Mart. (Lacistemataceae) apresenta-se distribuída em vários estados brasileiros e é conhecida popularmente, conforme a região em que se encontra, como espeto-vermelho, canela-vermelha, sabonete e cafezinho. Esse trabalho descreve o estudo fitoquímico e as atividades citotóxicas frente a linhagens tumorais e não tumorais, leishmanicida e anti-inflamatória tópica da partição hexânica das folhas de *L. pubescens*. A partição em hexano (PHEX) foi submetida a um fracionamento cromatográfico e originou 17 frações (FH1 a FH17). Na avaliação da atividade citotóxica, as frações FH7, FH9, FH13 e FH16 foram as mais ativas para células tumorais. As frações FH7 e FH9F3 (obtida após fracionamento de FH9) tiveram o valor de CI_{50} determinado, sendo FH9F3 a fração que apresentou a maior resposta frente à linhagem HL60 e Jurkat. O fracionamento de PHEX foi também biomonitorado para a atividade leishmanicida. As frações obtidas da PHEX mais seletivas para as formas promastigotas foram FH7, FH9 e FH13. A PHEX e FH7 tiveram sua atividade anti-mastigota determinada sobre *L. amazonensis*. Com relação à atividade anti-inflamatória observou-se que a PHEX, administrada topicamente, apresentou resultados significativos no modelo do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, fenol, histamina, ácido araquidônico e etil fenil propionato (EPP), em camundongos. Estes resultados foram confirmados através de análises histopatológicas e ensaio enzimático. Uma formulação farmacêutica com PHEX (proPHEX) foi eficaz em processo inflamatório crônico. Além disso, PHEX apresentou segurança para administração por via tópica, uma vez que não apresentou toxicidade no modelo de irritação/corrosão dérmica, em ratos. A PHEX também não apresentou os efeitos adversos, quando comparada à dexametasona, nos modelos de atrofia cutânea e cicatrização de feridas. A atividade anti-inflamatória pode ser atribuída, ao menos em parte, às frações FH7 e FH9F3, as quais foram testadas no modelo do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton e fenol. A fração FH7 é rica em fitol e FH9F3 é rica em sitosterol, as quais foram identificadas por métodos cromatográficos e espectrométricos.

Palavras - chave: *Lacistema pubescens*, inflamação cutânea, *Leishmania*, fitol, sitosterol.

ABSTRACT

Lacistema pubescens Mart. (Lacistemataceae), an arborea native species, is distributed in several Brazilian states and is popularly known as “espeto-vermelho, canela – vermelha, sabonete e cafezinho”. This work describes the phytochemical and cytotoxic studies against tumor cell lines, and anti-leishmanial and anti-inflammatory activities of the leaves of *L. pubescens*. The hexane partition (PHEX) was subjected to a chromatographic fractionation and originated 17 fractions (FH1 to FH17). Regarding to the cytotoxic activity, FH7, FH9 and FH16 fractions were more selective for tumor cells. The IC₅₀ value was determined for FH7 and FH9F3 fractions (obtained after FH9 fractionation), and FH9F3 presented the highest response against HL60 and Jurkat cell lines. PHEX fractionation was also biomonitoring for anti-leishmanial activity. The fractions FH7 and FH9 were the most selective for promastigotes. The anti-amastigote activity against *L. amazonensis* was determined for PHEX and FH7. Regarding to the anti-inflammatory activity, it was observed that topical application of PHEX showed significant results in ear edema model induced by croton oil, phenol, histamine, arachidonic acid and ethyl phenylpropionate (EPP) in mice. These results were confirmed by histopathological analysis and enzymatic assay. A pharmaceutical formulation contained PHEX (proPHEX) was effective for chronic inflammatory process. Moreover, PHEX presented safety for topical administration, since it showed no toxicity in the irritation/corrosion model in rats. PHEX did not show the adverse effects observed for dexamethasone in cutaneous atrophy and wound healing models. The anti-inflammatory activity may be attributed, at least in part, to FH7 and FH9F3 fractions, which were tested on the ear edema induced by croton oil and phenol models. Sitosterol-rich fraction (FH9F3) and Phytol-rich fraction (FH7) were obtained from PHEX fractionation and were identified by spectroscopic methods.

Kew-Words: *Lacistema pubescens*; skin inflammation; *Leishmania*; phytol; sitosterol

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 Distribuição da família Lacistemataceae | 16 |
| Figura 2 Espécie <i>Lacistema pubescens</i> (Lacistemataceae) | 17 |
| Figura 3 Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> sp..... | 24 |
| Figura 4 Fluxograma da extração, partição e fracionamento de <i>L. pubescens</i> | 42 |
| Figura 5 Perfil cromatográfico da PHEX de <i>L. pubescens</i> por Cromatografia Gasosa. | 61 |
| Figura 6 Perfil cromatográfico e espectro de fragmentação de FH7 | 62 |
| Figura 7 Perfil cromatográfico e espectro de fragmentação de FH9F3 | 63 |
| Figura 8 Perfil cromatográfico da PHEX das folhas de <i>L. pubescens</i> por CLAE..... | 64 |
| Figura 9 Efeito da PHEX, frações e etoposídeo sobre a viabilidade das linhagens tumorais HL60, Jurkat e MCF-7 em 48h | 65 |
| Figura 10 Efeito da PHEX sobre a viabilidade da linhagem não tumoral 3T3 em 48h.. | 66 |
| Figura 11 Efeito de FH7 no potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> | 71 |
| Figura 12 Produção de ROS em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com FH7. | 72 |
| Figura 13 Ensaio de integridade da membrana celular em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com FH7 por 24, 48 e 72 h..... | 73 |
| Figura 14 Efeito da PHEX de <i>L. pubescens</i> pela via tópica sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton – aplicação única | 76 |
| Figura 15 Efeito da PHEX de <i>L. pubescens</i> pela via tópica sobre a migração celular induzida pelo óleo de cróton – aplicação única | 77 |
| Figura 16 Fotos representativas dos cortes histológicos de orelhas de camundongos corados com hematoxilina-eosina (HE) 24 h após aplicação única de óleo de cróton | 78 |
| Figura 17 Efeito da PHEX de <i>L. pubescens</i> sobre o edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico (AA) | 79 |
| Figura 18 Efeito da PHEX de <i>L. pubescens</i> sobre o edema de orelha induzido pelo fenol. | 80 |

| | |
|---|----|
| Figura 19 Efeito da PHEX de <i>L. pubescens</i> sobre o edema de orelha induzido pela capsaicina. | 81 |
| Figura 20 Efeito da PHEX de <i>L. pubescens</i> no edema de orelha induzido pela aplicação intradérmica da histamina | 82 |
| Figura 21 Efeito da PHEX de <i>L. pubescens</i> sobre o edema de orelha induzido pelo EPP..... | 83 |
| Figura 22 Efeito da PHEX sobre a liberação de IL-1 β induzida por óleo de cróton... | 85 |
| Figura 23 Efeito da PHEX sobre a liberação de IL-6 induzida por óleo de cróton..... | 85 |
| Figura 24 Efeito da PHEX sobre a liberação de TNF- α induzida por óleo de cróton. | 86 |
| Figura 25 Efeito de FH7 e FH9F3 sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton – aplicação única..... | 87 |
| Figura 26 Efeito de FH7 e FH9F3 sobre o edema de orelha induzido pelo fenol..... | 88 |
| Figura 27 Efeito da PHEX de <i>L. pubescens</i> sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton – aplicação múltipla. | 89 |
| Figura 28 Fotos representativas dos cortes histológicos de orelhas de camundongos corados com hematoxilina-eosina (HE) após aplicação repetida de óleo de cróton. | 90 |
| Figura 29 Efeito da PHEX de <i>L. pubescens</i> sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton – aplicação múltipla. | 92 |
| Figura 30 Fotos representativas dos cortes histológicos de orelhas de camundongos corados com hematoxilina-eosina (HE), após aplicação repetida de óleo de cróton | 93 |
| Figura 31 Atrofia cutânea induzida pela aplicação tópica de glicocorticoide..... | 94 |
| Figura 32 Efeito da PHEX e da dexametasona sobre o ganho de peso corporal dos camundongos..... | 95 |
| Figura 33 Efeito da PHEX e da dexametasona sobre o peso relativo do timo | 96 |
| Figura 34 Efeito da PHEX e da dexametasona sobre o peso relativo das adrenais. | 96 |
| Figura 35 Efeito da PHEX e da dexametasona sobre o peso relativo do baço. | 97 |
| Figura 36 Fotografias representativas do aspecto clínico do timo, das adrenais e baços dos camundongos..... | 97 |
| Figura 37 Efeito da PHEX (ProPHEX) e da dexametasona (ProDEX) aplicados por via tópica no modelo de cicatrização por excisão. | 98 |
| Figura 38 Efeito da ProPHEX 6% (PHEX) e ProDEX 0,1% (dexametasona) na cicatrização de lesão por excisão..... | 99 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 Composição química da PHEX | 60 |
| Tabela 2 Citotoxicidade de FH7 e FH9F3 sobre as linhagens tumorais HL60 e Jurkat | 66 |
| Tabela 3 Valores de CI50 ($\mu\text{g/mL}$) da PHEX e frações de <i>L. pubescens</i> em promastigotas de diferentes espécies de <i>Leishmania</i> | 68 |
| Tabela 4 Citotoxicidade da PHEX e frações de <i>L. pubescens</i> em cultura de macrófagos..... | 69 |
| Tabela 5 Efeito de PHEX e FH7 sobre <i>L. amazonensis</i> e índice de seletividade e especificidade..... | 70 |
| Tabela 6 Estudo de irritação dérmica aguda em ratos | 74 |
| Tabela 7 Efeito da PHEX de <i>L. pubescens</i> , dexametasona e indometacina sobre o edema de orelha induzido por diferentes agentes flogísticos em camundongos | 84 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AA – ácido araquidônico

CC₅₀: Concentração citotóxica média

CCD - cromatografia em camada delgada

CG-EM - Cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas

CI₅₀ – Concentração inibitória média

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

EPP - etil fenil propionato

FH7 – fração rica em fitol

FH9F3 – fração rica em sitosterol

HE - hematoxilina e eosina

IE - índice de especificidade

IIP - índice de irritação primária

IS - índice de seletividade

i.p. - intraperitoneal

MTT - brometo de 3-(4,5-dimethyliazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio

MPO - mieloperoxidase

PHEX – partição em hexano

s.pl.- injeção subplantar

TR- tempo de retenção

μl – microlitro

UV - luz ultravioleta

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.1 REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| 1.1.1 O gênero <i>Lacistema</i> | 15 |
| 1.1.2 Câncer | 18 |
| 1.1.3 <i>Leishmania</i> e leishmanioses..... | 21 |
| 1.1.4 Estrutura e fisiologia da pele..... | 25 |
| 2 OBJETIVOS | 36 |
| 2.1 Objetivo geral | 36 |
| 2.2 Objetivos específicos | 36 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 38 |
| 3.1 Material Vegetal | 38 |
| 3.2 Preparo do extrato bruto metanólico (EBM) e partição hexânica (PHEX)..... | 38 |
| 3.3 Métodos cromatográficos e espectrométricos..... | 39 |
| 3.3.1 Cromatografia de adsorção | 39 |
| 3.3.2 Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massas (CG-EM) | 39 |
| 3.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) | 40 |
| 3.4 Isolamento dos constituintes químicos de <i>L. pubescens</i> | 40 |
| 3.4.1 Fracionamento da PHEX | 40 |
| 3.4.2 Fracionamento da FH9 obtida da PHEX..... | 40 |
| 3.5 Identificação dos constituintes químicos de <i>L. pubescens</i> | 41 |
| 3.6 Atividades biológicas <i>in vitro</i> | 42 |
| 3.6.1 Atividade citotóxica para linhagens tumorais | 42 |
| 3.6.2 Atividade leishmanicida | 44 |
| 3.7 Atividades biológicas <i>in vivo</i> | 49 |
| 3.7.1 Animais | 49 |
| 3.7.2 Teste de irritação/corrosão da pele..... | 49 |
| 3.7.3 Medição do edema de orelha | 51 |

| | |
|--|------------|
| 3.7.4 Atividade anti-inflamatória tópica da PHEX e frações em modelo de inflamação aguda | 52 |
| 3.7.5 Atividade anti-inflamatória tópica em modelo de inflamação crônica..... | 55 |
| 3.7.6 Atrofia cutânea induzida por tratamento tópico com glicocorticoide | 56 |
| 3.7.7 Avaliação da Cicatrização pelo Método de Excisão..... | 57 |
| 3.7.8 Análise histopatológica | 58 |
| 3.8 Análise estatística | 59 |
| 4 RESULTADOS | 60 |
| 4.1 Caracterização química | 60 |
| 4.2 Atividades biológicas <i>in vitro</i> | 64 |
| 4.2.1 Atividade citotóxica em linhagens tumorais | 64 |
| 4.2.2 Avaliação da atividade leishmanicida | 67 |
| 4.3 Atividades biológicas <i>in vivo</i> | 73 |
| 4.3.1 Estudo de irritação/corrosão dérmica aguda em ratos..... | 73 |
| 4.3.2 Atividade anti-inflamatória tópica em modelo de inflamação aguda | 75 |
| 4.3.3 Atividade anti-inflamatória tópica em modelo de inflamação crônica..... | 88 |
| 4.3.4 Atrofia cutânea induzida por tratamento tópico com glicocorticoide | 94 |
| 4.3.5 Avaliação da Cicatrização pelo Método de Excisão..... | 98 |
| 5 DISCUSSÃO | 100 |
| 5.1 Atividade citotóxica sobre linhagens tumorais | 100 |
| 5.2 Atividade leishmanicida..... | 102 |
| 5.3 Atividade anti-inflamatória tópica | 106 |
| 6 CONCLUSÃO | 116 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 117 |

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento sustentável de um país depende essencialmente de uma política consistente de educação, ciência, tecnologia e inovação, em conjunto com a preservação da natureza, da biodiversidade e na exploração racional de fontes naturais necessárias para alimentação, avanço social e econômico, em um cenário que assegure a manutenção da saúde e a cura de doenças (FILHO, 2010).

Particularmente no contexto da exploração dos recursos naturais, observamos que, ao longo dos tempos, a humanidade tem recorrido à natureza para atender às suas necessidades básicas, como o tratamento e a cura de um amplo espectro de enfermidades. As plantas, principalmente, têm formado a base de um sofisticado sistema da medicina tradicional e os primeiros registros datam de cerca de 2600 a.C., os quais documentam a utilização de aproximadamente 1.000 substâncias derivadas de plantas na antiga Mesopotâmia. Estas incluem óleos de espécies de *Cedrus* sp (cedro) e *Cupressus sempervirens* (ciprestes), *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz), espécies de *Commiphora* sp (mirra) e *Papaver somniferum* (suco de papoula), que são usadas em dias atuais para o tratamento de doenças variando de tosse e resfriados a infecções parasitárias e inflamação (CRAGG e NEWMAN, 2013).

No século passado, na lista dos mais vendidos, estavam os medicamentos desenvolvidos a partir de produtos naturais (PN) (vincristina da *Vinca rosea*, morfina de *Papaver somniferum*, taxol de *Taxus brevifolia*, entre outros). Também, um significativo interesse em PN como fonte potencial de novos medicamentos tem sido observado tanto pela academia, como pelas empresas farmacêuticas. Cerca de 30% dos produtos vendidos nas farmácias são fabricados a partir de materiais extraídos de plantas ou de estruturas químicas derivadas desses vegetais (GLOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Dentre os fatores que distinguem os PN das substâncias sintéticas estão a sua diversidade molecular e funcionalidade biológica. Comparados aos produtos resultantes de bibliotecas de química combinatória, os quais lhes faltam quiralidade e estrutura suficientemente rígida, os PN têm estruturas privilegiadas capazes de

interagir com proteínas e outros alvos biológicos para fins específicos (NISBET e MOORE, 1997).

Várias estratégias envolvendo as pesquisas com PN têm sido desenvolvidas, destacando-se aquelas relacionadas ao fracionamento guiado pela bioatividade (principalmente em modelos *in vitro*), à seleção de organismos baseada em informações etnofarmacológicas (SARKER, LATIF e GRAY, 2006) e à descoberta de novos alvos moleculares para substâncias conhecidas (KEISER et al., 2009). Cerca de 74% dos principais produtos medicinais obtidos de vegetais foram descobertos por meio de orientação baseada em resultados revelados pela medicina popular (FILHO, 2010). Contudo, outra abordagem relacionada aos estudos com PN, refere-se à medicina holística, a atual filosofia de algumas medicinas tradicionais como a Medicina Tradicional Chinesa (MTC) e a Ayurveda. A presença de sinergismo entre as substâncias presentes em um extrato vegetal, e os elevados custos das companhias farmacêuticas na busca por ineditismo estrutural em PN têm tornado a abordagem holística uma tendência (VERPOORTE et al., 2005; WANG et al., 2005; URICH-MERZENICH et al., 2007). De qualquer forma, o que ocorre na maioria das sociedades atuais é uma complementaridade entre a alopatia e o uso de plantas medicinais.

No Brasil, pesquisas envolvendo plantas medicinais são bastante promissoras, uma vez que o país apresenta a mais diversa flora do mundo (22% do total mundial) (MMA, 2010) e apenas cerca de 8% das espécies da flora nativa foi estudada em busca de substâncias bioativas (BRASIL, 2006). Contudo, estudos que conduzam ao desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos devem se pautar prioritariamente no tripé segurança, eficácia e qualidade, uma vez que são usados por grande parte da população como primeiro cuidado farmacêutico (OMS, 2005).

Projetos de pesquisa e desenvolvimento são realizados no Laboratório de Produtos Naturais Bioativos (LPNB) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), com o propósito de corroborar na caracterização química e farmacológica de moléculas bioativas e/ou extratos de plantas nativas do Brasil. Neste contexto, encontra-se *Lacistema pubescens* (Lacistemataceae), cujas espécies do gênero são particularmente muito utilizadas por comunidades indígenas na Amazônia brasileira para tratar diversas enfermidades.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa publicou, em periódico especializado, resultados preliminares obtidos com a partição hexânica (PHEX) das folhas de *L. pubescens*, sua fração mais apolar, no qual foi sugerida uma potente atividade anti-inflamatória tópica, semelhante ao glicocorticoide dexametasona. Este trabalho também relatou o efeito antinociceptivo da PHEX (SILVA et al., 2012^b). Em outro trabalho, a atividade antioxidante do extrato bruto metanólico (EBM) e frações das folhas de *L. pubescens* foi reportada, com resultados mais expressivos para as frações mais polares, possivelmente relacionados aos fenóis presentes na espécie (SILVA et al., 2012^a). Outros estudos preliminares, desenvolvidos durante o Mestrado da autora desta tese, indicaram que *L. pubescens* apresenta uma potente atividade em formas promastigotas de várias espécies de *Leishmania*, além de significativa atividade citotóxica sobre algumas linhagens de células tumorais (SILVA, 2011).

Diante do exposto, este trabalho visa confirmar e aprofundar os estudos com a PHEX, no qual serão utilizados vários modelos de inflamação cutânea em camundongos, bem como detectar as possíveis moléculas bioativas envolvidas nas atividades anti-inflamatória, leishmanicida e antitumoral. Desta forma, será possível aproveitar e conhecer melhor o potencial da nossa biodiversidade vegetal e propiciar à população, particularmente a de baixa renda, novas alternativas terapêuticas.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 O gênero *Lacistema*

As plantas pertencentes à ordem Malpighiales Mart., de distribuição principalmente tropical, estão agrupadas em cerca de 28 a 37 famílias, com 725 gêneros e 16.000 a 17.000 espécies. As famílias desta ordem incluem inúmeras plantas ornamentais, bem como espécies com um importante valor econômico. A ordem Malpighiales também é notável pelo considerável número de plantas medicinais, as quais possuem importantes substâncias bioativas. Nesta, destacam-se a coca (*Erythroxylum coca* - Erythroxylaceae), anestésico local e estimulante do sistema nervoso central, plantas do gênero *Hydnocarpus* (*Achariaceae sensu*, tradicionalmente usada no tratamento da lepra), e o anti-inflamatório salicilina, isolada do salgueiro-branco (*Salix alba* - Salicaceae) (HOFFMANN, 2005).

A família Lacistemataceae, de distribuição neotropical (figura 1), é representada pelos gêneros *Lacistema* e *Lozania* com cerca de 11 e 4 espécies, respectivamente (YOUNG, 2008). No Brasil, podemos encontrar cerca de 10 espécies do gênero *Lacistema*, a maioria ocorrendo na região Sudeste ou na Amazônia. O nome do gênero *Lacistema* deriva do grego *lacis* = "trapo, pedaço, farrapo", e *stemon* = "estame", referindo-se ao estame bifurcado. São árvores de pequeno porte, com gomo terminal protegido por estipula caduca; folhas simples, alternas; flores andróginas dispostas em espigas curtas com brácteas que protegem as flores, bem desenvolvidas; cálice com sépalas imbricadas e desiguais entre si; pétalas ausentes; androceu com um estame; ovário unilocular; fruto do tipo capsular trilobado; semente com endosperma carnosos (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).



Figura 1 Distribuição da família Lacistemataceae (FONTE:www.mobot.org/MOBOT)

Como resultado de uma pesquisa realizada por Di Stasi e Hiruma-Lima (2002), os quais descreveram 135 espécies medicinais utilizadas por moradores da Amazônia e habitantes rurais e urbanos da Mata Atlântica, *Lacistema* sp foi citada por grande parte dos entrevistados (principalmente índios Tenharins) na Amazônia, os quais utilizam as folhas sobre a cabeça como antitérmico. Barbosa e Pinto (2003), em um estudo sobre a documentação e valorização da fitoterapia tradicional Kayapó nas aldeias A'Ukre e Pykanu no sudeste do Pará, constataram que este gênero é indicado pelos pajés para combater reumatismo, vômito (emese), dores no corpo e disenteria. Trabalho semelhante (ROUMY et al., 2007), listando plantas amazônicas do Peru utilizadas com fins medicinais pela população indígena local, menciona *Lacistema* sp como antipirética e também contra reumatismo, corroborando o seu uso pela população indígena brasileira. Há registros também do uso do caule como combustível (SOBRINHO, 2007).

Estudos experimentais têm demonstrado potenciais propriedades farmacológicas de algumas espécies pertencentes a este gênero. Roumy e colaboradores (2007) constataram uma significativa atividade antiplasmódica e baixa citotoxicidade do extrato diclorometânico preparado a partir das cascas de *Lacistema agregatum* e Wall e colaboradores (1988) detectaram que a espécie também apresenta propriedades antimutagênicas. Além disso, ensaios de bioautografia demonstraram que o extrato bruto das folhas de *Lacistema lucidum* apresentou atividade antifúngica frente a *Cladosporium cladosporioides* (AGRIPINO et al., 2004) e *Lacistema hasslerianum*, exibiu uma potente atividade antiviral (SIMONI et al., 2007; PADILLA, 2011). Segundo Silva (2010), os ramos da espécie *L. hasslerianum* apresentaram toxicidade sobre larvas de *Artemia salina* e não

apresentaram atividade larvívora sobre *Aedes aegypti*. Da mesma forma, *Lozania pittieri* demonstrou possuir substâncias bioativas, uma vez que foi capaz de inibir seletivamente a atividade da ciclo-oxigenase bem como a transcriptase reversa do HIV-1 (CALDERON, 2000). Quimicamente, as espécies citadas não foram investigadas.

A espécie Lacistema pubescens Mart.

Originária do Brasil, a espécie arbórea *Lacistema pubescens* Mart. (figura 2), apresenta-se distribuída nos estados do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Bahia, Maranhão, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Paraná e Distrito Federal, além dos países como a Bolívia, Guiana Francesa e Venezuela (HOFFMANN, 2005). No Brasil, assume diferentes denominações populares conforme a região em que se encontra: espeto-vermelho e canela-vermelha - MG (SILVA, 2002; SILVA et al., 2004), sabonete - RJ (SOBRINHO, 2007) e cafezinho - PA (TRINDADE, 2007).



Figura 2 Espécie *Lacistema pubescens* (Lacistemataceae): (A) folhas e (B) frutos (FONTE: acervo pessoal).

Recentes estudos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa demonstraram que as folhas de *L. pubescens* apresentaram uma potencial capacidade antioxidante, possivelmente correlacionada com os compostos fenólicos, detectados nesta espécie, dentre eles os flavonoides (SILVA et al, 2012 ^a). A atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da partição hexânica de *L. pubescens* foi também reportada, confirmando o uso popular do gênero pelas comunidades indígenas (SILVA et al., 2012 ^b). Neste trabalho, foi utilizado o modelo do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton para verificar a atividade anti-inflamatória da partição hexânica (PHEX), administrada por via oral e por via tópica. Quando os animais receberam o tratamento com a PHEX por via oral (300 mg/Kg), não houve supressão da inflamação. Entretanto, quando administrada topicamente (1 mg/orelha), a PHEX significativamente inibiu o edema.

1.1.2 Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo (INCA, 2014). Atualmente, o termo câncer é utilizado como sinonímia de neoplasia maligna, entendido como a proliferação anormal, descontrolada e autônoma, ou seja, fora do controle dos mecanismos que regulam a multiplicação celular. Desta forma, as células reduzem ou perdem a capacidade de se diferenciarem, em consequência de alterações nos genes que regulam o crescimento e a diferenciação celular (BOGLIOLO e BRASILEIRO FILHO, 2006). Cabe-se dizer que um tumor é benigno quando suas características micro e macroscópicas são consideradas relativamente inocentes, significando que ele permanece localizado, não consegue se disseminar para outros sítios e geralmente pode ser removido por cirurgia local (KUMAR et al., 2010). Além das alterações genéticas, alterações epigenéticas, isto é, no padrão de expressão dos genes sem que haja mudanças na sequência do DNA, podem ser a causa de alguns tipos de cânceres (ALBERTS et al., 2010).

Os cânceres geralmente são classificados de acordo com o tecido e tipo de célula dos quais se originam. Cânceres originados de células epiteliais são

denominados carcinomas; aqueles originados a partir de tecidos conjuntivos ou células musculares são denominados sarcomas. Aqueles que não se encaixam em nenhuma dessas categorias incluem os vários tipos de leucemia e linfoma, derivados de células hematopoiéticas, assim como cânceres derivados de células do sistema nervoso. Cerca de 80% dos cânceres humanos são carcinomas, talvez porque a maioria das células em proliferação no corpo se encontra no epitélio ou porque os tecidos epiteliais são mais expostos a várias formas de danos físicos e químicos que favorecem o desenvolvimento do câncer (ALBERTS et al., 2010).

Dentre as causas do desenvolvimento de cânceres incluem-se, normalmente, a agressão ao genoma celular, com alterações do DNA (mutações) ou a expressão anômala de genes normais. Fatores ambientais, como agentes físicos (raios ultravioleta, radiação ionizante), químicos (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, principalmente os derivados do tabaco e da queima de combustíveis fósseis, nitrosaminas, aflatoxinas, dentre outras), biológicos (vírus), influências culturais (alimentação, estresse, tabagismos), populações suscetíveis (possivelmente por fatores genéticos) e, principalmente, fatores como idade e hereditariedade podem culminar em sucessivas mutações, contribuindo para o aparecimento de diversas neoplasias (KUMAR et al., 2010).

Células cancerosas adquirem uma variedade de propriedades especiais à medida que se desenvolvem, multiplicam e espalham. Tais células são mais independentes do que as células normais para o crescimento e a proliferação. Além disso, são relativamente insensíveis aos sinais antiproliferativos extracelulares; são menos predispostas a sofrerem apoptose; são menos falíveis nos mecanismos de controle intracelular que normalmente param a divisão celular permanentemente em resposta ao estresse ou a danos no DNA; induzem socorro das células normais do estroma no seu local de desenvolvimento; induzem angiogênese, são invasivas e formam metástases; são geneticamente instáveis e produzem telomerase ou adquirem outras maneiras de estabilizar seus telômeros (ALBERTS et al., 2010).

O ciclo celular é regulado para desencadear o processo normal de divisão celular. Os pontos de verificação nas fases G1 e G2 ou *checkpoints* são responsáveis pelo prosseguimento do ciclo celular e são regulados por uma série de proteínas quinases como as CDK (quinases dependentes de ciclina) (HEMAISWARYA e DOBLE, 2006). Quando algum tipo de anormalidade é reconhecido, o ciclo celular para até a completa reparação celular. Caso essa

reparação não seja eficiente, a célula é encaminhada para a morte celular programada ou apoptose (ALBERTS et al., 2010). No câncer, como as células são incapazes de pausar em ambos os pontos de verificação, o resultado é uma desregulação do ciclo celular (HEMAISWARYA e DOBLE, 2006).

As alterações no funcionamento de genes controladores do ciclo celular, em decorrência de mutações, são relacionadas ao surgimento de um câncer. Duas classes de genes, os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor, são os mais diretamente relacionados à regulação do ciclo celular. Os proto-oncogenes são responsáveis pela produção de proteínas que atuam na estimulação do ciclo celular, enquanto os genes supressores de tumor são responsáveis pela produção de proteínas que atuam inibindo o ciclo celular (DE ALMEIDA et al., 2005). Assim, os proto-oncogenes quando ativos estimulam a ocorrência de divisão celular. Os genes supressores de tumor quando ativos inibem a ocorrência de divisão celular. O equilíbrio na atuação desses dois grupos de genes resulta no perfeito funcionamento do ciclo celular (SANTOS e WADA, 2005). Sendo assim, o desenvolvimento de determinado câncer envolve um número de diferentes alterações genéticas ocorrendo sequencialmente na célula, incluindo a deleção de genes específicos (genes supressores de tumores), a mutação de oncogenes (que podem transformar células normais em tumorais), além de outras aberrações cromossômicas. Essas mudanças sequenciais estão aparentemente associadas à progressão até maiores graus de malignidade (HILL e TANNOCK, 1992).

De acordo com estimativas mundiais da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012. Desses, 60% dos novos casos anuais ocorreram na África, Ásia e América Central e do Sul. Em 2030, a carga global será de 21,4 milhões de casos novos e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (INCA, 2014).

No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, que será válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos, incluindo os casos de câncer pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema no país. O câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69

mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil) (INCA, 2014).

O objetivo principal no tratamento das neoplasias é a completa erradicação das células tumorais, a qual pode ser obtida por procedimentos como cirurgia, radioterapia e quimioterapia utilizados de forma isolada ou em associação (BOGLIOLO e BRASILEIRO FILHO, 2006; KUMAR et al., 2010). A cirurgia é o meio simples e seguro para remover tumores sólidos, mas não na maioria dos pacientes que apresentam a doença metastática. A radioterapia pode ser curativa para tumores localizados, preservando a estrutura e funcionamento do órgão ou tecido, mas tem suas limitações no tratamento de tumores volumosos. Já a quimioterapia, um tratamento que envolve o uso de fármacos citotóxicos, deveria erradicar o câncer sem prejudicar os tecidos normais, mas a maioria destas drogas causa significativos efeitos colaterais. Esses fármacos são mais eficazes contra tumores de proliferação rápida do que contra alguns dos tumores de crescimento lento e são mais tóxicos para células de crescimento rápido do que para os tecidos normais do hospedeiro. Entretanto, tais agentes antiproliferativos podem ter importantes efeitos tóxicos colaterais em tecidos normais que se dividem rapidamente, como a medula óssea, mucosa gastrintestinal e pele (BUBENÍK e VONKA, 2003; KO, WANG e FERRONE, 2003).

As terapêuticas convencionais muitas vezes não permitem a total erradicação das neoplasias, além dos efeitos colaterais e do custo elevado. A necessidade de agentes anti-invasivos e/ou tumorídeos mais eficientes e menos onerosos tem levado à busca de novas substâncias com ação farmacológica, tanto no controle do crescimento das células tumorais, como na modulação das moléculas de adesão que permitem as metástases. Neste sentido, o interesse por substâncias ou produtos de origem vegetal na busca de terapias mais eficazes pode ser uma promissora alternativa (JANEWEY, WALPORT e SHLOMCHIK, 2002; NEWMAN, CRAGG e SNADE, 2003).

1.1.3 *Leishmania* e leishmanioses

Leishmanioses são doenças infecto-parasitárias, não contagiosas, causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (RATH et al., 2003).

Interferências do homem sobre o meio ambiente e ecossistema (AMATO et al., 2000) levaram a uma alteração no ciclo de parasitos da espécie *Leishmania* sp, resultando nas leishmanioses, doenças tropicais negligenciadas, consideradas pela OMS uma das antropozoonoses mais importantes em saúde pública (CAMARGO E LANGONI, 2006).

Estudos apontam que 98 países e territórios são endêmicos para as leishmanioses com 350 milhões de pessoas expostas ao risco. Estima-se ainda que existam 12 milhões de casos no mundo, com aproximadamente 1,3 milhões de novos casos ocorrendo anualmente e 20.000 a 30.000 mortes anuais. Dos três principais tipos de leishmanioses, mais de 90% dos casos globais de leishmaniose visceral ocorrem em apenas seis países, incluindo o Brasil. A leishmaniose cutânea é mais amplamente distribuída, com cerca de um terço dos casos ocorrendo em cada uma das três regiões epidemiológicas, as Américas, a bacia do Mediterrâneo e Ásia ocidental a Ásia Central (WHO, 2014).

No Brasil, as leishmanioses estão presentes em todas as unidades federativas, sendo que mais de 90% dos casos humanos da doença concentra-se na região Nordeste, havendo ainda focos importantes nas regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste (MONTEIRO, LACERDA e ARIAS, 1994; MAIA-ELKHOURY et al., 2008). O aumento da incidência tem como causas principais a devastação das florestas e aumento da população, falta de saneamento e higiene, bem como imunossupressão e desnutrição, que implicam na maior suscetibilidade do hospedeiro (ASHFORD, 2000) atingindo a população mais carente do planeta e, particularmente, os países em desenvolvimento (WHO, 2014).

As manifestações clínicas e a severidade da doença são variáveis, dependendo da virulência da espécie infectante, susceptibilidade do hospedeiro e co-infecções (CUNNINGHAM, 2002; ROGERS et al., 2002). A infecção pode ser assintomática ou apresentar um espectro que varia desde lesões cutâneas localizadas ou disseminadas, forma cutânea-difusa, até graves lesões mucocutâneas ou viscerais (GRIMALDI e TESH, 1993). A leishmaniose visceral (também conhecida como calazar) é fatal se não tratada. Caracteriza-se por acessos irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço e do fígado e anemia. A leishmaniose cutânea é a forma mais comum e provoca úlceras nas partes expostas do corpo, podendo deixar cicatrizes definitivas e incapacidade grave. A leishmaniose

mucocutânea leva à destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta (WHO, 2014).

Cerca de 20 espécies de *Leishmania* podem infectar o homem, as quais podem ser subdivididas nos subgêneros *L. (Leishmania)* spp. e *L. (Viannia)* spp. (MELBY, 2002), encontradas tanto no Velho Mundo quanto no Novo Mundo. No Brasil, várias espécies estão associadas às formas cutânea e/ou cutâneo-mucosa, enquanto a *L. chagasi* é a principal espécie associada à manifestação visceral (LAINSON e SHAW, 1987; GRAMICCIA e GRADONI, 2005).

No inseto vetor (gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo), os parasitos deste gênero se apresentam como formas promastigotas flageladas. No hospedeiro vertebrado, apresentam-se como formas amastigotas no interior de fagócitos mononucleares, principalmente os macrófagos (ALEXANDER, SATOSKAR e RUSSELL, 1999; ROGERS et al., 2002). Uma questão importante na biologia da *Leishmania*, e que leva a diversas pesquisas na área, é a característica notável que o parasito tem de sobreviver e prosperar dentro do ambiente hidrolítico do macrófago (ZHANG et al., 2001). Durante o processo de invasão, deficiências no processo de ativação dos macrófagos contribuem para estabelecimento bem sucedido da *Leishmania* no hospedeiro mamífero (REINER et al., 1994).

No modo de transmissão habitual da doença (figura 3), o parasito é transmitido ao hospedeiro vertebrado pela picada de fêmeas do inseto vetor infectadas que injetam um pequeno número de promastigotas metacíclicos (formas infecciosas) na pele. No interior dos fagolisossomos, os promastigotas se diferenciam em amastigotas que proliferam, eventualmente rompendo o macrófago infectado, e são liberados para infectar macrófagos vizinhos. Macrófagos infectados podem ser ingeridos pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo e são lisados no intestino médio deste, liberando parasitas que se diferenciam em promastigotas procíclicos (formas não infecciosas que se replicam rapidamente). Essas formas passam por um processo de adesão à parede do intestino, liberação e migração anterior que é acompanhado por sua diferenciação em promastigotas metacíclicos não-replicativos que podem ser transmitidos quando o vetor fizer um novo repasto sanguíneo (CUNNINGHAM, 2002; SACKS e NOBEN-TRAUTH, 2002; DOMINGUEZ et al., 2003).

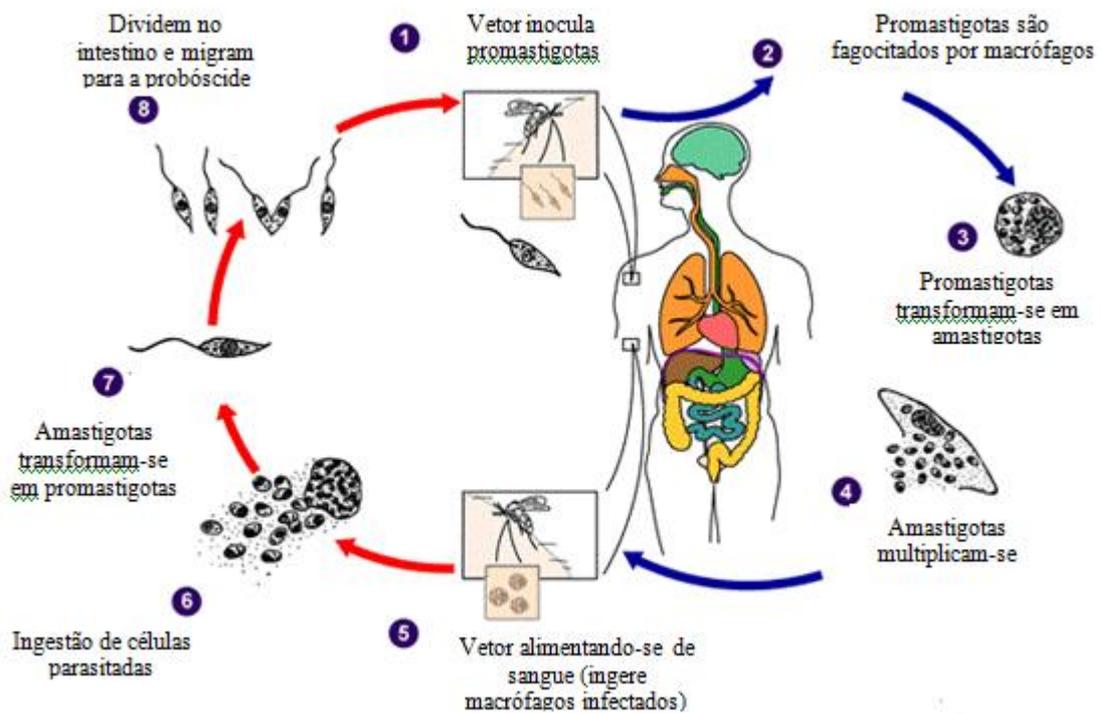


Figura 3 Ciclo de vida da *Leishmania* sp (Adaptado de CDC, 2003).

O tratamento de escolha para todas as formas de manifestação clínica das leishmanioses é feito à base de antimoniais pentavalentes. Como medicamentos de segunda escolha, incluem a anfotericina B e pentamidinas. Entretanto, todos são tóxicos, de custo elevado, difícil administração e já existe comprovada resistência do parasito (CROFT e COOMBS 2003; RATH et al., 2003). Fármacos como a miltefosina, um hexadecil-fosfocolina, têm demonstrado efetividade para o tratamento de leishmaniose visceral (SINDERMANN et al., 2004). No Brasil, o antimoniato N-metil glucamina, conhecido comercialmente como glucantime, vem sendo distribuído pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2006).

A demanda por novos fármacos leishmanicidas tem se intensificado com o aumento da resistência aos antimoniais pentavalentes, bem como a fármacos de segunda geração. Igualmente, o número de quimioterápicos disponíveis, principalmente para tratamento de doenças crônicas, está muito abaixo do satisfatório (VOULDOUKIS et al., 2006). Neste contexto, várias substâncias foram relatadas, porém nenhuma testada, ou mesmo em uso, apresentou eficácia e segurança adequadas (FRANCK et al., 2004; RAYCHAUDHURY et al., 2005). Desta

forma, considerando as dificuldades de tratamento e a ausência de vacinas, há urgência na busca de novas terapêuticas dentre as quais se incluem os medicamentos fitoterápicos (NAKAMURA et al., 2006).

1.1.4 Estrutura e fisiologia da pele

A pele, maior órgão do corpo humano, representa 15 a 20% do peso corpóreo e recobre aproximadamente 2 m² da superfície corpórea. O Sistema tegumentar é constituído por dois componentes principais que incluem (1) a pele e (2) os derivados epidérmicos, tais como as unhas, os pelos e as glândulas (glândulas sudoríparas, sebáceas e mamárias). A pele, particularmente, forma a cobertura externa do corpo, sendo constituída por duas camadas principais: a epiderme, constituída por epitélio pavimentoso estratificado ceratinizado e a derme, formada por tecido conjuntivo propriamente dito. Abaixo da derme encontra-se a hipoderme, a qual contém quantidades variáveis de tecido adiposo (KIERSZENBAUM e TRES, 2008; ROSS et al., 2011; GARTNER, HIATT e STRUM, 2011).

A pele desempenha importantes funções relacionadas com sua localização na superfície do corpo: protege contra lesões físicas, químicas e biológicas; impede a perda de água; serve como receptora para sensações gerais (dor, pressão, tato, temperatura); protege contra radiação ultravioleta; converte moléculas precursoras em vitamina D; funciona na regulação térmica; excreta algumas substâncias através das glândulas sudoríparas e participa da sinalização sexual. Além disso, certas substâncias lipossolúveis são absorvidas através da pele e, não sendo necessariamente uma função, mas sim uma propriedade, é aproveitada na administração de alguns agentes lipossolúveis terapêuticos para a pele (KIERSZENBAUM e TRES, 2008; ROSS et al., 2011).

A interação coordenada entre os diferentes tipos celulares presentes nas camadas da pele permite que este órgão responda, pronta e efetivamente, a uma variedade de estímulos nocivos que ocorrem na interface do organismo com o meio externo, garantindo assim a manutenção da homeostasia cutânea (WILLIAMS e KUPPER, 1996; BURBACH, et al., 2000; HAAKE et al., 2000). A camada córnea é rompida pelas estruturas anexas (folículos pilosos e glândulas sebáceas) e as

infecções nessas regiões são suprimidas pela resposta imune inata, que inclui vários elementos como os macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, bem como várias citocinas e quimiocinas. Além disso, também se verifica nas células epidérmicas a presença de receptores para agentes invasores como o CD14, receptores do tipo Toll (TLR: *toll-like receptors*) e receptores de manose (MR). A pele, além de ser um dos principais locais para a invasão de bactérias, fungos, parasitas e vírus, também é um importante local para a indução de tumores, porém todos esses processos são influenciados pela resposta imune adquirida, que inclui células dendríticas especializadas (ex.: células de Langerhans) e linfócitos T helper (Th1 e Th2). Nesse contexto, a pele é muito mais do que simplesmente uma barreira física passiva entre o meio externo e interno, mas também uma extensão do sistema imunológico (NORRIS, 2004).

Epiderme

A epiderme, de origem ectodérmica, representa a camada mais externa da pele, cuja espessura apresenta variações topográficas ao longo do organismo. Apresenta cinco estratos, cada qual com funções distintas (ROSS et al., 2011; GARTNER, HIATT e STRUM, 2011):

- 1) Estrato córneo – é a camada mais superficial e atua como uma grande barreira à penetração de organismos externos e toxinas, além de prevenir a perda de água;
- 2) Estrato lúcido – camada indistinta e homogênea de ceratinócitos e presente apenas em pele grossa. Suas células não possuem núcleo nem organelas e o seu interior é repleto de ceratina e eleidina;
- 3) Estrato granuloso – nessa camada inicia-se o processo de cornificação, onde as células sofrem apoptose diferenciando-se em corneócitos;
- 4) Estrato espinhoso – os ceratinócitos presentes nessa camada são responsáveis pela produção dos filamentos de ceratina (ceratinização) que interagem com os desmossomas, síntese de agentes antioxidantes (glutathion redutase, peroxidase, catalase), citocinas, quimiocinas, etc;

- 5) Estrato basal - camada mais profunda responsável pela proliferação celular, sendo essa camada resistente ao processo apoptótico.

A manutenção do número de células na epiderme depende do balanço entre proliferação e morte celular (diferenciação/apoptose) dos ceratinócitos, tipo celular predominante. Esse processo é controlado pela comunicação parácrina e autócrina via hormônios, fatores de crescimento e citocinas ou por comunicação intercelular via célula-célula e célula-matrix de adesão, ou ainda pela comunicação intercelular na região da *gap junction* (HAAKE et al., 2000; HAASS e HERLYN, 2005). A epiderme tem a capacidade de autorrenovação tanto sob condições homeostáticas como em condições nocivas, devido à presença de uma população celular mitoticamente ativa na camada basal. Em condições normais, a renovação epidérmica é balanceada pela descamação da camada córnea na superfície da pele, onde se verifica uma diferenciação celular progressiva, através do processo de ceratinização e cornificação, a partir da camada basal em direção à superfície (FUCHS e RAGHAVAN, 2002; CANDI et al., 2005). Assim, é de grande importância a regulação do processo de proliferação dos ceratinócitos, pois possíveis distúrbios no crescimento dessas células podem ser responsáveis pela patogênese de diversas doenças de pele, como por exemplo, psoríase e câncer de pele. Nos ceratinócitos, os responsáveis por esse controle são principalmente quinases dependentes de ciclinas, as quais orientam a transição entre as fases G1 e S do ciclo celular dessas células (GNIADOCKI, 1998).

Além dos ceratinócitos (80-85% da epiderme), assim chamados porque seu principal produto é a citoqueratina, proteína que forma os filamentos intermediários, outros tipos celulares podem ser encontrados na epiderme. São eles: os melanócitos (10-13% da epiderme) - células responsáveis pela produção de melanina que contribuem para a coloração da pele e para a proteção contra a radiação ultravioleta (UV); células de Langerhans (4% da epiderme) - células dendríticas derivadas de precursores da medula óssea, que atuam como células apresentadoras de antígenos, interagindo com as células T; células de Merkel (1% da epiderme) - células derivadas da crista neural envolvidas na sensação do tato (KIERSZENBAUM e TRES, 2008). Além das células residentes da epiderme (ceratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel), outras células migram para a epiderme em resposta aos mais variados estímulos os quais incluem os

linfócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, sendo essas células elementos da resposta de defesa inata ou adquirida (RANG et al., 2007).

Derme

A interface entre epiderme e derme é formada pela junção dermoepidérmica (JDE), uma região de membrana basal, cuja função é ligar a epiderme à derme e fornecer resistência contra forças externas. Além disso, uma vez que a epiderme não possui vasos sanguíneos, ela depende da derme para prover nutrientes e metabólitos. Tal junção também contribui para um suporte à epiderme, determina a polaridade do crescimento, direciona a organização do citoesqueleto nas células basais, desencadeia sinais de desenvolvimento e serve como uma barreira semipenetrável (GOLDSMITH et al., 2012).

A derme, de origem mesodérmica, é dividida em camada papilar, que é a camada mais próxima da epiderme, e a camada reticular, que é formada por um tecido conectivo denso e constitui a maior parte da derme (NORRIS, 2004). Sua constituição envolve polissacarídeos (hialuronidatos e condroitinsulfatos), substância fundamental (glicoproteínas, proteoglicanas e glicosaminoglicanas), material fibrilar (fibras colágenas, fibras elásticas e fibras reticulares), receptores sensoriais (ex.: corpúsculos de Meissner, corpúsculos de Pacini), células dérmicas (fibroblastos), vasos sanguíneos e linfáticos. As principais e mais abundantes células da derme são os fibroblastos, os quais são os responsáveis por sintetizar colágeno, elastina, glicosaminoglicanas, proteoglicanas, fibronectina e outras proteínas da matriz extracelular, ou seja, as proteínas responsáveis pela estrutura, resistência e elasticidade da pele (MAKRANTONAKI e ZOUBOULIS, 2007). É também a abundante matriz extracelular presente na derme, a responsável por tornar essa região o ambiente ideal para o tráfego e permanência de células como leucócitos. Assim, entre os componentes celulares residentes na derme encontram-se linfócitos, que em sua maioria são células T de memória, macrófagos, que representam a maior parte dos leucócitos presentes em uma derme saudável e também são encontrados mastócitos. Todas essas células tornam-se ativas ao primeiro estímulo

nocivo produzindo sinais que permitam o recrutamento de outras células inflamatórias como os neutrófilos (SPELLBERG, 2000). Os vasos sanguíneos presentes na derme permitem a infiltração de células migratórias importantes para a resposta de defesa inata ou imune e para o processo de cicatrização, como os macrófagos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos e outros (RYAN, 2004). As inervações vegetativas presentes na derme regulam glândulas sudoríparas, músculo pilo-erector e vasos sanguíneos, auxiliando no controle da temperatura corporal. Já a nervação sensitiva conduz estímulos mecânicos, térmicos, químicos e dolorosos para o sistema nervoso central (GOODWIN e WHEAT, 2004). Cabe-se ressaltar que em condições de inflamação e cicatrização hipertrófica, há um aumento da proliferação e da atividade dos fibroblastos e estes por sua vez, respondem a mediadores imunes, incluindo as citocinas IL-1 α e IL -1 β , pelo aumento da síntese de fator de crescimento de ceratinócitos, fator de crescimento hepático e outros (FREINKEL e WOODLEY, 2000).

Hipoderme

A hipoderme, ou camada subcutânea da pele, é uma continuação mais profunda da derme. Ela é formada por tecido conjuntivo frouxo e células adiposas que se organizam em uma camada de espessura variável, dependendo da sua localização corporal. A hipoderme facilita a mobilidade da pele e o tecido adiposo contribui para o isolamento térmico e o armazenamento de energia metabólica, bem como atua como um amortecedor de choques (KIERSZENBAUM e TRES, 2008).

1.1.4.1 Inflamação cutânea

A pele, por ser o maior órgão do corpo humano e ser a interface com o meio externo, está constantemente sujeita a lesões e invasão de patógenos, os quais

podem gerar diversos processos inflamatórios. A função de tal resposta, governada pela interação entre células e mediadores inflamatórios, é erradicar o agente agressor, de forma a evitar sua disseminação a outras regiões do organismo, promover o reparo tecidual e restabelecer a homeostasia da pele (FIRESTEIN, 2004). A falha nos mecanismos endógenos que controlam a inflamação pode fazer com que este processo, inicialmente resolutivo, desregule a homeostase do órgão, predispondo o mesmo a desenvolver processos inflamatórios crônicos (DEBENEDICTIS et al., 2001).

Calor, eritema, edema e dor, em nível clínico, caracterizam a resposta inflamatória. Contudo, se a mesma for exacerbada, pode promover uma descompensação fisiológica levando à perda de função do tecido e/ou órgão (RANG et al., 2007). A cascata de eventos desencadeada após uma agressão ou estímulo resulta no aumento do calibre microvascular, aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de leucócitos, como consequência de uma interação complexa entre diferentes tipos celulares residentes nos tecidos cutâneos (ceratinócitos, fibroblastos, mastócitos, células endoteliais, macrófagos) e vários mediadores pró-inflamatórios (NICKOLOFF e NESTLE, 2004; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Os mediadores pró-inflamatórios liberados durante o processo inflamatório, tanto pelas células residentes dos tecidos cutâneos quanto pelas células transientes que migram para o tecido inflamado (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos), incluem os metabólitos do ácido araquidônico (AA), histamina, serotonina, substância P, citocinas, óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (ROS, *reactive oxygen species*), entre outros (KUPPER^a, 1990; SIMMONS, 2006).

Os ceratinócitos constituem as células envolvidas na primeira linha de defesa do sistema imune cutâneo devido à produção de vários mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas, cuja produção se mostra consideravelmente aumentada após a ativação dessas células por diferentes estímulos (WILLIAMS e KUPPER, 1996). Fibroblastos, células endoteliais, melanócitos e macrófagos também produzem diversas citocinas mediante um estímulo (KUPPER^a, 1990; BURBACH et al, 2000). Os ceratinócitos armazenam grande quantidade de IL-1 em seu citoplasma, podendo liberá-la quando danificados, iniciando uma cascata inflamatória. Em resposta, ceratinócitos vizinhos liberam mais IL-1 α , assim como IL-1 β , fator de necrose tumoral (TNF) - α e IL-6, amplificando o sinal inicial. Concomitantemente, os ceratinócitos produzem quimiocinas, incluindo IL-8 e fatores

de crescimento, como IL-7 e IL-15, que facilitam sua sobrevivência e induzem à ativação de leucócitos em resposta às quimiocinas (SPELLBERG, 2000). Entretanto, entre todas as citocinas produzidas pelos ceratinócitos, somente as primárias (IL-1 α , IL-1- β e TNF- α) ativam um número suficiente de mecanismos efetores capazes de desencadear uma resposta inflamatória cutânea (KUPPER, 1990^b).

A exposição celular às citocinas primárias (IL-1 e TNF- α) resulta na ativação de algumas vias de sinalização, como das proteínas quinases (PKC, PKA) e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), que culmina na estimulação da atividade de alguns fatores de transcrição nuclear, como o fator de transcrição nuclear-kB (NF-kB) e a proteína ativadora-1 (AP-1). Estes fatores de transcrição quando ativados induzem a transcrição gênica de diversas citocinas (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF, TGFB1 - fator de crescimento tumoral), quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios secundários óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) e ciclo-oxigenase-2 (COX-2) (DELHASE, 2003; WINYARD, 2003; PASCUAL e GLASS, 2006). Assim, a principal função da IL-1 e do TNF- α , é desencadear a resposta inflamatória inata e atuar como uma molécula co-estimulatória da resposta imunológica (UCHI et al., 2000). Além disso, o TNF- α também tem um papel importante no processo de remodelação do tecido após um dano, pois atua como fator angiogênico e como fator de crescimento dos fibroblastos (BURBACH et al., 2000).

Os metabólitos do AA (prostanoides) também desempenham um papel importante no processo inflamatório cutâneo, uma vez que estes mediadores possuem uma ampla ação mediada por receptores específicos presentes em células-alvo (KABASHIMA e MIYACHI, 2004). A produção das prostaglandinas e dos leucotrienos é iniciada com a liberação do AA a partir dos fosfolipídios de membrana, através de uma reação catalisada pela fosfolipase A2 (PLA2). Esta enzima é ativada em resposta a vários estímulos, tais como a ação da trombina nas plaquetas, do fator do complemento C5a nos neutrófilos, da bradicinina nos fibroblastos, das reações antígeno-anticorpo nos mastócitos e da lesão celular promovida por diferentes agentes (ERO, UV-B, agentes químicos etc) (RANG et al., 2007). O AA liberado serve de substrato para as duas isoformas da enzima ciclo-oxigenase (COX-1 e COX-2), onde é convertido em prostaglandinas e tromboxanos (PGE2, PGD2, PGF2 α , PGI2, TXA2), e também para a 5-lipo-oxigenase (5-LOX), sendo convertido em leucotrienos (LTB4, LTC4, LTD4, LTE4) por essa via

metabólica. Na pele normal, a COX-1 está distribuída em toda a epiderme, enquanto a COX-2 se localiza principalmente nos ceratinócitos supra-basais, sendo prontamente induzida frente a um estímulo inflamatório (LEE et al., 2003; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). A principal prostaglandina presente no tecido cutâneo é a prostaglandina E2 (PGE2), a qual modula vários eventos inflamatórios cutâneos, como o aumento da permeabilidade vascular e a vasodilatação, o que contribui na formação do edema e na adesão e diapedese dos neutrófilos e monócitos (LEE et al., 2003).

A histamina também desempenha uma ação importante durante o processo inflamatório cutâneo. A histamina atua em muitos processos fisiológicos celulares, mas também intervêm nas reações alérgicas e na inflamação. Esse é um dos principais motivos dos mastócitos estarem estrategicamente localizados na microvasculatura dos tecidos que estão em contato com o meio externo como a pele, os pulmões e intestinos. A liberação da histamina ocorre pelo processo de exocitose durante as reações inflamatórias ou alérgicas através da interação de fatores do sistema complemento (C3a e C5a) e de antígenos com anticorpos IgE fixados nos mastócitos. Após a degranulação dos mastócitos, a histamina atua em receptores específicos (receptores histaminérgicos) promovendo a constrição do músculo liso, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e prurido (SILVA e CARVALHO, 2004; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; RANG et al, 2007). Outros mediadores químicos como a serotonina, substância P e neurocinina A também participam da regulação dos processos vasculares, contribuindo assim na resposta inflamatória (HOLZER, 1991).

Uma variedade de condições patológicas internas e sistêmicas pode ser refletida na pele. Estas incluem: diabetes mellitus, arterosclerose, doenças inflamatórias, estresse mental e envelhecimento. Desta forma, a pele serve como um indicador de desordens endógenas e, nela também, refletem-se os danos oriundos da produção excessiva de radicais livres (PORTUGAL et al., 2007). Um aumento dos níveis de ROS na pele pode levar a danos celulares que promovem várias condições patológicas, como respostas inflamatórias (SONG et al., 2008). Portugal e colaboradores (2007) descrevem que a superprodução ou remoção ineficiente de radicais livres, denominada estresse oxidativo, contribui para surgimento de condições lesivas à pele, expressas por eritema, edema, envelhecimento,

inflamação, manifestação autoimune, hipersensibilidade, ceratinização anormal e câncer de pele.

Para que a função homeostática do sistema imune cutâneo funcione de maneira apropriada, os diversos sinais pró-inflamatórios, que podem ser gerados pelas células dessa região, devem ser contrabalanceados por mecanismos capazes de promover a resolução de um processo inflamatório cutâneo. Possíveis falhas nesses mecanismos podem predispor ao desenvolvimento de processos inflamatórios crônicos na pele (WILLIAMS e KUPPER, 1996; BUCKLE e HEDGECOCK, 2007). Os receptores e as vias de sinalização que iniciam e promovem a resposta inflamatória são bem caracterizados, entretanto pouco se sabe a respeito de como essa resposta aguda é reparada de forma a impedir que evolua para uma inflamação crônica. Para uma resolução bem sucedida é de fundamental importância uma neutralização e remoção dos agentes que causaram o processo inflamatório. Uma falha nessa etapa inicial certamente poderá levar a cronificação (WILLOUGHBY et al., 2000; LAWRENCE e GILROY, 2007).

As doenças de pele podem ser desencadeadas tanto por estímulos endógenos como mutações gênicas, quanto por estímulos exógenos como a exposição a agentes irritantes. São diversos os tipos de doenças cutâneas as quais são geralmente marcadas por características como interrupção da barreira e consequente perda da função de proteção, inflamação, sensibilização e alterações no padrão de proliferação e diferenciação de ceratinócitos (PROKSCH et al., 2008).

A dermatite de contato é uma dermatose inflamatória frequente nos países industrializados, sendo uma das doenças ocupacionais mais comuns. É caracterizada por eritema, pápulas e vesículas, seguidas de ressecamento e descamação. De acordo com os mecanismos fisiopatológicos envolvidos, podem-se distinguir dois tipos de dermatite de contato: a dermatite de contato irritativa, decorrente dos efeitos tóxicos e pró-inflamatórios de xenobióticos capazes de ativar a imunidade inata da pele; e a dermatite de contato alérgica, também conhecida como hipersensibilidade de contato, que requer a ativação da imunidade adquirida antígeno-específica, levando ao desenvolvimento de células T efectoras, que são mediadoras da inflamação cutânea. É induzida pelo contato de substâncias químicas não proteicas denominadas de haptenos (por exemplo, níquel, cromo, dinitrofluorbenzeno e oxazolona) (HENNINO et al., 2005).

A dermatite atópica é uma doença inflamatória da pele associada com hiperreatividade cutânea a estímulos normalmente inócuos a indivíduos não-atópicos. Vários estudos indicam que a dermatite atópica apresenta etiologia complexa, com ativação de diferentes vias imunológicas e inflamatórias. O fenótipo clínico que caracteriza essa doença é um produto de complexas interações entre susceptibilidade a genes, o organismo do paciente, defeitos na função de barreira da pele e respostas imunológicas locais e sistêmicas. Vários estudos têm sido realizados a fim de compreender o papel destes diferentes fatores na patogênese da dermatite atópica, devido à alta incidência desta doença que aparece normalmente durante a infância, mas pode persistir ou aparecer na fase adulta (SOARES, 1995; LEUNG et al., 2004). É caracterizada por um eritema mal definido com presença de edema, vesículas com exsudato em estágios agudos e aumento da espessura da pele (liquenificação) (WILLIAMS, 2005). O principal sintoma é o prurido, que pode começar antes mesmo das lesões cutâneas se manifestarem. Na infância, as lesões são avermelhadas e descamativas. Podem atingir a face, tronco e membros. Com o ato de coçar, tornam-se escoriadas e podem sofrer infecção secundária. Nos adolescentes e adultos, as lesões localizam-se preferencialmente nas áreas de dobras da pele, como a região posterior dos joelhos, pescoço e dobras dos braços. A pele destes locais torna-se mais espessa, áspera e escurecida (SAMPAIO, CASTRO e RIVITTI, 2000).

A psoríase representa uma doença inflamatória crônica. Afeta aproximadamente 2 a 3% da população mundial e apresenta caracteristicamente remissão e exacerbação espontâneas. A psoríase pode iniciar em qualquer idade, porém estudos epidemiológicos revelam que o seu início é mais comum entre os 15 e 25 anos. Atualmente, é reconhecida como uma doença autoimune causada por uma ativação inapropriada do sistema imune celular, sendo caracterizada como uma doença pápulo-escamosa, como consequência da hiperproliferação excessiva dos ceratinócitos e da formação de um foco inflamatório. A sua patogenia envolve a integração de leucócitos infiltrados no tecido cutâneo (células T, neutrófilos e mastócitos), células residentes e uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento e eicosanoides (NICKOLOFF e NESTLE, 2004; KRUEGER e BAWCOCK, 2006).

As doenças dermatológicas inflamatórias como os eczemas e a psoríase apresentam lesões cutâneas de aspecto inestético, o que perturba significativamente

os doentes, obrigando-os a tratamentos prolongados e diversos. São múltiplos os recursos terapêuticos para estas situações. No entanto, a exigência de terapêutica persistente, prolongada e distinta não contribui para um tratamento eficaz e de boa adesão dos doentes. Estas dificuldades são acrescidas pelas ondas de recorrência que contribuem para o desenvolvimento de situações de ansiedade, as quais podem, por sua vez, ser responsáveis por exacerbações das lesões. Assim, a busca por novas estratégias que se mostrem seguras e eficazes em prevenir a formação de edema, o extravasamento plasmático e o recrutamento de mediadores inflamatórios é um caminho promissor para se encontrar terapias adequadas no combate de reações inflamatórias excessivas (SEELIGER et al., 2003; MAN et al., 2008). Uma alternativa interessante nessa busca por novas terapias seria a utilização de plantas medicinais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Aprofundar o estudo químico, farmacológico e toxicológico da partição hexânica (PHEX) de *Lacistema pubescens*.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar quimicamente a PHEX;
- Biomonitorar o fracionamento para a atividade citotóxica frente a linhagens de células tumorais e de *Leishmania in vitro*;
- Verificar a toxicidade em células não tumorais;
- Identificar as substâncias potencialmente bioativas da PHEX;
- Avaliar a atividade citotóxica das frações semipurificadas sobre células tumorais e espécies de *Leishmania*;
- Avaliar, *in vivo*, a toxicidade tópica aguda da PHEX;
- Avaliar, *in vivo*, o efeito anti-inflamatório tópico agudo da PHEX pelos modelos do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, ácido araquidônico, capsaicina, fenol, histamina e etil fenil propionato (EPP);
- Avaliar, *in vivo*, o efeito anti-inflamatório tópico crônico da PHEX utilizando o modelo de edema de orelha mediado pela aplicação múltipla do óleo de cróton;
- Avaliar, *in vivo*, o efeito anti-inflamatório tópico agudo das frações semipurificadas;
- Avaliar os parâmetros de inflamação (hiperproliferação celular, edema e infiltração leucocitária) por meio da análise histopatológica das biópsias das orelhas obtidas nos modelos de edema de orelha induzido pela aplicação simples de óleo de cróton e pela aplicação múltipla deste mesmo agente flogístico;
- Avaliar, *in vitro*, a atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO);

- Investigar os possíveis efeitos adversos cutâneos e sistêmicos desenvolvidos a partir do tratamento tópico com a PHEX em modelos de atrofia cutânea e cicatrização;
- Incorporar a PHEX em uma formulação para uso tópico;
- Propor mecanismos de ação das atividades farmacológicas encontradas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

As folhas de *L. pubescens* foram coletadas em Matias Barbosa, Minas Gerais, Brasil, em época de frutificação (dezembro de 2011) no período da manhã. Uma exsicata de *L. pubescens* foi depositada no herbário Leopoldo Krieger CESJ da UFJF sob o número 49751 e identificada pela Dr^a Fátima Regina Gonçalves Salimena, do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF.

3.2 Preparo do extrato bruto metanólico (EBM) e partição hexânica (PHEX)

As folhas coletadas foram secas à sombra, em local ventilado e em temperatura ambiente (25 °C). Depois de seco e triturado, o material (375 g) foi submetido à extração por maceração estática com metanol (MeOH), à temperatura ambiente, até a exaustão. Em seguida, o extrato foi concentrado à pressão reduzida utilizando-se evaporador rotatório para obtenção do extrato bruto metanólico (EBM - 74 g), um resíduo de coloração verde escura. Desta forma, o rendimento do extrato foi de 20%.

Cinquenta e três gramas do EBM, após completa remoção do solvente, foram ressuspensos em MeOH:H₂O (8:2) e, em seguida, particionado com o solvente hexano (5 X 200 ml). Posteriormente, o solvente foi evaporado utilizando-se evaporador rotatório e a partição hexânica (PHEX – 16 g) foi pesada e mantida sob -refrigeração.

3.3 Métodos cromatográficos e espectrométricos

3.3.1 Cromatografia de adsorção

Na cromatografia de adsorção para fracionamento da PHEX foi utilizada coluna cromatográfica em sílica gel (Merck, 70 - 230 mesh ASTM). Os eluentes utilizados foram hexano, acetato de etila e metanol, puros ou combinados em proporções crescentes de polaridade.

Para a cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatoplasmas revestidas com sílicagel 60 F₂₅₄ (Merck). A revelação dos componentes das amostras foi obtida por exposição em câmara de luz ultravioleta (UV- 254 e 365 nm) e /ou por aspensão com reagentes específicos seguidos ou não de aquecimento em estufa a 100 °C por aproximadamente 5 min. Após fracionamento, as amostras foram concentradas à pressão reduzida, com auxílio do evaporador rotatório, pesadas e mantidas sob-refrigeração até a realização dos testes biológicos.

3.3.2 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

As análises cromatográficas para separação e identificação dos constituintes da PHEX de *L. pubescens* foram realizadas na Plataforma Analítica de Farmanguinhos, FIOCRUZ/RJ. A Cromatografia Gasosa (CG) foi realizada em cromatógrafo Hewlett Packard 6890 Series acoplado a um detector seletivo de massas Hewlett-Packard 5972 equipado com uma coluna capilar DB-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm); hélio como gás de arraste com razão de fluxo de 0,5 mL/min; temperatura programada de 70 °C a 325 °C (2 °C/min); injetor com temperatura de 250 °C e detector com temperatura de 300 °C e energia de ionização de 70 eV. Os métodos utilizados na plataforma analítica incluem aqueles relacionados à identificação de diterpenos, sesquiterpenos e triterpenos, com tempos de corrida de 60 minutos (método PMA 46) e 75 minutos (método JUN).

3.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada em um aparelho Agilent Technologies Série 1200, constituído de uma bomba quaternária e com detector DAD - UV e injetor automático. A coluna empregada foi uma Zorbax SB - C18 (250 mm x 4,6; 5 μ m). As amostras foram solubilizadas nas fases móveis empregadas (metanol-acetonitrila; 70:30 v/v) e previamente filtradas antes de serem injetadas em um volume de 20 μ L, em uma concentração de 1 mg/mL. O fluxo foi de 1 mL/min. Os solventes empregados apresentavam grau HPLC, além de serem adequadamente filtrados antes das análises. A detecção foi realizada em comprimento de onda de 210 nm.

3.4 Fracionamento dos constituintes químicos de *L. pubescens*

3.4.1 Fracionamento da PHEX

A partição hexânica (6 g) foi fracionada usando coluna cromatográfica (CC) de tamanho 42 x 5 cm com suporte de sílica-gel, com gradiente crescente de eluição: hexano - acetato de etila (90:10 v/v – 100% de acetato de etila) e acetato de etila – metanol (90:10 v/v – 100% de metanol) o que gerou um total de 17 frações (FH1 a FH17). Estas frações foram analisadas e agrupadas com base nos perfis obtidos por CCD.

3.4.2 Fracionamento da FH9 obtida da PHEX

A fração FH9 (802 mg) foi refracionada por cromatografia líquida em coluna (45 x 2,5 cm) com suporte de sílica e eluída com hexano – acetato de etila (90:10 v/v a 20:80 v/v) e acetato de etila-metanol (90:10 v/v a 50:50 v/v) para obter 12 frações

(FH9F1 a FH9F12), agrupadas pela semelhança nas análises em CCD. A figura 4 representa o fluxograma da extração, partição e fracionamento de *L. pubescens*.

3.5 Detecção dos constituintes químicos de *L. pubescens*

A PHEX e frações (FH1 a FH17; FH9F1 a FH9F12) foram analisadas por CG-EM. Os constituintes da amostra foram identificados por comparação de seus espectros de massas com aqueles da biblioteca Wiley 275.1 e NIST e por fragmentação de massas da literatura (ADAMS, 1995). Ainda, a identificação das substâncias presentes em PHEX foi confirmada por CLAE-DAD-UV, com a utilização de padrões autênticos como marcadores.

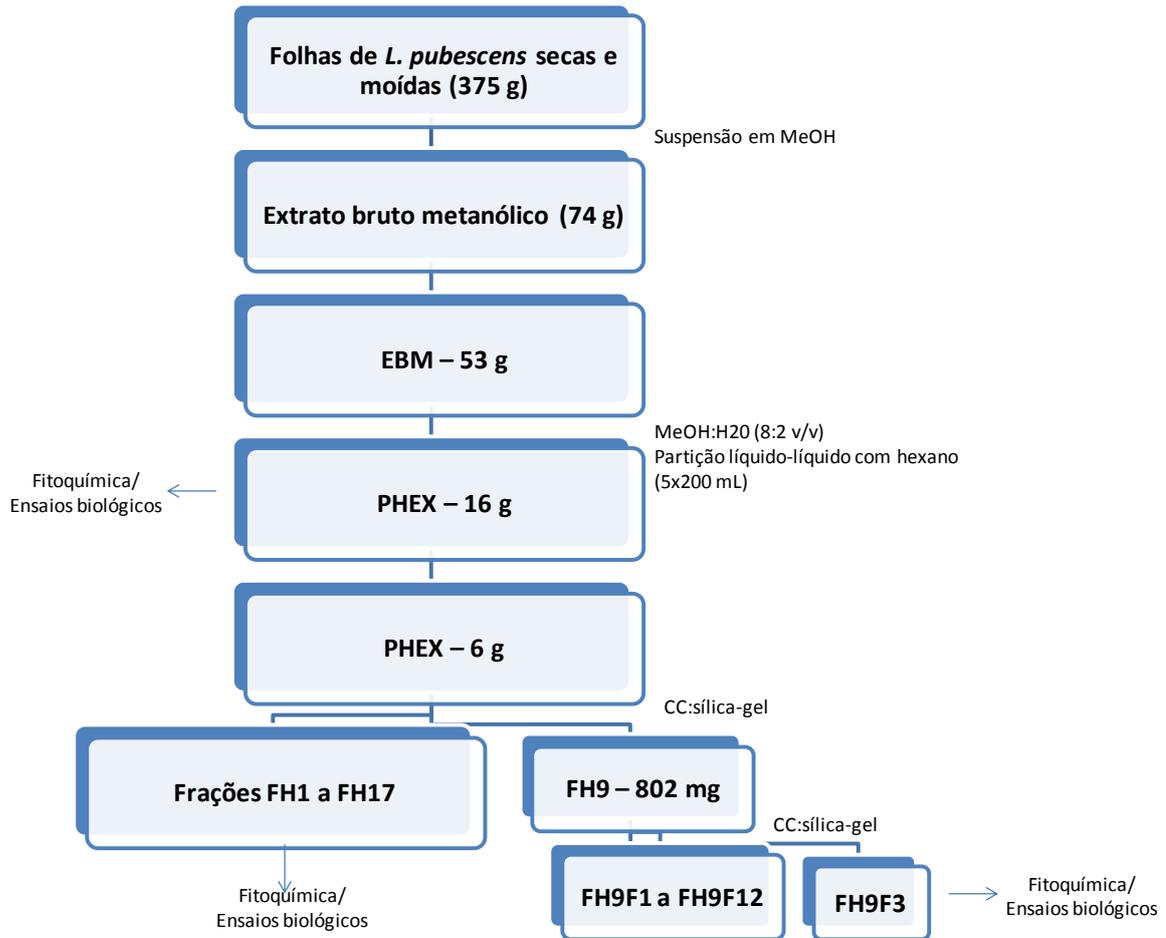


Figura 4 Fluxograma da extração, partição e fracionamento de *L. pubescens* / ¹CC – cromatografia em coluna.

3.6 Atividades biológicas *in vitro*

3.6.1 Atividade citotóxica para linhagens tumorais

A determinação da atividade citotóxica, realizada com PHEX, frações (FH1 a FH17) e FH9F3 sobre linhagens de células tumorais, foi avaliada pela inibição da viabilidade celular por meio da metabolização do brometo de 3-(4,5-dimethyltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) (MOSSMAN, 1983). O MTT foi também utilizado para a determinação da citotoxicidade das amostras em células não tumorais. Foram

utilizadas as seguintes linhagens tumorais: células Jurkat (células leucêmicas de linfócitos T), células HL60 (leucemia promielocítica humana) e MCF-7 (células de adenocarcinoma de mama humano). A linhagem de célula não tumoral utilizada foi a 3T3 (fibroblasto de embrião de camundongos).

As linhagens foram mantidas na fase logarítmica de crescimento em meio RPMI 1640 ou DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, sem fungizon, enriquecido com 2 mM de L-glutamina e 10% (para células leucêmicas) ou 5% (para células aderentes) de soro bovino fetal (SFB). Todas as culturas foram mantidas a 37 °C em uma incubadora umidificada com 5% CO₂ e 95% de ar. As suspensões celulares foram semeadas em microplacas de 96 poços contendo 1x10⁵ células/poço para as linhagens HL60, Jurkat, MCF-7 e 3T3. As placas foram pré-incubadas por 24 h a 37 °C para permitir a adaptação das células antes da adição das amostras. Posteriormente, foram adicionadas as amostras na concentração de 100 µg/mL. As amostras mais ativas foram adicionadas em diferentes concentrações (100 a 1,56 µg/mL) para determinação da concentração inibitória (CI₅₀). As placas foram incubadas por 48 h a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade relativa e a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT. Após período de incubação com as amostras, 20 µL de solução de MTT (5 mg/mL em tampão fosfato) foram adicionados a cada poço e incubados por 4 h. Ao final deste período, o sobrenadante foi removido e 200 µL de 0,04 M de HCl em álcool isopropílico foram adicionados para dissolver os cristais formazan.

Os grupos controle incluíram o tratamento com 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO - controle negativo), etoposídeo (controle positivo) e um controle de células (CC) em que há apenas meio e células, sem DMSO. Todas as amostras foram dissolvidas em DMSO, antes da diluição. Para comparação, a citotoxicidade do etoposídeo foi avaliada sob as mesmas condições experimentais. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e expressos como a média de três experimentos independentes. A densidade óptica (DO) foi avaliada em espectrofotômetro a 590 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de proliferação celular, em comparação com o controle negativo. A partir do teste de viabilidade celular foi determinada a concentração inibitória (CI₅₀) para cada amostra mais ativa, que representa a concentração molecular que inibe 50% do crescimento

celular. Os dados foram analisados usando o programa Prism 5.0 (GraphPad Software).

3.6.2 Atividade leishmanicida

3.6.2.1 Avaliação da citotoxicidade em promastigotas de *Leishmania*

A determinação da atividade antipromastigota foi realizada com a PHEX e frações (FH1 a FH17 e FH9F3) utilizando o método do MTT (MOSSMAN, 1983). Neste trabalho, foram utilizadas espécies encontradas tanto no Velho Mundo (*L. major*), quanto no Novo Mundo (*L. amazonensis*, *L. chagasi*, *L. braziliensis*).

As cepas de referência utilizadas foram *L. major* (MRHO/SU/59/P), *L. braziliensis* (MHOM/BR/M2903), *L. chagasi* (MHOM/BR/PP75) e *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8). As formas promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas em meio Warren (Infusão de coração e cérebro - BHI, acrescentado de hemina e ácido fólico) (WARREN, 1960); *L. major* e *L. braziliensis* foram cultivadas em meio BHI (Infusão de coração e cérebro, suplementado com L-glutamina); *L. chagasi* em meio 199, suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF) e mantidas a 26 °C através de repiques realizados em intervalo de quatro dias, sendo coletadas em fase logarítmica de crescimento.

As formas promastigotas de *L. major*, *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *L. amazonensis* obtidas a partir da fase logarítmica de crescimento foram contadas em câmara de Neubauer e lançadas à razão de 2×10^6 células/mL (*L. amazonensis*) e 3×10^6 células/mL (*L. major*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*) em placa de 96 poços e incubados a 26 °C. As amostras testadas foram adicionadas em diferentes concentrações (100 a 6,25 µg/mL), após diluição em DMSO sendo que a maior concentração utilizada de DMSO foi de 0,8% (v/v), que não é citotóxica para os parasitos. Em alguns poços não houve adição de substâncias, os quais foram utilizados como controle negativo. Após 72 h de incubação em estufa a 26 °C, adicionou-se 10 µL do MTT a 5 mg/mL em cada poço e a placa permaneceu incubada por mais 4 h sob as mesmas condições. A reação foi interrompida pela adição de 100

μL de 2-propanol/ácido clorídrico (solução de 2-propanol/HCl a 0,4%) e o material dissolvido foi lido em espectrofotômetro a 570 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle negativo. A partir do teste de viabilidade celular foi determinada a concentração inibitória (CI_{50}) para cada amostra que representa a concentração molecular que inibe 50% do crescimento parasitário. Os valores de CI_{50} foram estimados a partir dos valores médios de três experimentos independentes, realizados em triplicata, por interpolação gráfica utilizando o programa estatístico Grafit5. Anfotericina B e Miltefosina foram utilizados como fármacos de referência.

3.6.2.2 Avaliação do efeito citotóxico frente a macrófagos inflamatórios de camundongos BALB/c

Para avaliar o efeito citotóxico da PHEX e frações, camundongos BALB/c foram previamente estimulados com 2 mL de meio estéril tioglicolato a 3%. Após 72 h, os animais foram sacrificados e 5 mL de meio 199 foram injetados no peritônio dos camundongos. Após massagem do local e aspiração do meio 199 contendo as células residentes do peritônio, as células foram centrifugadas por 10min a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em meio RPMI-1640, sendo retirada uma alíquota para a contagem em câmara de Neubauer. Em seguida, adicionou-se 100 μL de uma suspensão de 2×10^6 células/mL em meio RPMI-1640 suplementado com 10% SBF em cada poço da placa de 96 poços que permaneceu por 16 h em estufa com 5% de CO_2 a 37 °C para a adesão dos macrófagos na placa. Posteriormente, cada poço foi lavado com 100 μL de PBS estéril para retirada das células não aderidas; adicionou-se meio RPMI-1640 contendo 10% SBF e, na sequência, foram realizadas diluições seriadas da PHEX e frações, utilizando-se a concentração máxima de 100 $\mu\text{g/mL}$. As células foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO_2 . Após 72 h de tratamento, a viabilidade dos macrófagos foi determinada pela adição de 10 μL de MTT (MOSSMAM, 1983) a 5 mg/mL e confirmada pela comparação da morfologia dos macrófagos tratados com o grupo controle não tratado, via microscópio óptico invertido. Após 2 h, a reação foi interrompida pela adição 100 μL de

isopropanol/ácido clorídrico (solução de isopropanol/HCl a 0,4%) e a leitura realizada em espectrofotômetro de microplacas a 570 nm. Cada concentração das amostras foi avaliada em triplicata. Em alguns poços não houve adição de amostras (controle negativo), os quais foram plaqueados com 100 µL de meio RPMI-1640 suplementado com 10% SBF. A concentração da amostra que reduziu 50% da viabilidade dos macrófagos em comparação com o controle sem tratamento (CC₅₀) foi calculada pelo programa estatístico Probit considerando a média de três experimentos independentes realizados em triplicata.

3.6.2.3 Avaliação do efeito citotóxico em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*

Os ensaios anti-amastigotas foram realizados com a PHEX e FH7. Foram utilizados neste ensaio macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e infectados com *L. amazonensis*. Em cada poço da placa de 24 poços contendo lamínulas de vidro (13 mm de diâmetro), adicionou-se 300 µL de uma suspensão de 2×10^6 células/mL em meio RPMI-1640 contendo 10% SBF. A placa foi incubada em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ durante 16h para a adesão dos macrófagos. Posteriormente, as células foram lavadas com 300 µL de PBS estéril para retirada das células não aderidas e adicionou-se em cada poço 300 µL de uma suspensão de 20×10^6 promastigotas em fase estacionária/mL em meio RPMI-1640 suplementado com 10% SBF. Após um período de 4 h de interação em estufa a 33 °C com 5% CO₂, cada poço foi lavado seis vezes com 300 µL de PBS estéril para retirada dos promastigotas não fagocitados. As amostras a serem testadas foram adicionadas em diferentes concentrações e após 72 h de tratamento em estufa a 33 °C com 5% de CO₂, as células foram fixadas com etanol absoluto, submetidas à desidratação em soluções contendo acetona e xilol em diferentes proporções (acetona pura, 90% acetona/10% xilol, 50% acetona/50% xilol, 90% xilol/10% acetona e xilol puro) e coradas com Giemsa. Ao final, as lamínulas foram montadas com bálsamo do Canadá sobre lâmina de vidro e analisadas em microscópio. A carga parasitária global foi avaliada pela contagem por microscopia de luz do número de amastigotas intracelulares e macrófagos infectados e não infectados

(total de 100 células infectadas). A partir da carga parasitária global foi determinada a concentração necessária para inibir 50% do crescimento parasitário (CI_{50}) por extrapolação gráfica da curva dose-resposta. A análise foi realizada pelo programa estatístico Probit que considerou a média de dois ou três experimentos independentes realizados em triplicata. Anfotericina B e miltefosina foram utilizados como fármacos de referência (controle positivo).

3.6.2.4 Índice de seletividade e índice de especificidade das amostras

O índice de seletividade (IS) determinou a relação entre citotoxicidade das amostras para células de mamíferos e sua atividade leishmanicida. O cálculo foi realizado a partir da razão entre a citotoxicidade para macrófagos (CC_{50}) e a atividade contra promastigotas e amastigotas (CI_{50}). Valores de $IS > 2,0$ indicaram que a amostra foi mais tóxica para o parasito em relação à célula hospedeira. Valores de $IS < 2,0$ demonstram toxicidade da amostra para macrófagos (HOUGHTON et al., 2007).

O índice de especificidade (IE) estabeleceu a especificidade das amostras para as formas promastigotas e amastigotas. Foi calculado pela razão entre o CI_{50} em promastigota e o CI_{50} em amastigota. Valores de $IE > 2,0$ indicaram que a amostra foi mais ativa para amastigotas. Valores de IE inferiores a 0,4 sugerem que a amostra foi mais eficaz em promastigota. Amostras com valores de IE entre 0,4 e 2,0 foram consideradas ativas (DE MUYLDER et al., 2011).

3.6.2.5 Determinação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^7 células/mL) foram cultivadas durante 24, 48 e 72 h na ausência ou na presença de 88,0 e 176,0 $\mu\text{g/mL}$ de FH7 a 25°C. As células foram coletadas, ressuspensas em solução salina de Hank's (HBSS) e em câmara de Neubauer foi contado o número de células. Promastigotas (5×10^6 células/mL) foram incubadas com JC-1 (10 $\mu\text{g/mL}$) durante 20 minutos na

ausência de luz a 37°C. Após lavar duas vezes com HBSS, a fluorescência foi medida a 528 nm e 600 nm, utilizando o comprimento de onda de 485 nm (RIBEIRO et al., 2013). O valor relativo do $\Delta\psi_m$ foi quantificado utilizando a razão entre a leitura a 600 nm e leitura a 528 nm. Miltefosina (9 µg/mL) foi utilizada como controle positivo.

3.6.2.6 Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para avaliar o efeito de FH7 sobre a geração de ROS intracelular, foi utilizada a sonda fluorescente (2',7'-diclorofluoresceína diacetato) H₂DCFDA, segundo Fonseca-Silva e colaboradores (2011). Esta sonda é um éster de acetato permeável em células vivas, e quando entra na célula poder ser clivada por esterases celulares e reagir com ROS celular (produzido durante períodos de stress oxidativo) para emitir fluorescência verde através da conversão em diclorofluoresceína (DCF) (KATHURIA et al., 2014). Resumidamente, promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas durante 24, 48 e 72 h, na ausência ou na presença de 88,0 µg/mL e 176,0 µg/mL de FH7. Promastigotas foram então coletadas, ressuspendidas em PBS e a concentração do parasito foi ajustada para 4×10^7 promastigotas em 200 µL de PBS. Em seguida, 20 µM of H₂DCFDA foi adicionado, e as amostras foram incubadas durante 30 min a 37 °C no escuro. A fluorescência foi monitorada utilizando um comprimento de onda de excitação e emissão de 485 e 528 nm, respectivamente. Miltefosina (9 µg/mL) foi utilizada como um controle positivo.

3.6.2.7 Determinação da integridade da membrana celular

Promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^7 células/mL) foram tratadas com 88,0 e 176,0 µg/mL de FH7 por 24, 48 e 72 h a 25°C, coletadas, lavadas com PBS, ressuspendidas em PBS e incubadas com 1 µg/mL de Iodeto de Propídeo (IP) durante 15 min no escuro. A espectrometria de fluorescência foi realizada utilizando

um comprimento de onda de excitação de 540 nm e um comprimento de onda de emissão de 600 nm. Como controle positivo, as células aquecidas a 65 °C durante 10 min foram utilizadas para se obter um valor máximo de intensidade de fluorescência (LOPES et al., 2012).

3.7 Atividades biológicas *in vivo*

3.7.1 Animais

Para os ensaios *in vivo* foram utilizados camundongos machos Swiss (*Mus musculus*) pesando entre 25 e 35 g e ratos machos da linhagem Wistar pesando entre 160 e 200 g (*Rattus norvegicus*) provenientes do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais ficaram alojados em gaiolas e mantidos em condições controladas de temperatura (23 °C ± 2 °C) e iluminação (ciclo de claro/escuro de 12h), com água e ração comercial (Nuvital™) *ad libitum* para os testes de uso tópico. Antes dos ensaios os animais permaneceram no laboratório por um período mínimo de adaptação de 72 h. Para os experimentos foram utilizados grupos de 5 - 8 animais. Todos os protocolos experimentais e procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (protocolos 021/2012, 013/2013 e 016/2013 da CEEA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFJF.

3.7.2 Teste de irritação/corrosão da pele

O teste de irritação/corrosão dérmica aguda foi realizado de acordo com as orientações da OECD 404 (2002) com algumas modificações. Foram utilizados seis ratos saudáveis e com a pele intacta. No dia anterior ao teste (dia 0), os animais

foram divididos nos seguintes grupos experimentais: controle negativo (n = 3) e teste (n = 3) e anestesiados com cetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) intraperitonealmente (ip). Após serem colocados em decúbito ventral, os animais tiveram a região dorsocostal tricotomizada com auxílio de uma máquina para epilação e foram colocados em gaiolas individuais para repouso por 24 h. No dia seguinte (dia 1), os animais com a pele intacta foram escolhidos e os tratamentos foram aplicados em uma pequena área de maneira uniforme (cerca de 6 x 3 cm²). Estes foram espalhados com auxílio de uma espátula e cobertos com gaze, a qual foi mantida em contato com a pele por meio de uma fita hipoalergênica. O período de exposição aos tratamentos foi de 4 h e ao final os resíduos da amostra foram removidos utilizando água destilada, de forma a não alterar a resposta existente ou a integridade da epiderme. Todos os animais foram examinados para sintomas de eritema e edema, de acordo com sistema de escores de irritação dérmica de Draize (0, nenhum eritema ou edema; 1 eritema ou edema muito leve; 2 eritema bem definido ou edema leve; 3 eritema moderado a severo ou edema moderado e 4 eritema grave com formação de escaras ou edema grave, superior a 1 mm) sendo as respostas avaliadas em 60min e, em seguida nos intervalos de 24, 48 e 72 h após remoção das amostras. Além da observação de irritação, todos os efeitos tóxicos locais, como o ressecamento da pele e quaisquer efeitos adversos sistêmicos (sinais clínicos de toxicidade, peso, consumo de água e ração), foram integralmente registrados por 14 dias.

O índice de irritação primária (IIP) foi calculado e classificado de acordo com o método de Draize usando escores de IIP como não irritante (se $IIP < 0,5$), fracamente irritante (se $IIP < 2$), moderadamente irritante (se $IIP \leq 2-5$) e severamente irritante (se $IIP > 5$). Para cada animal, os escores da resposta dérmica (soma dos escores para a formação de eritema e edema) nos tempos 60 min, 24, 48 e 72 h foram somados e então divididos por 4 para obter uma média da irritação a cada tempo. Os escores médios em 60 min, 24, 48 e 72 h foram somados e divididos por 4 para obter o IIP.

3.7.3 Medição do edema de orelha

O edema foi expresso como um aumento no peso da orelha (todos os modelos) ou como variação da espessura da orelha (edema de orelha induzido pelo óleo de cróton com aplicação única e múltipla), devido ao estímulo inflamatório. A espessura da orelha foi medida utilizando um micrômetro digital e todos os animais foram previamente anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) por via intraperitoneal (ip). Para avaliar o peso das orelhas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e biópsias com diâmetro de 6 mm foram coletadas de ambas orelhas com auxílio de um *punch* de metal, as quais foram pesadas individualmente em balança de precisão. Para minimizar a variação devido à técnica, um único examinador realizou as medições ao longo dos experimentos. A extensão do edema (peso das orelhas) foi expressa como a diferença entre o peso (em mg) da secção removida da orelha direita (a qual recebeu o agente irritante) e o peso (em mg) da secção removida da orelha esquerda (que recebeu veículo utilizado para diluir o agente irritante). A percentagem de inibição do edema (%) foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Inibição (\%)} = 100 - [(A \times 100) / B]$$

em que "A" é a média de peso do edema (mg) do grupo tratado com as amostras (PHEX, frações, indometacina ou dexametasona) e "B" é a média de peso do edema do controle negativo.

3.7.4 Atividade anti-inflamatória tópica da PHEX e frações em modelo de inflamação aguda

3.7.4.1 Edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton

O edema de orelha induzido em camundongos, pelo óleo de cróton, foi determinado pelo método descrito por Schiantarelli et al (1982), com pequenas modificações. O edema foi induzido na orelha direita, pela aplicação tópica de 20 µL de óleo de cróton 5% (v/v) em acetona. Após 15 min, PHEX (1, 0,5 e 0,1 mg/orelha), FH7 e FH9F3 (0,1 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha), utilizada como controle positivo, foram aplicados topicamente na orelha direita, enquanto a orelha esquerda recebeu 20 µL do veículo acetona (controle negativo).

A espessura das orelhas foi medida antes e 6 h após a indução da inflamação. A medida foi realizada próxima à extremidade medial da orelha. Após 24 h, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e biópsias de 6 mm de diâmetro das orelhas foram recolhidos e submetidos à análise histopatológica ou foram congeladas rapidamente em nitrogênio líquido e armazenadas a - 80 °C até a realização do teste para determinação da mieloperoxidase (MPO) ou citocinas pro-inflamatórias.

3.7.4.2 Edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico (AA)

O edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico (AA) foi realizado de acordo com Young e colaboradores (1984). O AA dissolvido em acetona (2 mg/mL) foi aplicado à superfície interna da orelha direita dos camundongos (20 µL/orelha). Após 15min, PHEX (1, 0,5, 0,1 mg/orelha) ou indometacina (0,5 mg/orelha, utilizada como controle positivo) foram aplicados topicamente na orelha direita, enquanto a orelha esquerda recebeu 20 µL do veículo acetona. O peso das orelhas foi avaliado 1 h após a indução da inflamação.

3.7.4.3 Edema de orelha induzido pelo fenol

A inflamação foi induzida em camundongos pela aplicação na superfície interna da orelha direita de 20 µL de fenol 10% (v/v) em acetona. PHEX (1, 0,5, 0,1 mg/orelha), FH7 e FH9F3 (0,1 mg / orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha) foram aplicados topicamente na orelha direita 15 min após a aplicação do agente irritante. A orelha esquerda recebeu 20 µL do veículo acetona. O peso das orelhas foi verificado 1 h após a aplicação de fenol (GÁBOR, 2000).

3.7.4.4 Edema de orelha induzido pela capsaicina

A inflamação foi induzida em camundongos pela aplicação de 20 µL de capsaicina 0,02 mg/µL em acetona, na superfície interna da orelha direita. Quinze min antes da aplicação de cada agente irritante, as orelhas direitas foram tratados topicamente com PHEX (1, 0,5, 0,1 mg/orelha) e o veículo acetona. O peso das orelhas foi verificado 30 min após a aplicação da capsaicina (GÁBOR e RAZGA, 1992).

3.7.4.5 Edema de orelha induzido pela histamina subcutânea

Os camundongos foram previamente anestesiados com cetamina (80 mg/kg ip) e xilazina (15 mg/kg ip). Posteriormente, a orelha direita foi tratada topicamente com PHEX (1, 0,5, 0,1 mg / orelha), acetona (20 µL/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/ orelha). Quinze min depois, o edema foi induzido na orelha direita por aplicação intradérmica de 10 µL de dicloridrato de histamina (0,1 mg) dissolvido em 0,9% de solução salina na região dorsal usando uma seringa com agulha hipodérmica de 29-G, ao passo que a esquerda orelha recebeu 10 µL de solução salina 0,9%, utilizando

o mesmo procedimento acima referido. O edema de orelha foi avaliado 2 h após a aplicação da solução de histamina (BRAND et al., 2002).

3.7.4.6 Edema de orelha induzido por etil fenil propionato (EPP)

O edema de orelha induzido pelo EPP foi realizado de acordo com Giner e colaboradores (2000) e Recio e colaboradores (2000). O EPP dissolvido em acetona (50 mg/mL) foi aplicado na superfície interna da orelha direita dos camundongos (20 μ L/orelha). Após 15 min, PHEX (1, 0,5, 0,1 mg / orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha, utilizada como controle positivo) foram aplicados topicamente na orelha direita, enquanto a orelha esquerda recebeu 20 μ L do veículo acetona. O peso das orelhas foi verificado 1 h após a indução da inflamação.

3.7.4.7 Medida da atividade enzimática da mieloperoxidase

A infiltração de neutrófilos foi quantificada através da medida da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) (FIETZ et al., 2008). Resumidamente, o homogenato das biópsias das orelhas submetidas ao modelo do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton foi preparado em 50 mM de tampão fosfato (pH 6,0) contendo 0,5% de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), sonificado durante 10 s e levado três vezes a ciclos de congelamento-descongelamento. Posteriormente, o homogenato foi contrifugado a 14.000 rpm durante 15 min a 4 °C. Ao sobrenadante foi adicionado cicloridrato de o-dianisidina 2 mg/mL e peróxido de hidrogênio (H_2O_2 a 10 mM) para medir a alteração da absorbância a 460 nm. A atividade da MPO foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 11,48 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (SANTANA et al., 2006). Uma unidade de MPO foi definida como a quantidade que degradou 1 μ mol de peróxido de hidrogênio por minuto a 25 °C. Os resultados foram expressos como atividade específica (U/mg de proteína).

3.7.4.8 Determinação da produção de citocinas inflamatórias

Os ensaios quantitativos de citocinas inflamatórias foram realizados por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) de captura, utilizando as biópsias das orelhas (6 mm) dos grupos experimentais submetidos ao modelo do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton. As orelhas foram coletadas, trituradas e homogeneizadas em tampão de extração (0,5% de albumina sérica bovina (BSA), 0,1 M de Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF), Cloreto de benzetônio 0,1 M, 10 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 20 kIU/ml de aprotinina e centrifugados a 10000 rpm durante 15 min a 4°C. Os sobrenadantes foram utilizados para dosagem de IL-1 β , TNF- α , IL-6, utilizando o Kit comercial ELISA (R & D Systems, Minneapolis , MN, EUA) de acordo com os procedimentos fornecidos pelo fabricante. Os níveis das citocinas foram determinados em duplicata em leitor de ELISA a 450 nm.

3.7.5 Atividade anti-inflamatória tópica em modelo de inflamação crônica

3.7.5.1 Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton

Este estudo foi conduzido durante nove dias (0-8). O óleo de cróton 5% (v/v) em acetona (20 μ L/orelha) foi aplicado na orelha direita e acetona na orelha esquerda dos camundongos em dias alternados. O edema de orelha foi avaliado diariamente por medição da espessura da orelha. Nos dias 4 a 8, os animais foram tratados na superfície interna da orelha direita com PHEX (0,1 mg/orelha), acetona (20 μ L/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha), duas vezes ao dia. No dia oito, os animais foram sacrificados e biópsias da orelha, de 6 mm de diâmetro, foram recolhidas, pesadas (STANLEY et al., 1991) e, posteriormente, utilizadas para análises histopatológicas.

Em outro experimento, os animais foram tratados com uma formulação do creme base de permeação transdérmica (creme VersaPro[®]), adquirido da indústria MEDISCA (Montreal, Canadá), no qual foi incorporada a PHEX. A composição do creme VersaPro[®] reside em água; polisorbato 60; metilcloroisotiazolinona; metilisotiazolinona; álcool cetearílico; ciclopentasiloxane; EDTA; acetato de tocoferol, sorbitol e extrato de Aloe. Para preparar o creme utilizado nos experimentos, a PHEX, na concentração de 6%, foi umectada aos poucos com propilenoglicol. Uma vez umectada, incorporou-se à PHEX o creme base. Desta forma, os animais foram tratados na superfície interna da orelha direita com 20 µL do VersaPro[®] (veículo), 20 µL de dexametasona (0,1% designada ProDEX) ou 20 µL da PHEX (6% designada ProPHEX). A concentração da PHEX foi escolhida com base nos resultados obtidos no estudo na atividade anti-inflamatória, enquanto a concentração da dexametasona foi baseada na concentração de formulações comercialmente disponíveis.

3.7.6 Atrofia cutânea induzida por tratamento tópico com glicocorticoide

Para avaliar se a aplicação tópica PHEX promove atrofia da pele como um glicocorticoide, sem promover um estímulo inflamatório, os animais foram tratados por via tópica com dexametasona (0,1 mg/orelha) ou PHEX (1,0 mg/orelha), ambos em acetona, a cada 12 h durante 7 dias. A atrofia da orelha dos animais foi avaliada, com auxílio de micrômetro digital, pela diferença da espessura das orelhas determinada no primeiro e oitavo dia. É sabido também que a aplicação repetida de glicocorticoide pode promover alterações sistêmicas, normalmente desencadeando efeitos supressores sobre sistemas fisiológicos (AHN et al., 2006). Assim, ao longo do experimento, foram observadas as alterações no peso dos animais e ao final, após eutanásia, foram coletadas as adrenais, o timo e o baço os quais foram pesados a fim de verificar a possível influência dos tratamentos sobre esses órgãos. O peso relativo dos órgãos foi calculado relacionando seu peso com o peso corporal do animal correspondente, segundo a equação (BRASIL, 2004):

$$\text{Peso relativo do órgão} = (\text{peso do órgão} / \text{peso corporal}) \times 100$$

3.7.7 Avaliação da Cicatrização pelo Método de Excisão

3.7.7.1 Realização das feridas cutâneas

A fim de verificar a possível interferência da PHEX sobre o processo cicatricial da pele, o modelo de cicatrização por excisão foi utilizado (SARTOR et al., 2010). Para execução do procedimento cirúrgico, objetivando-se realizar as feridas cutâneas, os camundongos foram anestesiados com uma associação dos anestésicos cetamina e xilazina (90 mg/Kg e 10 mg/kg, respectivamente) por via i.p. Os animais foram colocados em decúbito ventral e tricotomizados na região dorsocostal com uma máquina para epilação com pente de 1,2 mm. No local, uma antissepsia foi realizada com álcool 70%. A excisão foi realizada com o auxílio de um punch para biópsia (6 mm de diâmetro), para remover um fragmento cilíndrico de pele, perfurando desta forma toda a espessura da pele, até a exposição da fáscia muscular toracolombar. Após a cirurgia os animais foram recolocados em gaiolas individualizadas.

3.7.7.2 Tratamentos

As feridas cutâneas foram tratadas topicamente com o creme base VersaPro[®] (veículo), dexametasona (0,1% designada ProDEX) ou PHEX (6% ProPHEX) no volume de 100 µL. Os tratamentos foram realizados uma vez ao dia e durante 10 dias, com auxílio de seringas plásticas sem agulha.

3.7.7.3 Estudo morfométrico das feridas

Foi utilizado um paquímetro eletrônico digital para medir o diâmetro das feridas no dia 0 (após o procedimento cirúrgico para realização das feridas cutâneas) e nos dias 3, 5, 7, 9 e 10. As medidas foram realizadas no sentido

craniocaudal e látero-lateral em todos os animais do grupo. Os diâmetros obtidos foram divididos por 2 com o objetivo de se determinar os valores dos raios (NITZ et al., 2006).

Para a determinação das áreas das feridas, a seguinte fórmula foi utilizada:

$$A = \pi \cdot R \cdot r$$

Onde:

A = Área da ferida

π = Valor matemático igual a 3,1415

R = Raio maior da ferida

r = Raio menor da ferida.

Considera-se que o 'R' e 'r' correspondem aos raios das feridas no sentido crânio-caudal e látero-lateral, respectivamente (PRATA et al., 1998).

Para avaliar o grau de contração das feridas a seguinte fórmula foi utilizada:

$$GC = \frac{\text{Área To} - \text{Área Tdias}}{\text{Área To}} \times 100$$

Onde:

To = dia zero

Tdias = dias 3,5, 7, 9 ou 10 (OLIVEIRA et al., 2000)

Além disso, foi realizada uma documentação fotográfica (câmera posicionada sob - tripé a distância constante de 30 cm) das feridas nos dias do estudo morfométrico, juntamente com a observação das feridas macroscopicamente para verificação da presença de secreção, crostas e/ou necrose.

3.7.8 Análise histopatológica

As biópsias das orelhas induzidas pela aplicação única e múltipla do óleo de cróton foram excisadas e fixadas em etanol a 70% durante 24 h e, em seguida, conservadas em formalina a 10%. Subsequentemente, as orelhas foram clivadas, processadas, emblocadas em parafina e cortadas em um micrótomo (5 μ m). Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para a avaliação do infiltrado

leucocitário e intensidade do edema. A área representativa foi selecionada para análise qualitativa em microscópio de luz (ampliação de 100 e 400 x).

3.8 Análise estatística

Os ensaios biológicos *in vitro* realizados em triplicata ou quadruplicata tiveram os resultados expressos como média \pm erro padrão (EP). Foram realizadas análises de variância (ANOVA) e comparações múltiplas de Newman-Keuls a fim de se verificarem quaisquer diferenças significativas. Para os ensaios biológicos *in vivo*, foram realizadas análises de variância (ANOVA) e comparações múltiplas de Newman-Keuls ou Bonferroni.

Para estas análises, utilizou-se o programa Prism 5.0. Diferenças entre as médias dos tratamentos no nível de 5% ($p < 0,05$), comparadas ao controle negativo, foram consideradas significativas.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização química

A PHEX, analisada por CG-EM (figura 5), apresentou cinco componentes majoritários compreendendo 86% do total da amostra. Os componentes químicos da PHEX, com seus tempos de retenção e concentrações relativas correspondentes estão descritos na tabela 1.

As frações FH7 e FH9F3 tiveram seus constituintes principais identificados por CG-EM. A fração FH7 é rica em fitol (87%) (figura 6) e FH9F3 é rica em sitosterol (70%) (figura 7). Além disso, a presença de sitosterol na PHEX foi confirmada por CLAE, a partir da coinjeção com padrão de referência (figura 8).

Tabela 1 Composição química da PHEX

| Substância | Pico | Tempo (min) | Concentração relativa (%) |
|-------------------|-------------|--------------------|----------------------------------|
| β -guaieno | 1 | 27,5 | 6,1 |
| Espatuleno | 2 | 29,4 | 25,3 |
| α -copaeno | 3 | 31,4 | 7,1 |
| Fitol | 4 | 43,0 | 6,2 |
| Sitosterol | 5 | 65,4 | 41,3 |
| Total | | | 86 % |

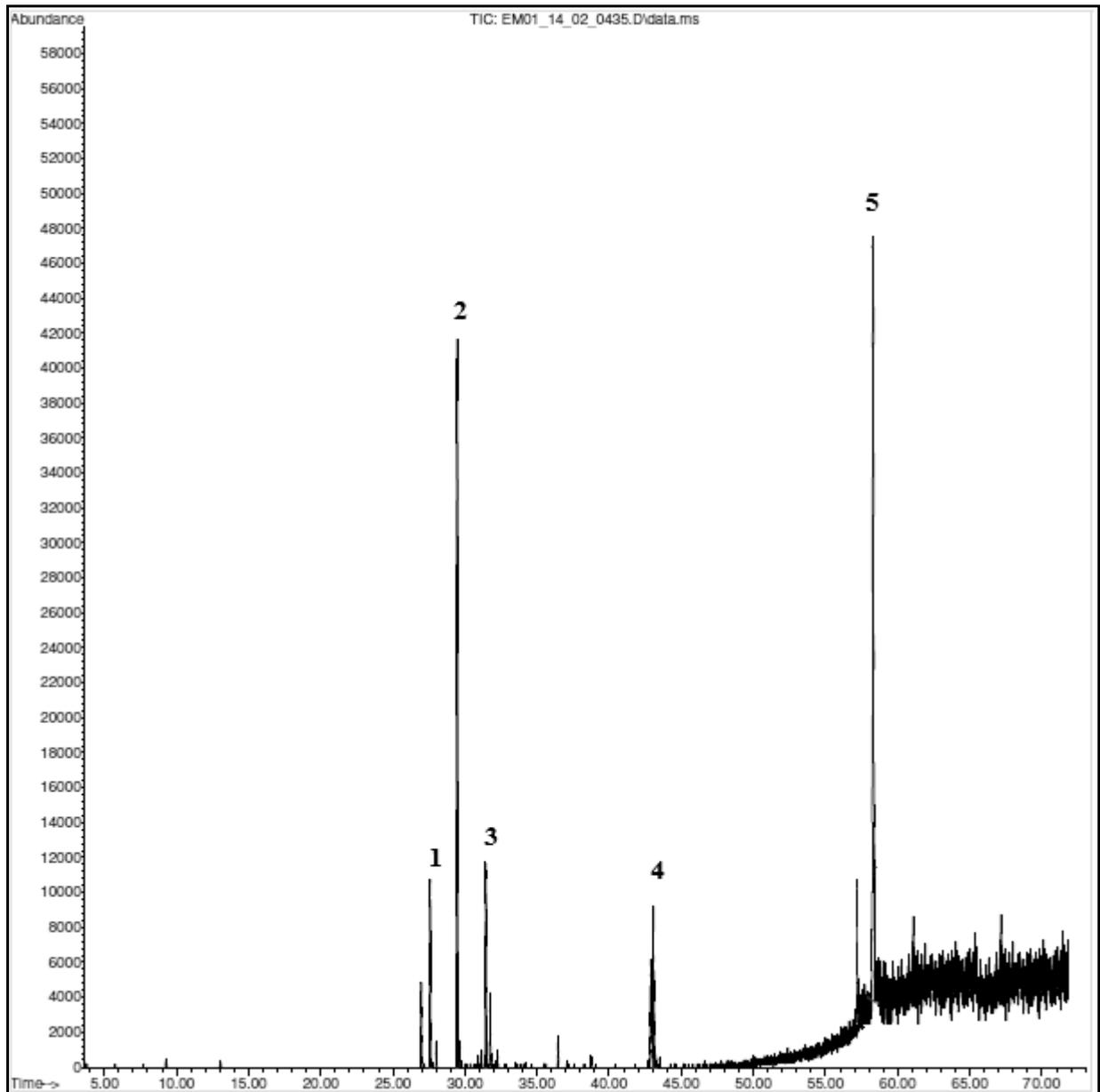


Figura 5 Perfil cromatográfico da PHEX de *L. pubescens* por Cromatografia Gasosa. Os nomes dos compostos identificados, correspondentes à numeração dos picos, estão apresentados na tabela 1.

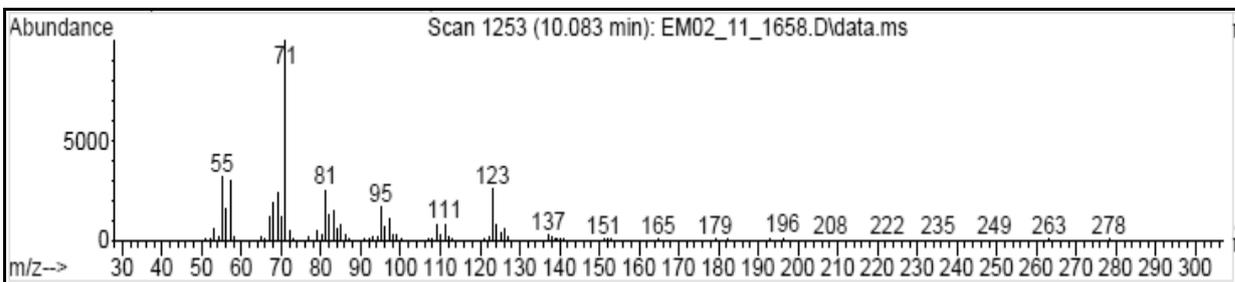
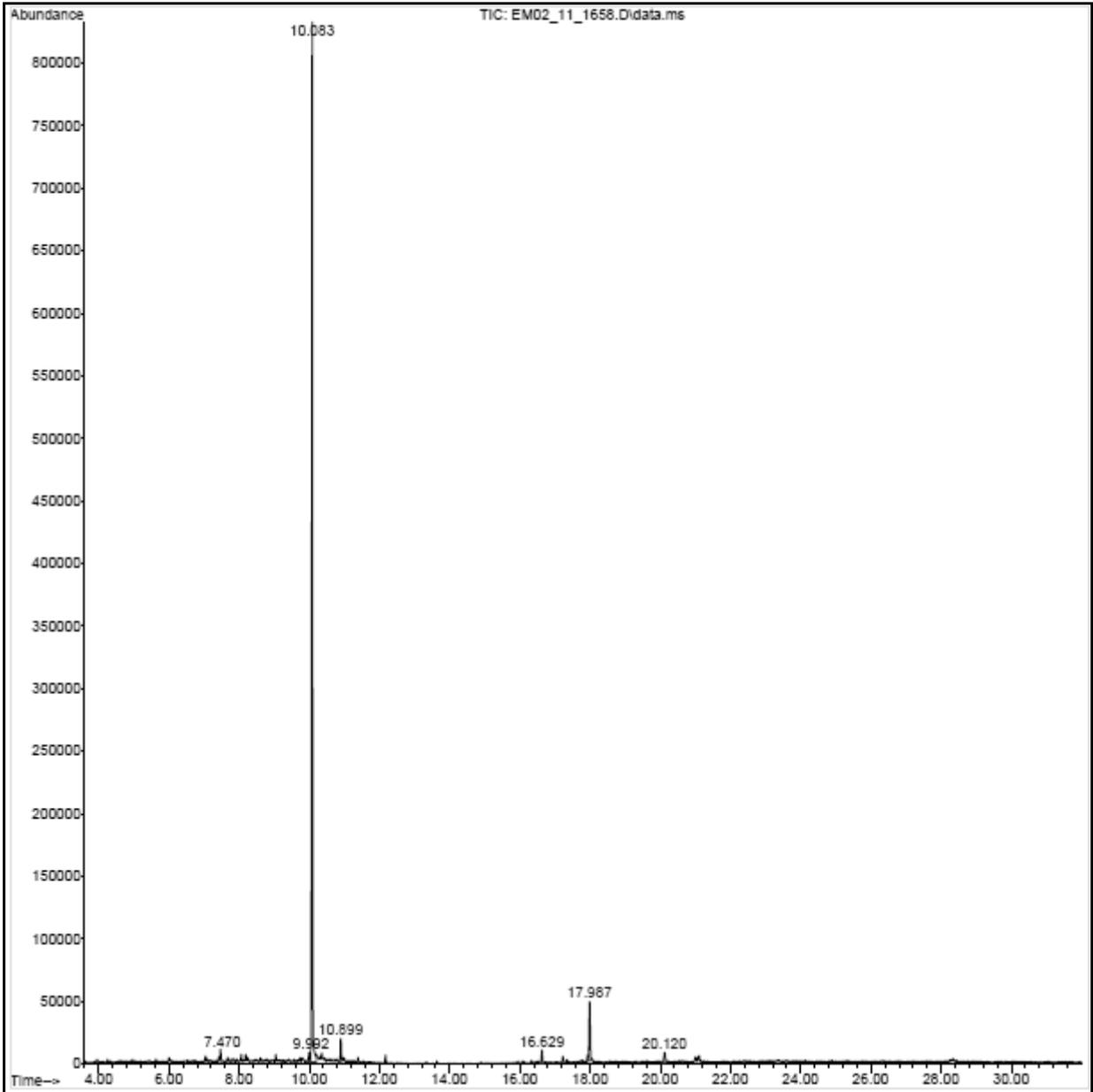


Figura 6 Perfil cromatográfico de FH7 e espectro de massas do constituinte químico de TR = 10.083 min (fitol).

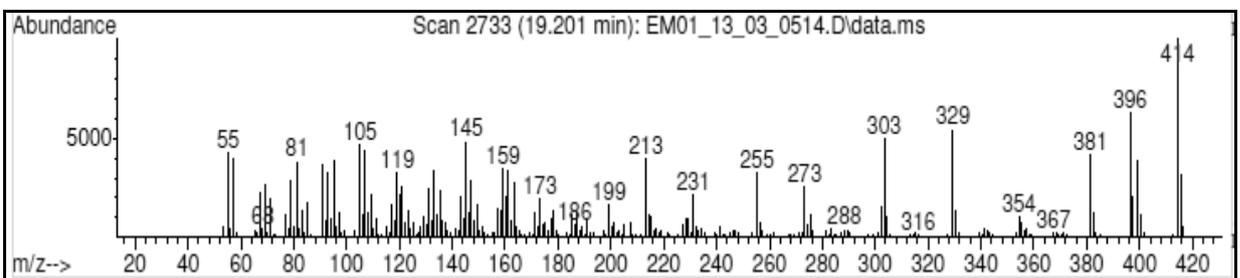
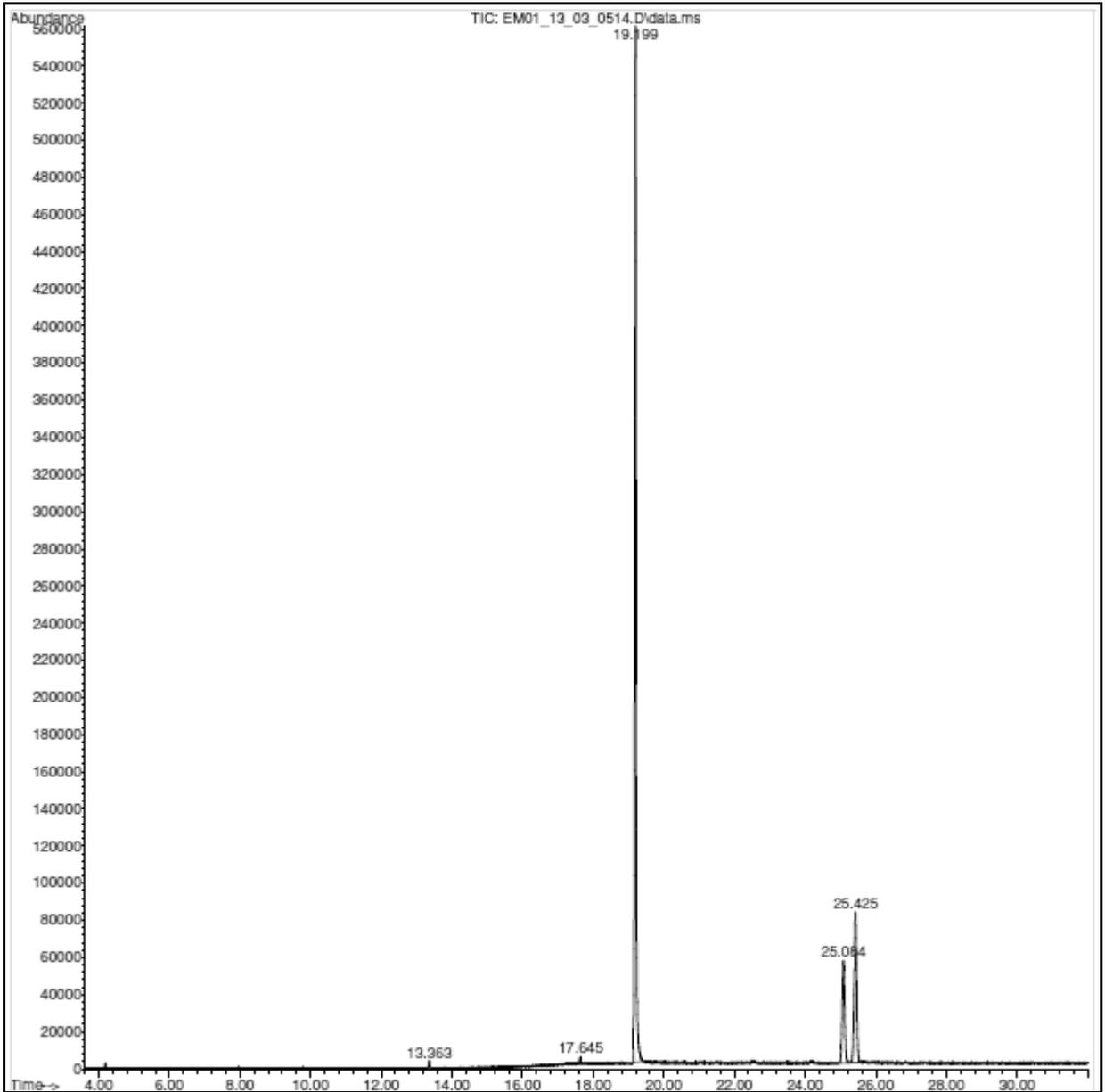


Figura 7 Perfil cromatográfico de FH9F3 e espectro de massas do constituinte químico de TR = 19.201 min (sitosterol).

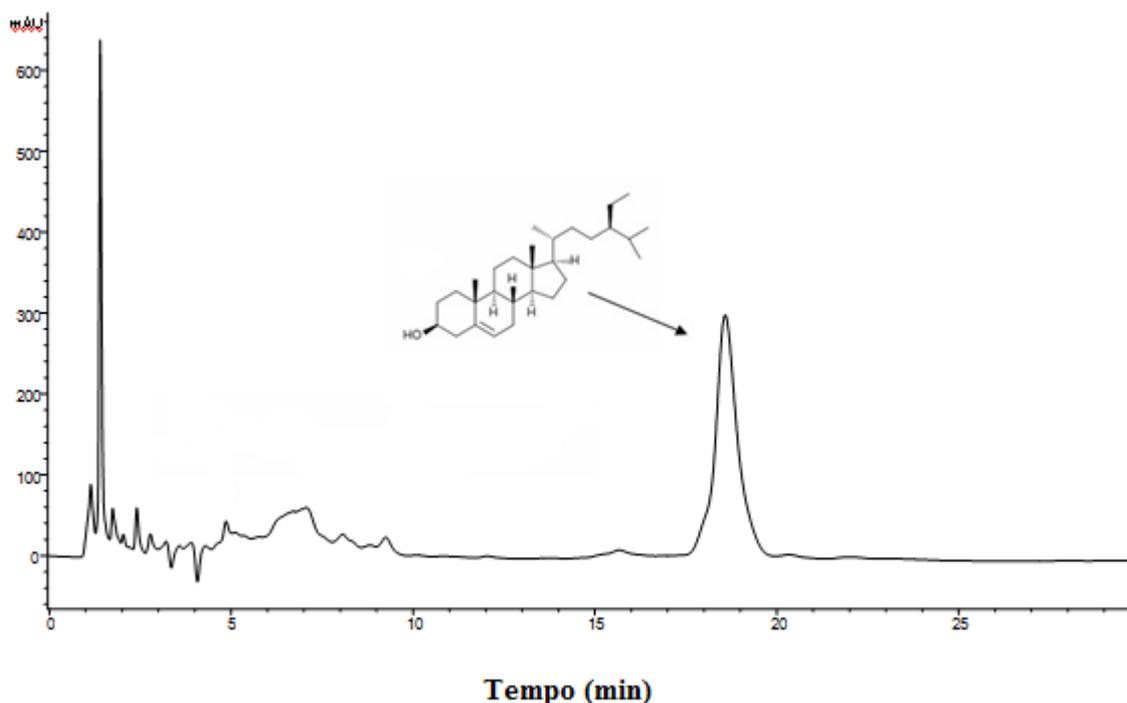


Figura 8 Perfil cromatográfico da PHEX das folhas de *L. pubescens* por CLAE. Substância identificada: sitosterol (TR=18,5min). Condições do HPLC: Zorbax SB-18 (250mm×4.6mm i.d.; 5 µm); metanol–acetonitrila (70:30 v/v); fluxo de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 µL; detecção - 210 nm.

4.2 Atividades biológicas *in vitro*

4.2.1 Atividade citotóxica em linhagens tumorais

A PHEX não inibiu a proliferação celular nas linhagens tumorais testadas. Como pode ser verificado na figura 9A, tanto o etoposídeo, utilizado como controle positivo, quanto às frações FH7, FH9, FH10 e FH12 a FH16 apresentaram atividade significativa, pois inibiram a proliferação celular de HL60, quando comparada ao controle negativo (DMSO 0,1%). Em ordem decrescente na redução da proliferação celular, as frações mais ativas foram FH13 e FH16 (redução de 84%), FH7 (83%), FH12 (80%), FH9 (75%), FH14 (73%), FH10 (68%) e FH15 (66%). O etoposídeo causou uma redução na viabilidade celular de 57%.

Com relação à porcentagem de redução da proliferação celular em células Jurkat (figura 9B), as frações mais ativas foram: FH16 (73%), FH7 (71%), FH13 (70%), FH9 (67%), FH12 (47%), FH10 (45%) e FH15 (41%).

Em células MCF-7 (figura 9C), as frações mais ativas foram FH16 (78%), FH9, FH14 e FH15 (77%), FH7 (74%), FH13 (71%) e FH12 (61%).

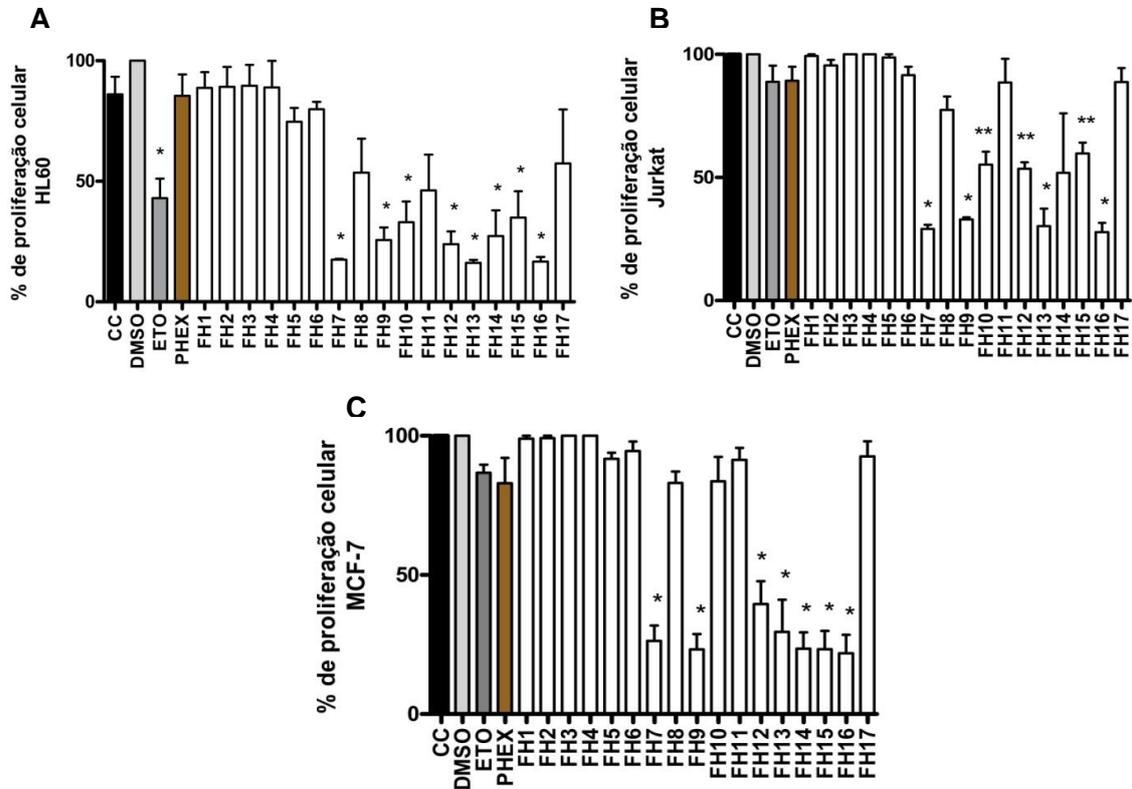


Figura 9 Efeito da PHEX (100 µg/mL), frações (FH1 a FH17- 100 µg/mL) e etoposídeo (ETO- 14 µM) sobre a viabilidade das linhagens tumorais HL60 (A), Jurkat (B) e MCF-7 (C) em 48 h. Os dados representam a média de três experimentos em triplicata, sendo expressos como a média ± desvio padrão. ANOVA, seguido por Student-Newman-keuls foi utilizado. Valores significativos: $p^* < 0,001$; $p^{**} < 0,01$ e $p^{***} < 0,05$ vs controle negativo (DMSO 0,1%).

Foi determinada também a viabilidade celular *in vitro* de fibroblastos de camundongos (3T3) expostos a diferentes concentrações da PHEX. Nenhum sinal de citotoxicidade nas doses testadas foi constatado (figura 10 B).

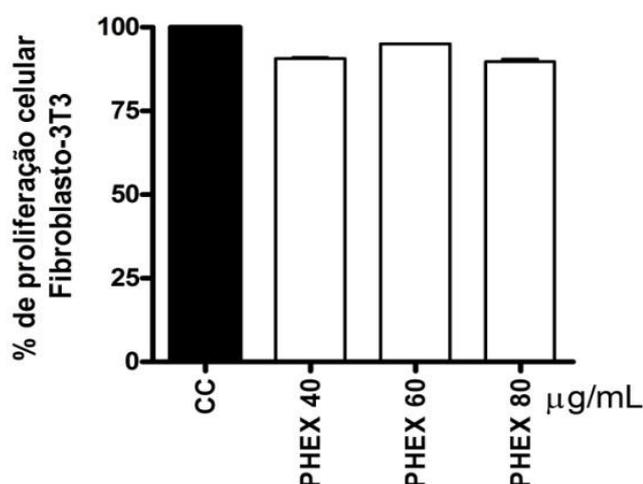


Figura 10 Efeito da PHEX (40 a 80 $\mu\text{g/mL}$) sobre a viabilidade da linhagem não tumoral 3T3 em 48 h. Os dados representam a média de três experimentos em triplicata, sendo expressos como a média \pm desvio padrão. ANOVA, seguido por Student-Newman-keuls foi utilizado como teste post-hoc.

Dentre as frações de PHEX ativas diante das linhagens tumorais testadas, FH7 e FH9 foram as que apresentaram maior rendimento e pureza. A fração FH7 apresentou 87% de fitol e FH9 foi refractionada com o objetivo de se obter uma fração mais pura (FH9F3 – 70% de sitosterol). Assim, dando continuidade aos estudos de citotoxicidade sobre células tumorais, as CI_{50} de FH7 e FH9F3 foram determinadas. De acordo com a tabela 2, FH9F3 foi mais ativa tanto para a linhagem HL60 quanto para a linhagem Jurkat.

Tabela 2 Citotoxicidade de FH7 e FH9F3 sobre as linhagens tumorais HL60 e Jurkat

| Amostra | CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) | |
|-------------------------|---------------------------------------|-----------------|
| | HL60 | Jurkat |
| FH7 | $52,2 \pm 6,5^a$ | SA ^b |
| FH9F3 | $8,6 \pm 4,6$ | $17,9 \pm 4,5$ |
| Etoposideo ^c | $0,5 \pm 0,5$ | $2,5 \pm 5,1$ |

^a Média dos ensaios em triplicata \pm erro padrão

^b SA: Sem atividade

^c Fármaco de referência

4.2.2 Avaliação da atividade leishmanicida

A PHEX e frações foram testadas para as formas promastigotas de *Leishmania*. A citotoxicidade foi avaliada através do método colorimétrico do MTT após 72 h de tratamento.

Os resultados da atividade antipromastigota encontrados para a PHEX e frações (FH1 a FH17) estão sumarizados na tabela 3. Entre as 17 frações testadas, sete foram ativas para as espécies de *L. amazonensis*, *L. major* e *L. braziliensis*, com valores de CI_{50} variando entre 12,5 a 44,0 $\mu\text{g/mL}$. Estas espécies foram também susceptíveis à PHEX, que foi mais potente quando comparada às frações.

Para verificar a citotoxicidade em macrófagos, as células foram tratadas com diferentes concentrações das amostras por 72 h e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A citotoxicidade em macrófagos e em formas promastigotas foi também comparada, utilizando o cálculo de índice de seletividade (IS). Amostras com $IS \geq 2$ foram consideradas seletivas para as formas promastigotas (HOUGHTON et al., 2007).

De acordo com os dados apresentados na tabela 4, algumas frações, bem como a PHEX, apresentam toxicidade para macrófagos. Contudo, as frações FH7 e FH9, foram ativas para as formas promastigotas da maioria das espécies de *Leishmania* testadas (tabela 3) e não apresentaram sinais tóxicos para estas células de mamíferos na máxima concentração utilizada (100 $\mu\text{g/mL}$) (tabela 4). Estas frações também foram seletivas para todas as formas promastigotas testadas. Apesar de PHEX apresentar sinais de toxicidade para macrófagos, sua seletividade foi observada para *L. amazonensis* e *L. major*.

A PHEX e a fração FH7, as quais apresentaram valores expressivos nos ensaios da atividade antipromastigota e $IS \geq 2$, tiveram sua citotoxicidade determinada diante das formas amastigotas de *L. amazonensis*. Como consta na tabela 5, houve uma redução do número de amastigotas intracelulares após um período de 72 h de tratamento com PHEX e FH7 e ambas apresentaram $IS \geq 2$ para estas formas do parasito. A tabela 5 também apresenta informações relacionadas à especificidade das amostras para as formas intracelulares e extracelulares de *L. amazonensis*, a qual foi calculada através do índice de especificidade (IE). Valores de $IE > 2,0$ indicam que a amostra foi mais ativa para amastigotas; inferiores a 0,4 foi

mais ativo em promastigota e entre 0,4 e 2,0 ativos para ambos os estágios (DE MUYLDER et al., 2011). Desta forma, a PHEX (IE = 0,9) e FH7 (IE = 1,5) foram ativas para ambos os estágios do parasito.

Tabela 3 Valores de CI₅₀ (µg/mL) da PHEX e frações de *L. pubescens* em promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*.

| Amostra | La ^b | Lc ^c | Lm ^d | Lb ^e |
|------------------|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| PHEX | 3,5 ± 0,9 ^a | >100 | 4,2 ± 0,8 | 5,6 ± 0,51 |
| FH1 | >100 | - ^f | >100 | >100 |
| FH2 | >100 | - | >100 | >100 |
| FH3 | >100 | - | >100 | >100 |
| FH4 | >100 | - | >100 | >100 |
| FH5 | >100 | - | >100 | >100 |
| FH6 | >100 | - | >100 | >100 |
| FH7 | 44,0 ± 0,7 | - | 15,5 ± 0,3 | - |
| FH8 | >100 | - | >100 | >100 |
| FH9 | 20,4 ± 0,8 | - | 25,7 ± 0,07 | 19,4 ± 0,46 |
| FH10 | 37,0 ± 0,3 | - | 27,6 ± 1,0 | 29,9 ± 0,15 |
| FH11 | >100 | - | >100 | >100 |
| FH12 | 36,0 ± 1,9 | - | 29,9 ± 1,6 | 24,6 ± 0,38 |
| FH13 | 24,1 ± 0,8 | - | 12,5 ± 2,0 | 26,6 ± 0,93 |
| FH14 | 37,6 ± 4,3 | - | 19,9 ± 0,1 | 23,7 ± 0,69 |
| FH15 | 32,9 ± 0,8 | - | 18,9 ± 0,18 | 20,3 ± 0,64 |
| FH16 | >100 | - | >100 | - |
| FH17 | >100 | - | >100 | >100 |
| AmB ^g | 0,9 ± 0,7 | 1,9 ± 0,3 | 0,07 ± 0,02 | 0,3 ± 0,04 |
| Miltefosina | 22,0 ± 0,5 | 39,2 ± 1,0 | 20,0 ± 0,2 | 26,4 ± 0,4 |

^a Média dos ensaios em triplicata ± erro padrão.; ^b *Leishmania amazonensis*; ^c *L. chagasi*; ^d *L. major*; ^e *L. braziliensis*; ^f Não realizado; ^g Fármaco de referência

Tabela 4 Citotoxicidade da PHEX e frações de *L. pubescens* em cultura de macrófagos

| Amostra | Macrófagos CC ₅₀ (µg/mL) ^b | IS ^a | | | |
|--------------------------|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | La ^c | Lb ^d | Lm ^e | Lc ^f |
| PHEX | 22,1 ± 1,4 | 6,3 | <2,0 | 5,2 | - |
| FH1 | >100 | - | - | - | - |
| FH2 | >100 | - | - | - | - |
| FH3 | 16,1 ± 6,1 | - | - | - | - |
| FH4 | 7,9 ± 7,4 | - | - | - | - |
| FH5 | 5,2 ± 1,7 | - | - | - | - |
| FH6 | NR ^g | - | - | - | - |
| FH7 | >100 | 2,5 | - | 6,4 | - |
| FH8 | NR | - | - | - | - |
| FH9 | >100 | 4,9 | 5,2 | 3,8 | - |
| FH10 | 55,4 ± 8,1 | <2,0 | <2,0 | 2,0 | - |
| FH11 | NR | - | - | - | - |
| FH12 | 21,9 ± 2,9 | <2,0 | <2,0 | <2,0 | - |
| FH13 | 54,5 ± 0,1 | <2,0 | 2,0 | 4,5 | - |
| FH14 | 67,2 ± 1,4 | <2,0 | 2,8 | 3,3 | - |
| FH15 | 44,0 ± 1,5 | <2,0 | 2,2 | 2,4 | - |
| FH16 | >100 | - | - | - | - |
| FH17 | 18,9 ± 1,7 | - | - | - | - |
| ^h AmB | >100 | 111,1 | 333,3 | 1428,5 | 52,6 |
| ^h Miltefosina | 56,5 ± 4,1 | 4,5 | 3,7 | 5,0 | 1,4 |

^aIS: Índice de Seletividade calculado pela razão entre CC₅₀ para macrófagos e CI₅₀ para promastigotas.

^bCC₅₀: Concentração do composto que reduziu 50% da viabilidade dos macrófagos

^c*Leishmania amazonensis*; ^d*L. braziliensis*; ^e*L. major*; ^f*L. chagasi*

^gNR: Não realizado; ^hFármaco de referência

Tabela 5 Efeito de PHEX e FH7 sobre *L. amazonensis* e índice de seletividade e especificidade

| Amostra | Amastigotas | Macrófagos | IS _{AMA} ^d | IE ^e |
|--------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| | CI ₅₀ (µg/mL) ^b | CC ₅₀ (µg/mL) ^c | | |
| PHEX | 6,9 ± 4,0 | 22,1 | 3,2 | 0,9 |
| FH7 | 32,6 ± 5,82 ^a | >100 | 3,3 | 1,5 |
| Miltefosina ^f | 9,74 ± 0,8 | 56,5 ± 4,1 | 5,8 | 2,2 |

^aMédia dos ensaios em triplicata ± erro padrão;

^bCI₅₀: Concentração do composto que inibiu 50% do crescimento parasitário;

^cCC₅₀: Concentração do composto que reduziu 50% da viabilidade dos macrófagos;

^dIS_{AMA}: índice de seletividade (CC₅₀ para macrófagos/ CI₅₀ de amastigotas);

^eIE: índice de especificidade (CI₅₀ de promastigotas/CI₅₀ de amastigotas);

^fFármaco de referência

4.2.2.1 Mecanismo de ação de FH7 sobre *L. amazonensis*

Considerando que FH7 apresentou os melhores resultados, dentre as frações, para as atividades antipromastigota e anti-amastigota sobre *L. amazonensis*, inexistência de dados na literatura sobre a atividade leishmanicida do fitol e sua maior pureza, esta fração foi escolhida para avaliar seu possível modo de ação.

Inicialmente, verificou-se o efeito de FH7 sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em formas promastigotas, por fluorimetria, e utilizando o marcador fluorescente JC-1. As formas promastigotas, 24 h após tratamento com FH7 nas doses de 88,0 e 176,0 µg/mL, apresentaram uma acentuada redução de 63% e 53% no potencial de membrana mitocondrial, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle negativo (figura 11). O fármaco de referência induziu a uma redução de 50% neste mesmo período. Após 48 h, somente a dose de 88,0 µg/mL foi eficaz, com redução de 33% do potencial de membrana mitocondrial. Em contrapartida, em 72 h, esta mesma dose apresentou uma atividade de 77% e na dose de 176 µg/mL uma redução de 48% no $\Delta\psi_m$.

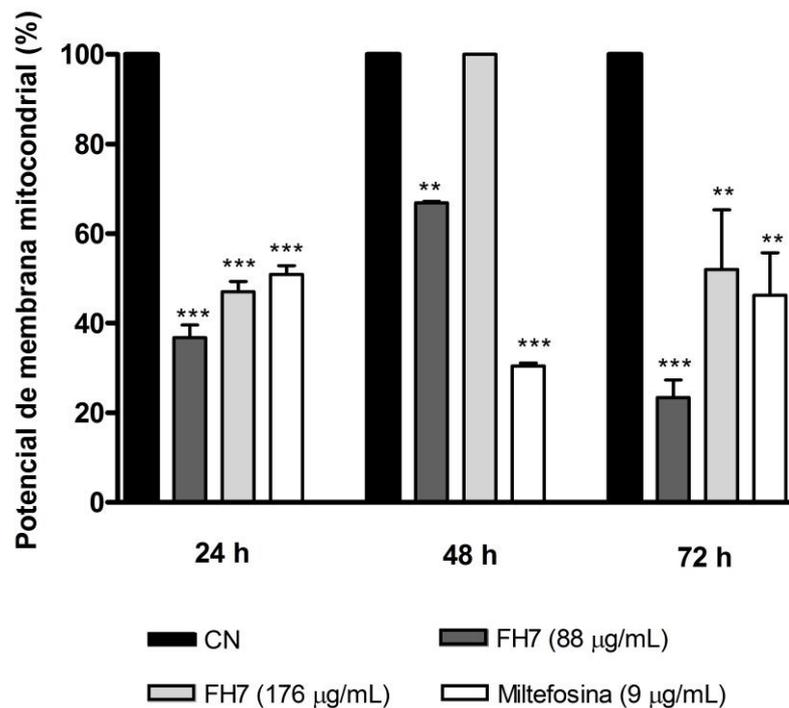


Figura 11 Efeito de FH7 no potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de *L. amazonensis*. Promastigotas de *L. amazonensis* foram incubadas na ausência ou na presença de FH7 (88,0 e 176,0 µg/mL) por 24, 48 e 72 h. Os dados representam a média de três experimentos em triplicata, sendo expressos como a média \pm desvio padrão. ANOVA, seguido por Student-Newman-keuls foi utilizado como teste post-hoc. Valores significativos: $p^{***}<0,001$ e $p^{**}<0,01$ vs controle negativo (CN).

Para investigar se a disfunção mitocondrial observada em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com FH7 estaria relacionada com a produção de ROS, os seus níveis foram avaliados em tempos e concentrações diferentes usando o corante H2DCFDA. A produção de ROS não foi observada após 24 h de incubação, em comparação com o controle negativo (figura 12). No entanto, quando as formas promastigotas foram tratadas com FH7 nos outros tempos (48 e 72 h), a produção de ROS aumentou quando comparada ao controle não tratado. Após 48 h de tratamento com FH7 na dose de 88,0 e 176,0 µg/mL pode-se observar um aumento na produção de ROS em 34% e 41%, respectivamente, em comparação com o grupo controle negativo. Além disso, após 72 h de tratamento com FH7 houve um aumento de 34% a 88,0 µg/mL e uma produção máxima de ROS de 41,9% com 176,0 µg/mL. Miltefosina induziu um aumento nos níveis de ROS de 52%, 54% e 34% após 24, 48 e 72 h, respectivamente.

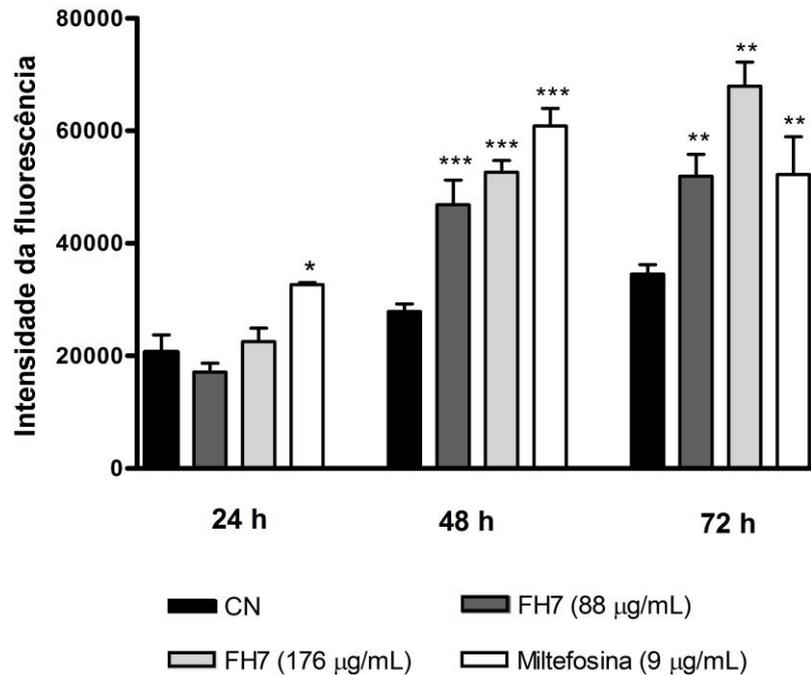


Figura 12 Produção de ROS em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com FH7. Promastigotas de *L. amazonensis* foram incubadas na presença de FH7. A produção de ROS foi quantificada utilizando H2DCFDA após 24, 48 e 72 h. A intensidade de fluorescência foi expressos como a média \pm desvio padrão. ANOVA, seguido por Student-Newman-keuls foi utilizado como teste post-hoc. Valores significativos: $p^{*}<0,001$; $p^{**}<0,01$ e $p^{*}<0,05$ vs controle negativo (CN).**

As alterações na integridade da membrana plasmática foram avaliadas utilizando o ensaio fluorimétrico com iodeto de propídio (IP). Como mostrado na figura 13, as formas promastigotas tratadas com 88,0 and 176,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FH7 não apresentaram permeabilidade significativa da membrana plasmática em 24, 48 e 72 h, em comparação com o controle negativo. Miltefosina causou uma mudança na intensidade da fluorescência do IP e 78%, 77% e 69% das células foram marcadas com IP após 24, 48 e 72 h, respectivamente.

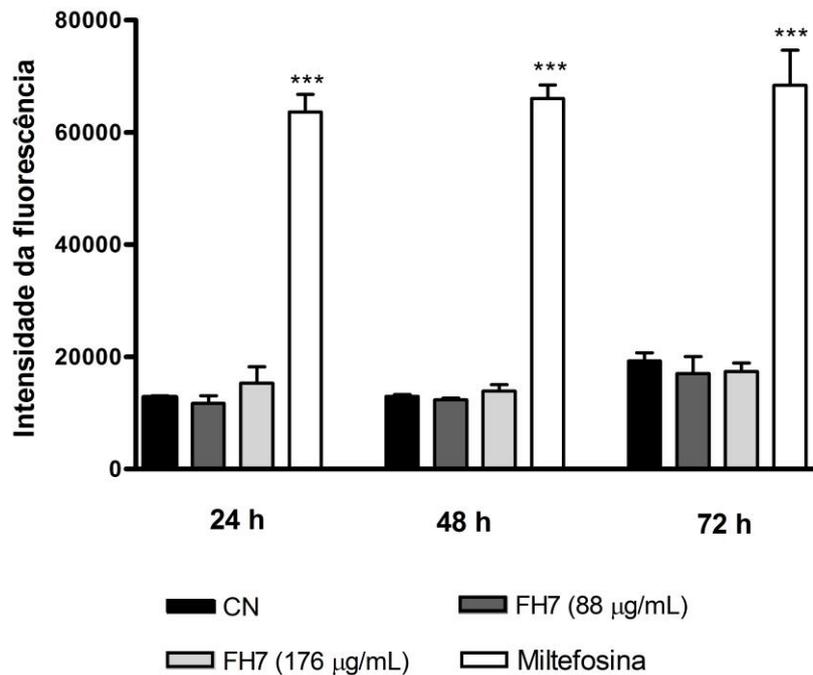


Figura 13 Ensaio de integridade da membrana celular em formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com FH7 por 24, 48 e 72 h e coradas com IP. Os dados representam a média de três experimentos em triplicata, sendo expressos como a média \pm desvio padrão. ANOVA seguido por Student-Newman-keuls foi utilizado como teste post-hoc. Valores significativos: $p^{***} < 0,001$ vs controle negativo (CN).

4.3 Atividades biológicas *in vivo*

4.3.1 Estudo de irritação/corrosão dérmica aguda em ratos

Nenhum animal apresentou qualquer sinal clínico ou sinais evidentes de toxicidade do primeiro até o último dia do experimento quando tratados topicamente com a PHEX. Não foi observado nenhum eritema ou edema na pele de todos os animais, tratados ou controle (tabela 6). Além disso, não houve mudanças significativas no peso corpóreo, no consumo de água ou de ração nos animais tratados com a PHEX, quando comparados ao controle negativo (dados não mostrados).

Tabela 6 Estudo de irritação dérmica aguda em ratos

| Controle negativo (n=3) | | | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------|------|------|------|--------------|------|------|------|---|
| Reação da pele | Eritema | | | | Edema | | | | |
| | 60 min | 24 h | 48 h | 72 h | 60 min | 24 h | 48 h | 72 h | |
| Tempos | | | | | | | | | |
| Escore total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Escore médio ^a | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total do escore médio | | | | | 0 | | | | |
| IIP ^b | | | | | 0 | | | | |
| Observações | Não irritante | | | | | | | | |

| Grupo tratado com PHEX (n=3) | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|----------------|------|------|------|--------------|------|------|------|---|
| Reação da pele | Eritema | | | | Edema | | | | |
| | 60 min | 24 h | 48 h | 72 h | 60 min | 24 h | 48 h | 72 h | |
| Tempos | | | | | | | | | |
| Escore total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Escore médio ^a | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total do escore médio | | | | | 0 | | | | |
| IIP ^b | | | | | 0 | | | | |
| Observações | Não irritante | | | | | | | | |

^a As respostas dérmica foram pontuadas de acordo com o guia OECD. Escore médio da resposta dérmica = (escore total da formação de eritema+escore total da formação de edema)/4.

^b IIP = (escore médio em 60min+escore médio em 24 h+escore médio em 48 h+escore médio em 72 h)/4

4.3.2 Atividade anti-inflamatória tópica em modelo de inflamação aguda

4.3.2.1 Efeito da PHEX de *L. pubescens* sobre o edema de orelha induzido pela aplicação única do óleo de cróton

O efeito anti-inflamatório da PHEX de *L. pubescens*, por via oral, sobre o edema de orelha em camundongos foi nulo. Indometacina, o fármaco de referência, apresentou uma percentagem de inibição do edema de 93% (SILVA et al., 2012^b).

Em contrapartida, quando aplicada topicamente, a PHEX reduziu significativamente o edema de orelha 6 h após a aplicação do óleo de cróton em todas as doses testadas, quando comparada ao grupo tratado com acetona (controle negativo) (figura 14). O controle positivo, dexametasona (0,1 mg/orelha), reduziu significativamente o edema, mostrando uma espessura de orelha de $1,66 \pm 0,25$ (inibição de 72%) em relação ao grupo de controle negativo ($8,96 \pm 0,89$). A inibição calculada para a PHEX foi de 74%, 67% e 65% nas doses de 1, 0,5 e 0,1 mg/orelha, respectivamente.

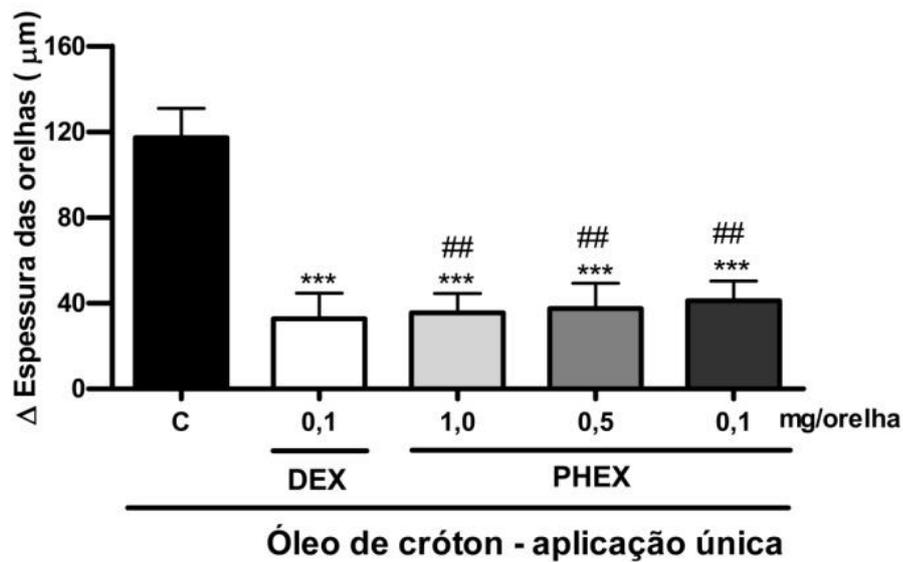


Figura 14 Efeito da PHEX de *L. pubescens* pela via tópica sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton – aplicação única. Os animais foram desafiados com o óleo de cróton (controle - C) e após 15 min foram tratados com a PHEX nas doses indicadas na figura ou dexametasona (DEX). A espessura da orelha foi avaliada 6 h após a aplicação do agente irritante. As barras representam a média \pm E.P.M. do aumento da espessura da orelha em micrômetros (μm) (n=6-8). ANOVA, seguido por Student-Newman-keuls foi utilizado como teste post-hoc. Valores significativos: $p^{***}<0,001$ vs controle. ## estatisticamente igual à dexametasona.

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) foi avaliada através da análise das biópsias das orelhas, as quais foram retiradas 24 h após a administração do óleo de cróton. Este ensaio representa um índice da infiltração de neutrófilos ou migração celular para o sítio da inflamação e de acordo com a figura 15, o tratamento com a dexametasona e a PHEX produziu uma notável inibição da atividade da MPO. Biópsias das orelhas tratadas com dexametasona a 0,1 mg/orelha e PHEX nas doses de 1, 0,5 e 0,1 mg/orelha inibiram a infiltração celular em 49%, 58%, 51% e 54%, respectivamente. Esta inibição foi confirmada pela análise histopatológica das biópsias (figura 16).

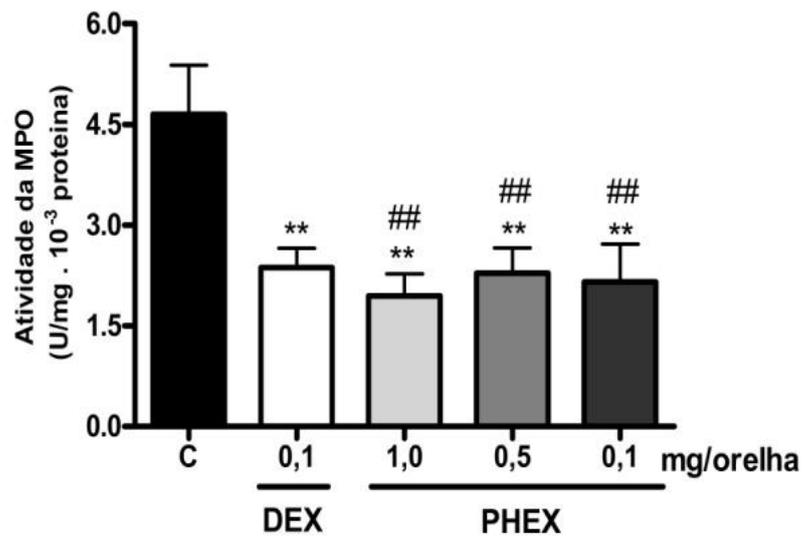


Figura 15 Efeito da PHEX de *L. pubescens* pela via tópica sobre a migração celular induzida pelo óleo de cróton – aplicação única. Os animais foram desafiados com o óleo de cróton (controle - C) e após 15 min foram tratados com a PHEX nas doses indicadas na figura ou dexametasona (DEX). Vinte e quatro horas depois do desafio, as orelhas foram coletadas para a avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). As barras representam a média \pm E.P.M. da atividade da MPO (n=6-8). ANOVA, seguido por Student-Newman-keuls foi utilizado como teste post-hoc. Valores significativos: $p^{**}<0,01$ vs controle. ## estatisticamente igual à dexametasona.

A análise histopatológica do tecido das orelhas, 24 h após o tratamento com o óleo de cróton, também revelou um aumento significativo da espessura da derme e infiltração acentuada de células inflamatórias associada com a dilatação dos vasos sanguíneos (figura 16B) quando comparado à orelha não inflamada (figura 16A). As orelhas tratadas com a dexametasona (figura 16C) e PHEX, em todas as doses (figura 16D, E, F), demonstraram uma redução nestes parâmetros inflamatórios, quando comparadas às orelhas que receberam somente o agente irritante (figura 16 B).

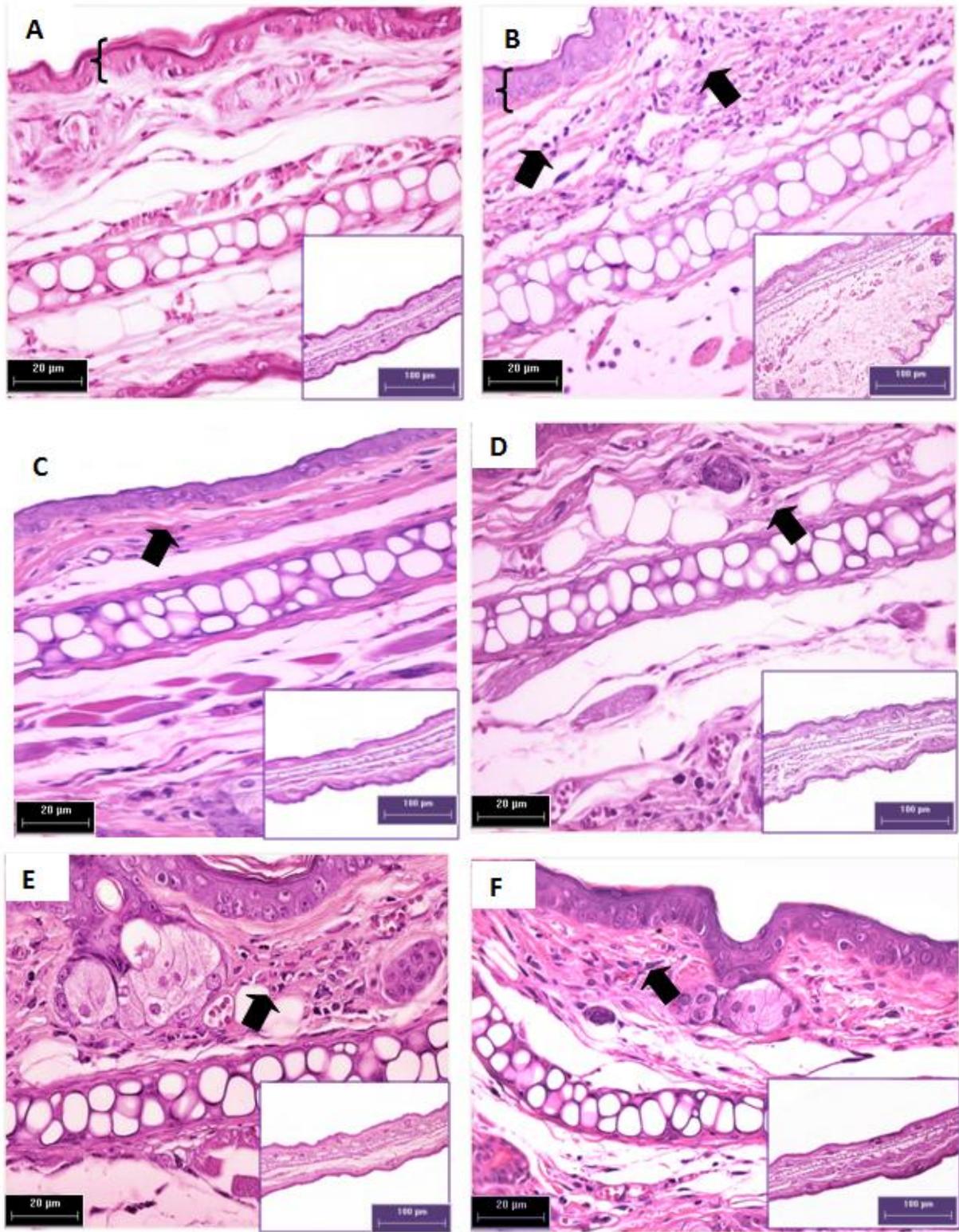


Figura 16 Fotos representativas dos cortes histológicos de orelhas de camundongos (corados com hematoxilina-eosina - HE) (100x, escala 50 μm e 400x, escala de 20 μm), 24h após aplicação única de óleo de cróton. (A) veículo, sem aplicação do óleo de cróton, (B) óleo de cróton + veículo, (C) dexametasona - 0,1 mg/orelha, (D) tratamento com PHEX (1 mg/orelha), (E) tratamento com PHEX (0,5 mg/orelha), (F) tratamento com PHEX (0,1 mg/orelha). As setas apontam infiltrado inflamatório e as chaves representam a epiderme.

4.3.2.2 Efeito da PHEX de *L. pubescens* sobre o edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico (AA)

O tratamento com a PHEX, no modelo do AA (figura 17; tabela 7), causou uma significativa redução do edema nas doses de 1,0 e 0,5 mg/orelha (74% e 70%, respectivamente). A indometacina foi eficaz quando utilizada como controle positivo, apresentando uma inibição de 82%.

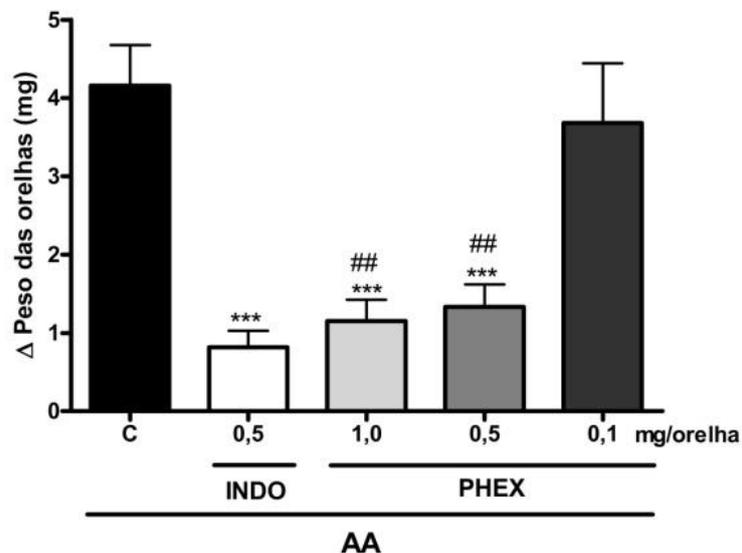


Figura 17 Efeito da PHEX de *L. pubescens* sobre o edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico (AA). Os animais foram desafiados com o AA (controle - C) e após 15 min foram tratados com a PHEX nas doses indicadas na figura ou indometacina (INDO). O peso das orelhas foi avaliado 1 h após a aplicação do agente irritante. As barras representam a média \pm E.P.M. da variação do peso das orelhas em miligramas (mg) (n=6-8). ANOVA, seguido por Student-Newman-Keuls foi utilizado como teste post-hoc. Valores significativos: $p^{***}<0,001$ vs controle. ## estatisticamente igual à indometacina.

4.3.2.3 Efeito da PHEX de *L. pubescens* sobre o edema de orelha induzido pelo fenol

A PHEX reduziu o edema nas orelhas em 95%, 50% e 81% nas doses de 1, 0,5 e 0,1 mg / orelha, respectivamente, quando comparado ao controle negativo (figura 18; tabela 7). Nos animais tratados com a dexametasona, observou-se uma redução do edema de 93%.

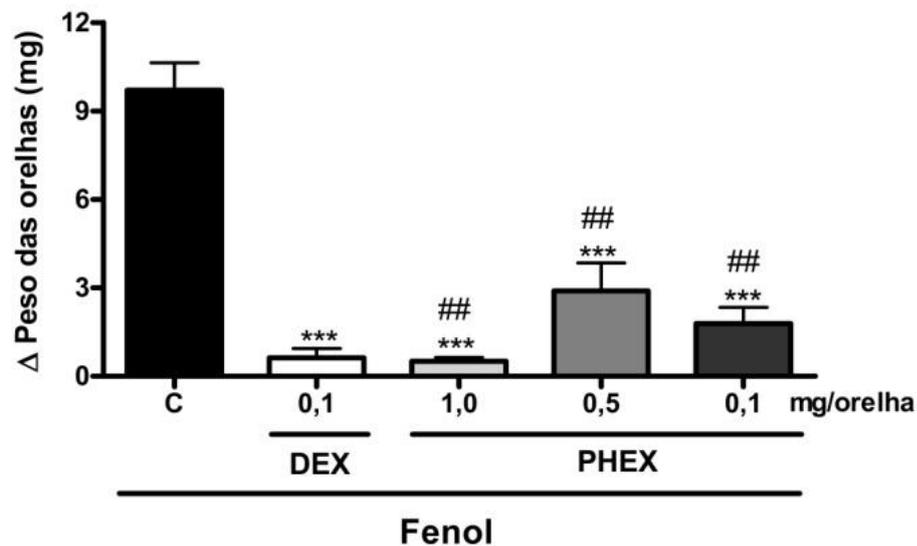


Figura 18 Efeito da PHEX de *L. pubescens* sobre o edema de orelha induzido pelo fenol. Os animais foram desafiados com o fenol (controle - C) e após 15 min foram tratados com a PHEX nas doses indicadas na figura ou dexametasona (DEX). O peso das orelhas foi 1 h após a aplicação do agente irritante. As barras representam a média \pm E.P.M. da variação do peso das orelhas em miligramas (mg) (n=6-8). ANOVA, seguido por Student-Newman-keuls foi utilizado como teste post-hoc. Valores significativos: $p^{***}<0,001$ vs controle. ## estatisticamente igual à dexametasona.

4.3.2.4 Efeito da PHEX de *L. pubescens* sobre o edema de orelha induzido pela capsaicina

Em relação ao teste do edema de orelha induzido pela capsaicina, não houve uma redução significativa da inflamação das orelhas tratadas topicamente com a PHEX quando comparada ao controle negativo (figura 19).

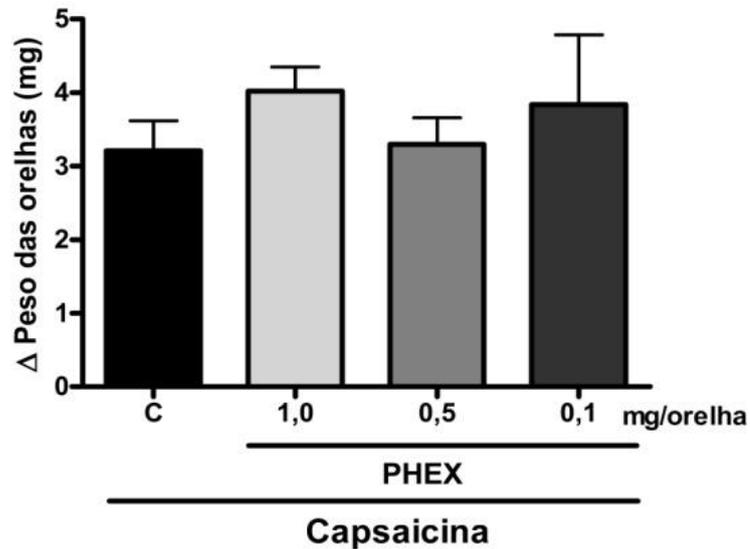


Figura 19 Efeito da PHEX de *L. pubescens* sobre o edema de orelha induzido pela capsaicina. Os animais foram desafiados com a capsaicina (controle - C) e após 15 min foram tratados com a PHEX nas doses indicadas na figura. O peso das orelhas foi avaliado 30 min após a aplicação do agente irritante. As barras representam a média ± E.P.M. da variação do peso das orelhas em miligramas (mg) (n=6-8). ANOVA, seguido por Student-Newman-keuls foi utilizado como teste post-hoc.

4.3.2.5 Efeito da PHEX de *L. pubescens* sobre o edema de orelha induzido pela histamina

O tratamento com PHEX, apenas na maior dose (1,0 mg/orelha), foi capaz de reduzir significativamente o edema das orelhas causado pela histamina quando comparado ao grupo controle negativo. Dexametasona inibiu o edema significativamente em 87% (figura 20), enquanto PHEX reduziu o edema de orelha em torno de 64%.

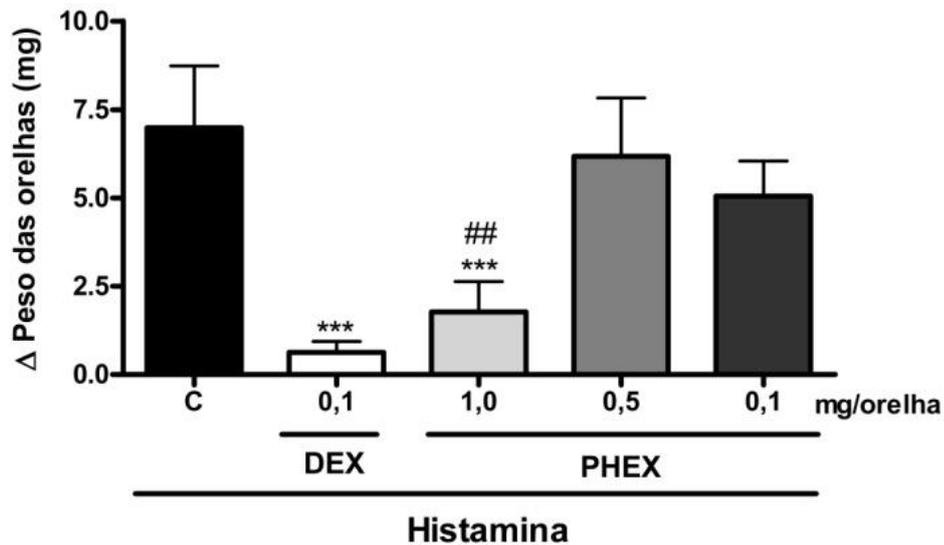


Figura 20 Efeito da PHEX de *L. pubescens* no edema de orelha induzido pela aplicação intradérmica da histamina. Os animais foram pré-tratados com a PHEX ou a dexametasona (DEX) por via tópica 15 min antes da administração intradérmica da solução de histamina (0,1 mg/10 μ L). O peso das orelhas foi avaliado 2 h após a aplicação do agente irritante. As barras representam a média \pm E.P.M. da variação do peso das orelhas em miligramas (mg) (n=6-8). ANOVA, seguido por Student-Newman-Keuls foi utilizado como teste post-hoc. Valores significativos: $p^{***} < 0,001$ vs controle. ## estatisticamente igual à dexametasona.

4.3.2.6 Efeito da PHEX de *L. pubescens* sobre o edema de orelha induzido pelo etil fenil propionato (EPP)

Para o ensaio com o EPP, o tratamento com PHEX causou uma redução significativa do edema nas orelhas quando comparado ao grupo controle negativo. O grupo tratado com a dexametasona mostrou uma redução do edema de 51%. Em contrapartida, a PHEX nas doses de 1,0 e 0,5 mg/orelha foi mais ativa que a dexametasona, com percentagens de inibição de 67% e 66%, respectivamente (figura 21).

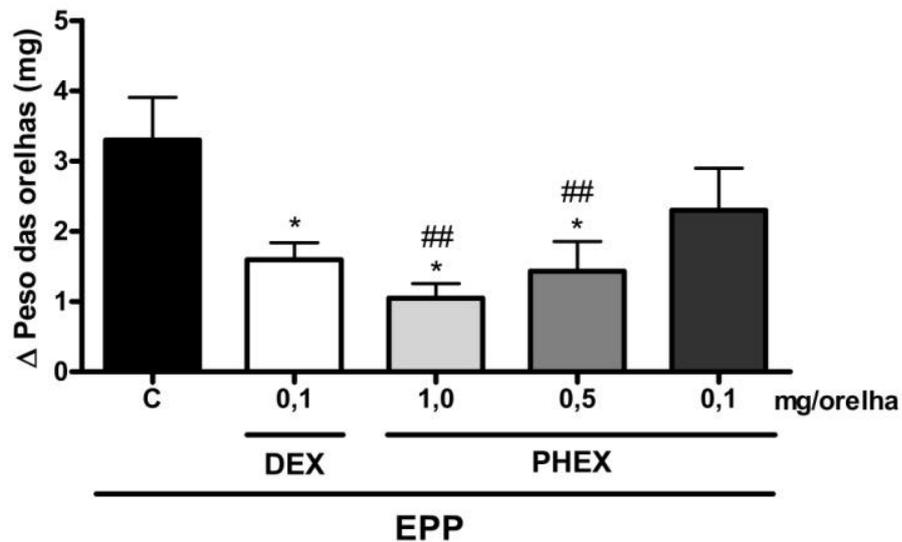


Figura 21 Efeito da PHEX de *L. pubescens* sobre o edema de orelha induzido pelo EPP. Os animais foram desafiados com o EPP (controle - C) e após 15 min foram tratados com a PHEX ou a dexametasona (DEX) nas doses indicadas na figura. O peso das orelhas foi avaliado 1 h após a aplicação do agente irritante. As barras representam a média \pm E.P.M. da variação do peso das orelhas em miligramas (mg) (n=6-8). ANOVA, seguido por Student-Newman-keuls foi utilizado como teste post-hoc. Valores significativos: $p^* < 0,05$ vs controle. ## estatisticamente igual à dexametasona.

Tabela 7 Efeito da PHEX de *L. pubescens*, dexametasona e indometacina sobre o edema de orelha induzido por diferentes agentes flogísticos em camundongos

| Grupos | Edema (mg) ^a | | | | |
|------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------|----------------------------|--------------------------|
| | AA | Fenol | Capsaicina | Histamina | EPP |
| Controle | 4,50 ± 0,46 | 9,71 ± 0,88 | 3,21 ± 1,32 | 6,98 ± 1,75 | 3,30 ± 0,60 |
| Indo ^b | 0,81 ± 0,21 ^{***} | | | | |
| Dex ^c | | 0,62 ± 0,32 ^{***} | | 0,88 ± 0,33 ^{***} | 1,60 ± 0,23 [*] |
| PHEX 1,0 mg/or. ^d | 1,15 ± 0,27 ^{***} | 0,51 ± 0,11 ^{***} | 4,02 ± 0,73 | 2,48 ± 0,88 ^{***} | 1,10 ± 0,22 [*] |
| PHEX 0,5 mg/or. ^d | 1,33 ± 0,28 ^{***} | 4,85 ± 1,30 ^{***} | 3,30 ± 0,82 | 6,28 ± 1,64 | 1,12 ± 0,45 [*] |
| PHEX 0,1 mg/or. ^d | 3,68 ± 0,69 | 1,78 ± 0,60 ^{***} | 3,84 ± 0,94 | 5,05 ± 0,88 | 2,30 ± 0,59 |

^aDados expressos como a média ± EPM; ^b Indometacina; ^c Dexametasona; PHEX 1,0; 0,5 ou 0,1 mg/orelha; ^{***} $p < 0,001$; ^{**} $p < 0,01$; ^{*} $p < 0,05$ quando comparado ao controle negativo (one-way ANOVA seguido pelo teste Student–Newman–Keuls).

4.3.2.7 Efeito da PHEX sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias

Para avaliar a eficácia de PHEX em nível molecular, foi determinado o efeito da PHEX sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias em biópsias das orelhas 6 h após aplicação única do óleo de cróton. A aplicação tópica do óleo de cróton causou um aumento na produção das citocinas IL-1 β (figura 22), IL-6 (figura 23) e TNF- α (figura 24). Em contraste, o tratamento com a PHEX (1 mg/orelha) ou a dexametasona (0,1 mg/orelha) reduziu significativamente o nível de todas as citocinas investigadas.

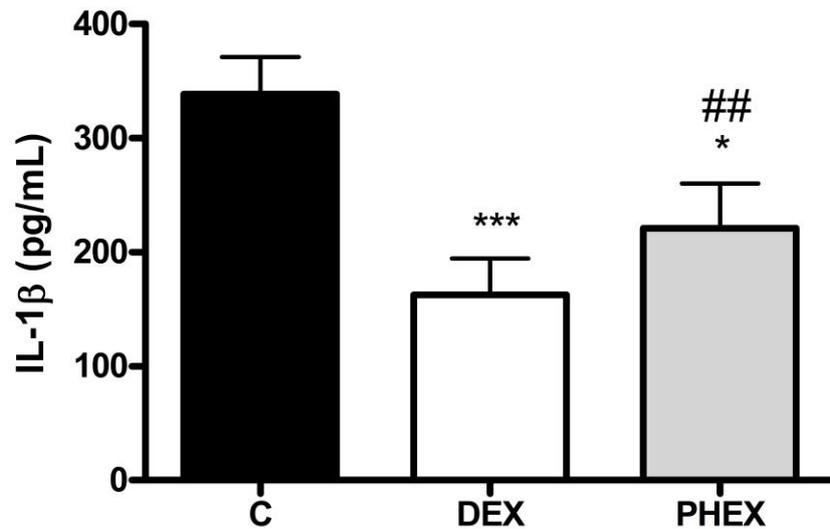


Figura 22 Efeito da PHEX sobre a liberação de IL-1 β induzida por óleo de cróton. O processo inflamatório foi induzido na orelha dos animais pela administração tópica de óleo de cróton (5%), e em seguida receberam o tratamento tópico com PHEX (1,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha). Após 6 h da aplicação do agente flogístico, amostras de tecido (6 mm) foram retiradas e utilizadas para a quantificação dos níveis de IL-1 β por ELISA. As barras representam a média \pm EPM (n=6 - 8). ANOVA, seguido por Student-Newman-keuls foi utilizado como teste post-hoc. Valores significativos: * p <0,05; p ***<0,001 vs controle. ## estatisticamente igual à dexametasona.

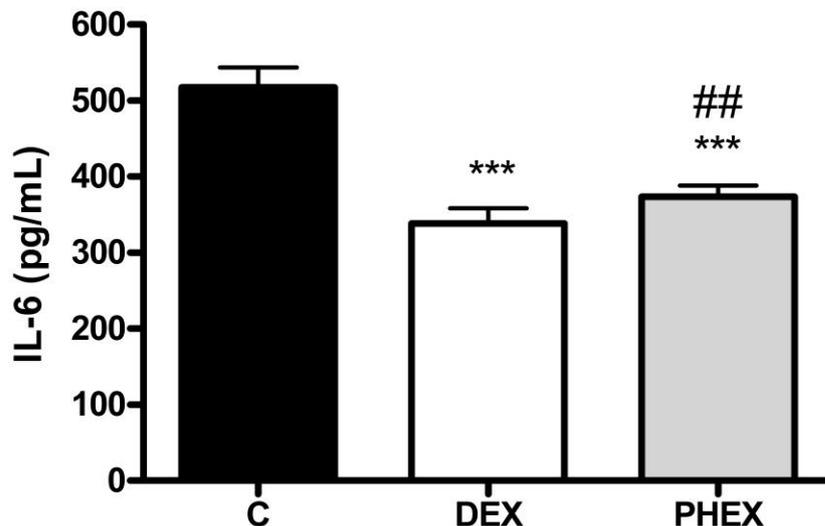


Figura 23 Efeito da PHEX sobre a liberação de IL-6 induzida por óleo de cróton. O processo inflamatório foi induzido na orelha dos animais pela administração tópica de óleo de cróton (5%), e em seguida receberam o tratamento tópico com PHEX (1,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha). Após 6 h da aplicação do agente flogístico, amostras de tecido (6 mm) foram retiradas e utilizadas para a quantificação dos níveis de IL-6 por ELISA. As barras representam a média \pm EPM (n=6 - 8). ANOVA, seguido por Student-Newman-keuls foi utilizado como teste post-hoc. Valores significativos: p ***<0,001 vs controle. ## estatisticamente igual à dexametasona.

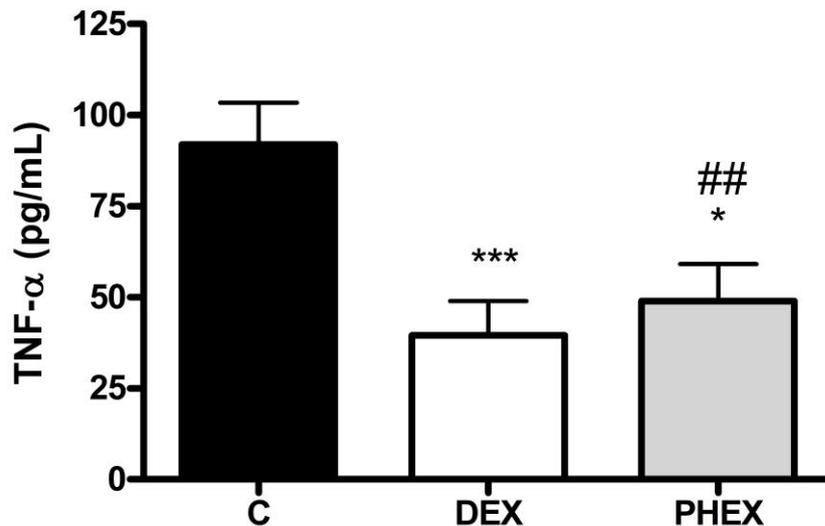


Figura 24 Efeito da PHEX sobre a liberação de TNF- α induzida por óleo de cróton. O processo inflamatório foi induzido na orelha dos animais pela administração tópica de óleo de cróton (5%), e em seguida receberam o tratamento tópico com PHEX (1,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha). Após 6 h da aplicação do agente flogístico, amostras de tecido (6 mm) foram retiradas e utilizadas para a quantificação dos níveis de TNF- α por ELISA. As barras representam a média \pm EPM (n=6 - 8). ANOVA, seguido por Student-Newman-keuls foi utilizado como teste post-hoc. Valores significativos: * $p < 0,05$; $p^{***} < 0,001$ vs controle. ## estatisticamente igual à dexametasona.

4.2.2.8 Efeito das frações ricas em fitol (FH7) e sitosterol (FH9F3) sobre o edema de orelha induzido pela aplicação única do óleo de cróton

Para investigar se as frações FH7 e FH9F3 contribuíram para a atividade anti-inflamatória tópica da PHEX, o modelo do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton foi utilizado. Da mesma forma que a PHEX, a aplicação tópica das frações ricas em fitol (FH7) e sitosterol (FH9F3) (figura 25), na mesma dose do controle positivo (0,1 mg/orelha), reduziu significativamente o edema, com inibição de 57% e 65%, respectivamente.

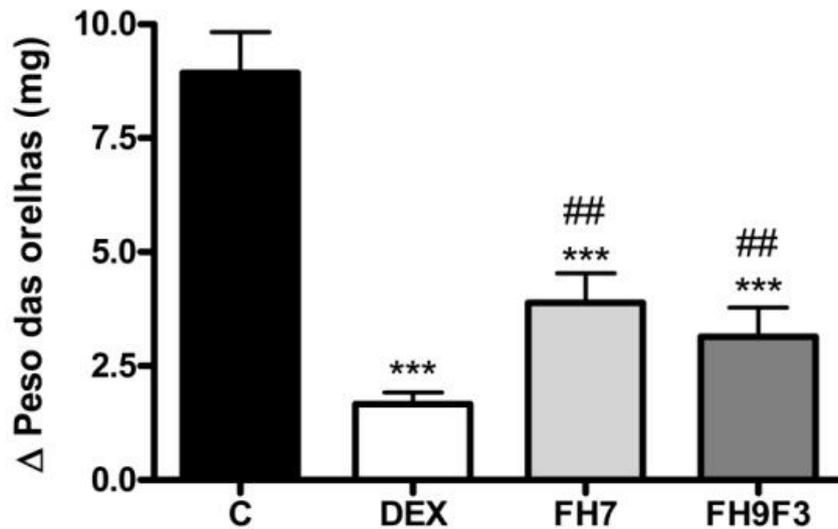


Figura 25 Efeito de FH7 e FH9F3 sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton – aplicação única. Os animais foram desafiados com o óleo de cróton (controle - C) e após 15 min foram tratados com FH7 (0,1 mg/orelha), FH9F3 (0,1 mg/orelha) ou dexametasona (DEX - 0,1 mg/orelha). O peso das orelhas foi avaliado 6 h após a aplicação do agente irritante. As barras representam a média \pm E.P.M. da variação do peso das orelhas em miligramas (mg) (n=6-8). ANOVA, seguido por Student-Newman-keuls foi utilizado como teste post-hoc. Valores significativos: $p^{***} < 0,001$ vs controle. ## estatisticamente igual à dexametasona.

4.2.2.9 Efeito das frações ricas em fitol (FH7) e sitosterol (FH9F3) sobre o edema de orelha induzido pela aplicação do fenol

A PHEX apresentou uma atividade anti-inflamatória estatisticamente igual à dexametasona no modelo do edema de orelha induzido pelo fenol, desta forma as frações FH7 e FH9F3 foram testadas também utilizando este modelo. A aplicação tópica de FH9F3 (figura 26) demonstrou uma redução significativa do edema, com inibição de 51%. A dexametasona apresentou uma inibição de 46%. FH7, em contrapartida, não interferiu no processo inflamatório.

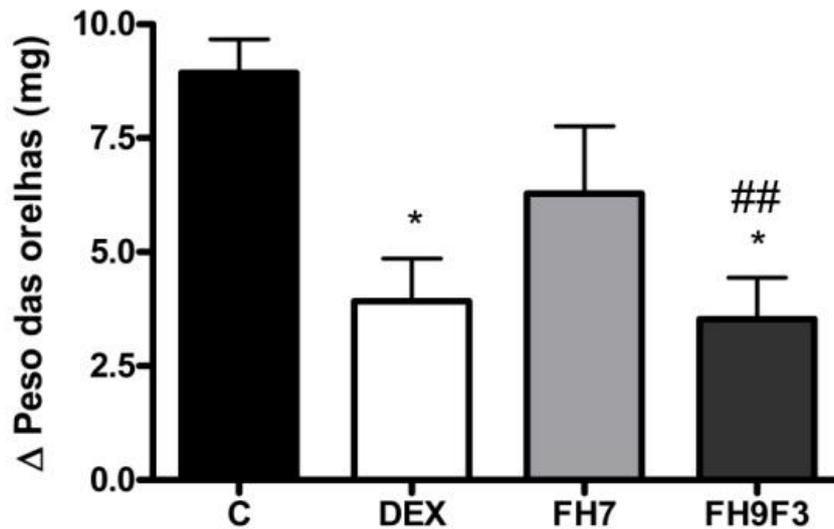


Figura 26 Efeito de FH7 e FH9F3 sobre o edema de orelha induzido pelo fenol. Os animais foram desafiados com o fenol (controle - C) e após 15 min foram tratados com FH7 (0,1 µg/orelha), FH9F3 (0,1 µg/orelha) ou dexametasona (DEX - 0,1 µg/orelha). O peso das orelhas foi avaliado 1 h após a aplicação do agente irritante. As barras representam a média ± E.P.M. da variação do peso das orelhas em miligramas (mg) (n=6-8). ANOVA, seguido por Student-Newman-keuls foi utilizado como teste post-hoc. Valores significativos: $p^* < 0,05$ vs controle. ## estatisticamente igual à dexametasona.

4.3.3 Atividade anti-inflamatória tópica em modelo de inflamação crônica

Neste modelo, o objetivo foi avaliar o efeito do tratamento tópico com PHEX sobre o modelo do edema de orelha induzido por aplicações múltiplas do óleo de cróton, um modelo de inflamação crônica. Inicialmente, a menor dose foi escolhida para este ensaio, considerando que no modelo de inflamação aguda com esse mesmo agente irritante a atividade obtida com PHEX não foi dose-dependente. De acordo com a figura 27A, o tratamento com a PHEX (0,1 mg/orelha, duas vezes ao dia durante 4 dias) não foi capaz de reduzir significativamente o edema quando comparado ao grupo controle negativo. O tratamento com a dexametasona foi eficaz em reduzir significativamente o edema (figura 27A). Os resultados observados ao final do estudo foram confirmados pela avaliação do peso das biópsias das orelhas coletadas ao final do experimento (figura 27B). Enquanto o grupo controle negativo apresentou um edema de $20,83 \pm 1,30$ mg, os tratados com dexametasona e com

PHEX apresentaram, respectivamente, de $13,6 \pm 1,7$ mg (inibição de 34%) e $21,82 \pm 1,35$ mg.

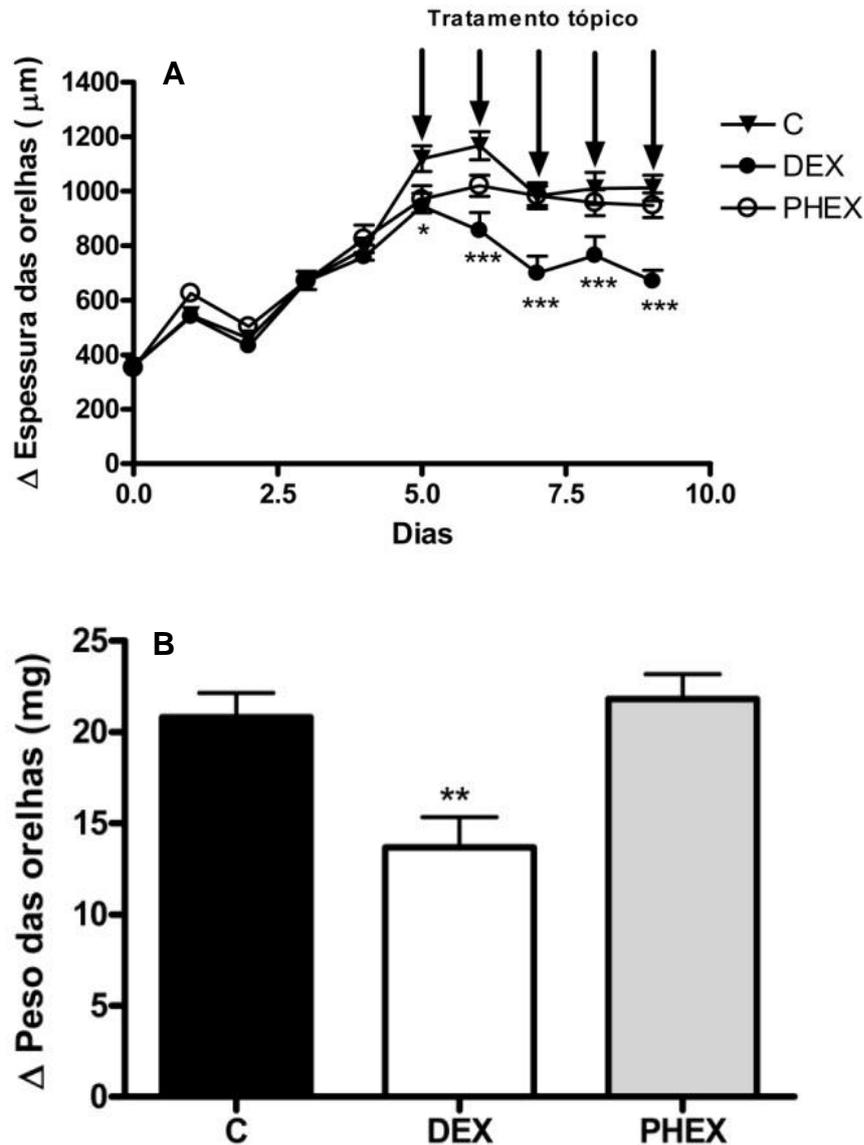


Figura 27 Efeito da PHEX de *L. pubescens* sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton – aplicação múltipla. O processo inflamatório crônico foi induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton em dias alternados durante 9 dias. A PHEX (0,1 mg/orelha) e a dexametasona (DEX - 0,1 mg/orelha) foram aplicados topicamente durante 4 dias (2 vezes ao dia) após o quinto dia do início da aplicação do óleo de cróton e a espessura da orelha medida diariamente (A). No último dia de tratamento amostras das orelhas foram coletadas para avaliação da variação do peso das orelhas (B). Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=6-8). *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ representam o nível de significância em relação ao controle (C).

A figura 28 mostra os cortes histológicos obtidos das biópsias das orelhas edematogênicas induzidas pelas múltiplas aplicações do óleo de cróton. As figuras 28A demonstram que o óleo de cróton promoveu o aumento de parâmetros inflamatórios, como formação de edema e infiltração leucocitária. Nesse modelo é possível também constatar o aumento da espessura da epiderme, promovida pela hiperproliferação dos ceratinócitos (figura 28A). De acordo com os dados analisados, apenas a dexametasona conseguiu diminuir tais parâmetros inflamatórios (figura 28B). Entretanto, o tratamento com PHEX indica uma menor hiperplasia, quando comparado ao controle negativo (figura 28C).

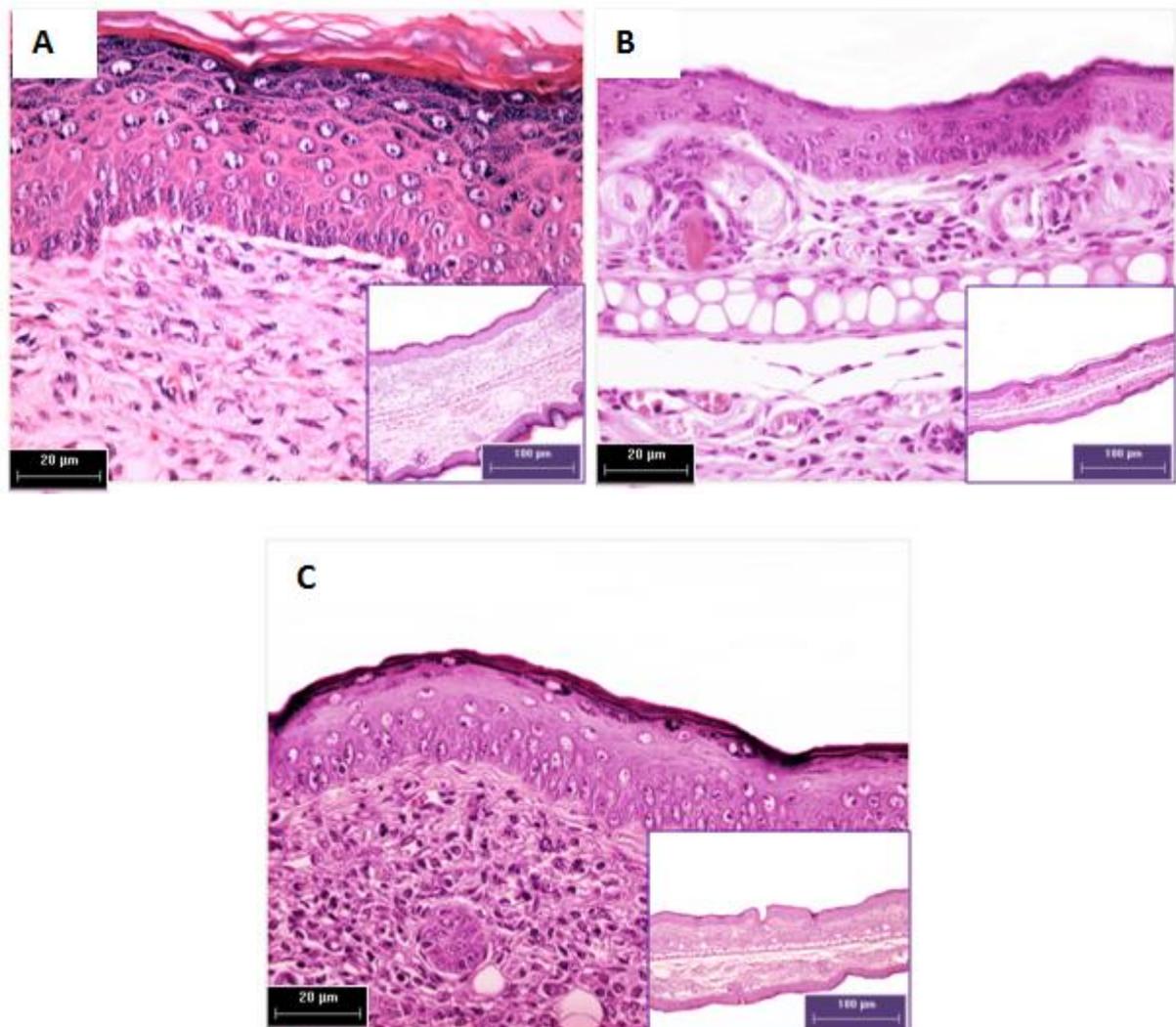


Figura 28 Fotos representativas dos cortes histológicos de orelhas de camundongos corados com hematoxilina-eosina (HE) (100x, escala 50 µm e 400x, escala de 20 µm), após aplicação repetida de óleo de cróton. (A) óleo de cróton + veículo, (B) dexametasona - 0,1 mg/orelha, (C) tratamento com PHEX (0,1 mg/orelha).

Em outra sequência de experimentos, objetivou-se testar uma formulação contendo PHEX utilizando o modelo de inflamação crônica. De acordo com a figura 29, os resultados mostraram que, ao contrário daqueles obtidos decorrente do tratamento com a PHEX utilizando a acetona como veículo, o tratamento com a formulação (ProPHEX 6%, duas vezes ao dias, durante 4 dias) foi capaz de reduzir significativamente o edema da orelha dos animais quando comparado ao grupo controle negativo (creme base). A análise histopatológica confirmou tais resultados, sendo possível verificar que o tratamento com a formulação contendo a PHEX diminuiu acentuadamente o edema, a infiltração leucocitária e a hiperplasia epidérmica (figura 30C) quando comparado ao veículo (figura 30A).

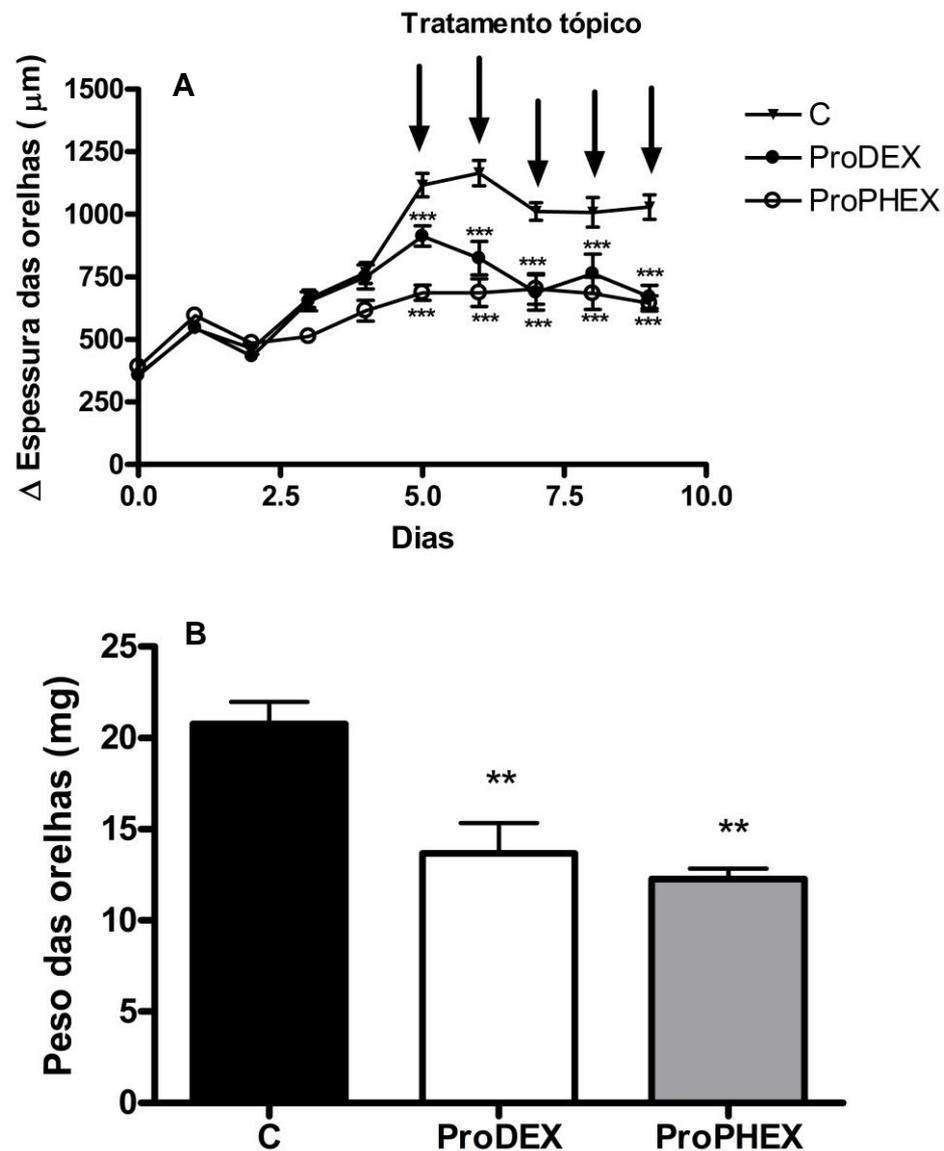


Figura 29 Efeito da PHEX de *L. pubescens* sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton – aplicação múltipla. O processo inflamatório crônico foi induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton em dias alternados durante 9 dias. A ProPHEX (6%) e a dexametasona (ProDEX 0,1%) foram aplicados topicamente durante 4 dias (2 vezes ao dia) após o quinto dia do início da aplicação do óleo de cróton e a espessura da orelha medida diariamente (A). No último dia de tratamento amostras das orelhas foram coletadas para avaliação da variação do peso das orelhas (B). Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=6-8). *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ representam o nível de significância em relação ao controle (C - creme base VersaPro).

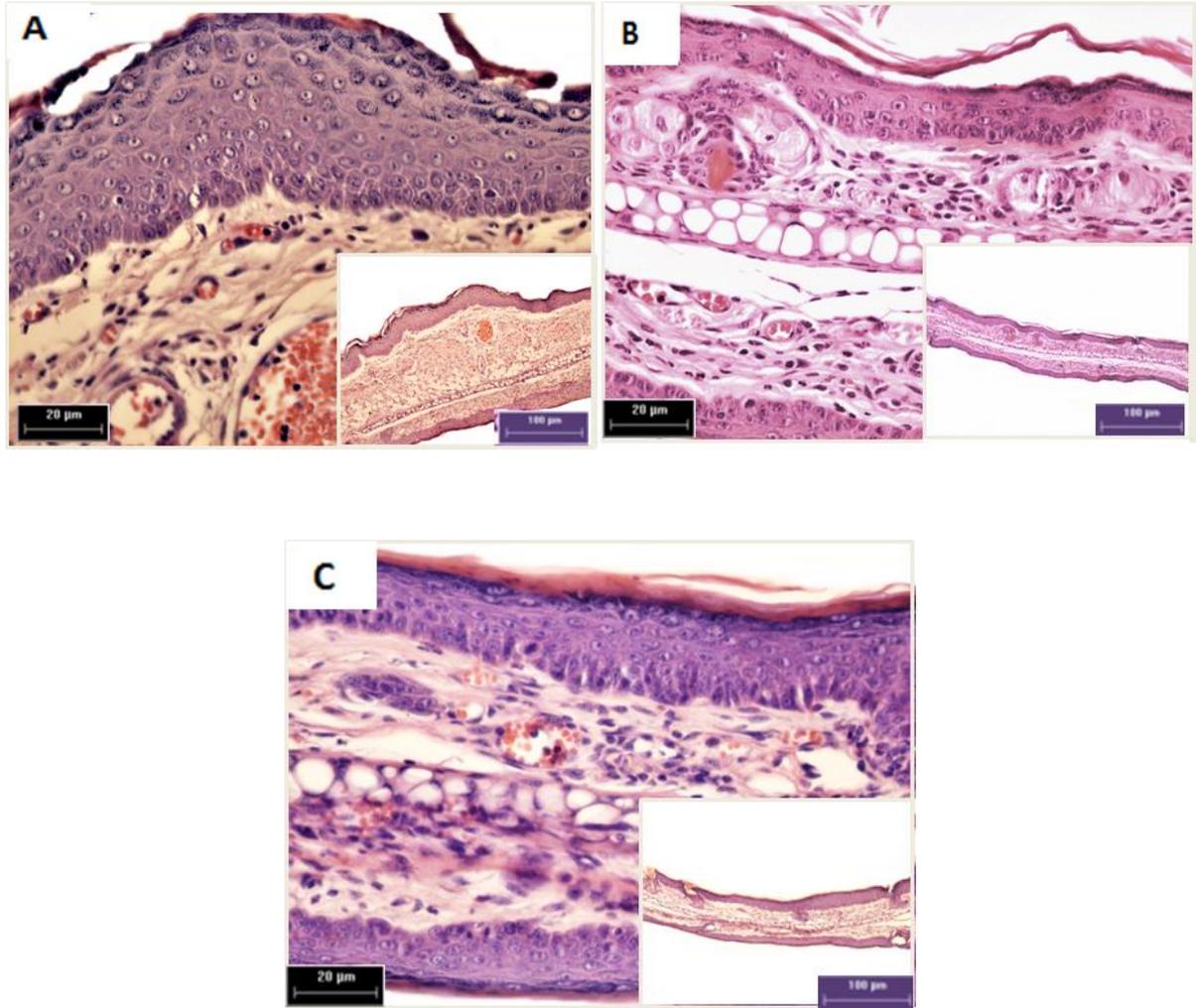


Figura 30 Fotos representativas dos cortes histológicos de orelhas de camundongos corados com hematoxilina-eosina (HE) (100x, escala 50 µm e 400x, escala de 20 µm), após aplicação repetida de óleo de cróton. (A) óleo de cróton + veículo, (B) dexametasona – proDEX 0,1 mg/orelha, (C) tratamento com propHEX (1,0 mg/orelha).

4.3.4 Atrofia cutânea induzida por tratamento tópico com glicocorticoide

Uma vez que os resultados encontrados até esta etapa do trabalho indicaram uma atividade do tipo glicocorticoide, o ensaio de atrofia cutânea foi realizado para observar se a PHEX promovia os mesmos efeitos adversos observados em tratamentos prolongados com a dexametasona.

A aplicação tópica de dexametasona durante 7 dias consecutivos, na ausência de um estímulo inflamatório, promoveu uma redução de aproximadamente 70% na espessura das orelhas dos animais, contudo esta acentuada redução não foi observada nos animais tratados com a PHEX ou veículo (acetona) (figura 31). Além disso, somente o tratamento com a dexametasona alterou o peso corpóreo dos camundongos (figura 32).

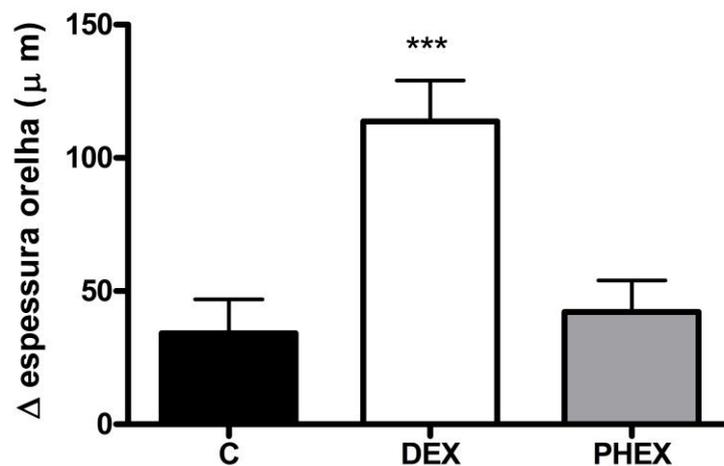


Figura 31 Atrofia cutânea induzida pela aplicação tópica de glicocorticoide. Os animais foram tratados com PHEX (1,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha) 12/12 h durante 7 dias. As barras representam a média \pm E.P.M. da variação da espessura das orelhas em micrômetro (μm) ($n=6-8$). ANOVA, seguido por Student-Newman-keuls foi utilizado como teste post-hoc. Valores significativos: $p^{***}<0,0001$ vs controle.

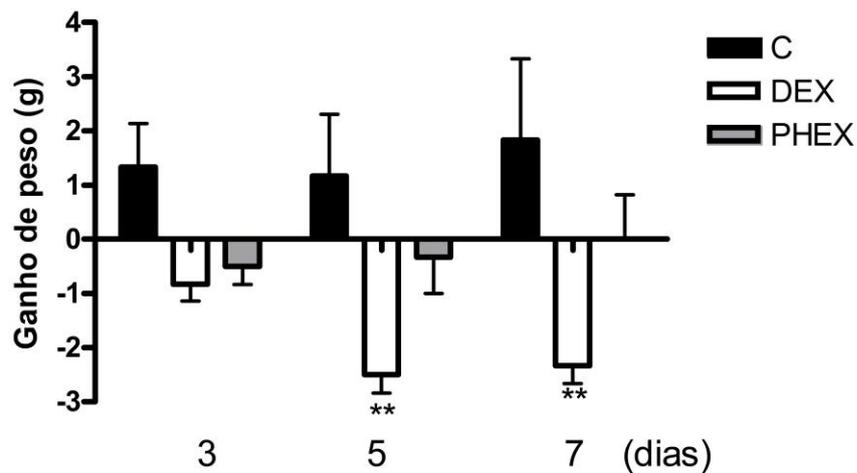


Figura 32 Efeito da PHEX e da dexametasona sobre o ganho de peso corporal dos camundongos. Os animais foram tratados com PHEX (1,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha) 12/12 h durante 7 dias, na ausência de estímulo inflamatório. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. do ganho de peso em gramas (n=6-8). ANOVA, seguido por Bonferroni foi utilizado como teste post-hoc. Valores significativos: $p^{***}<0,01$ vs controle.

No último dia do ensaio de atrofia cutânea, os animais foram eutanaziados para observar uma possível resposta sistêmica decorrente do tratamento com glicocorticoide. Desta forma, o timo, o baço e as adrenais foram coletados e pesados após a eutanásia.

Nenhum tratamento alterou o peso do timo (figura 33), entretanto o tratamento com a dexametasona reduziu significativamente o peso das adrenais em torno de 33% (figura 34) e do baço em torno de 77% (figura 35). Os respectivos órgãos não sofreram alteração decorrente do tratamento com a PHEX (figura 36).

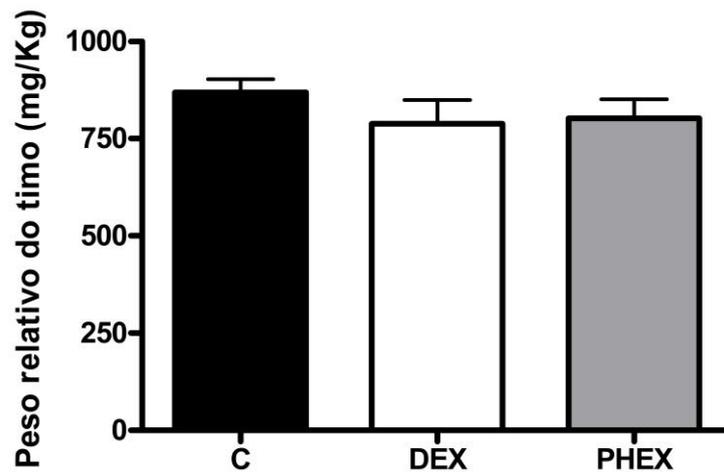


Figura 33 Efeito da PHEX e da dexametasona sobre o peso relativo do timo. Os animais foram tratados com PHEX (1,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha) 12/12 h durante 7 dias, na ausência de estímulo inflamatório. Ao final do tratamento os animais foram eutanasiados e o timo coletado e pesado. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. (n=6-8).

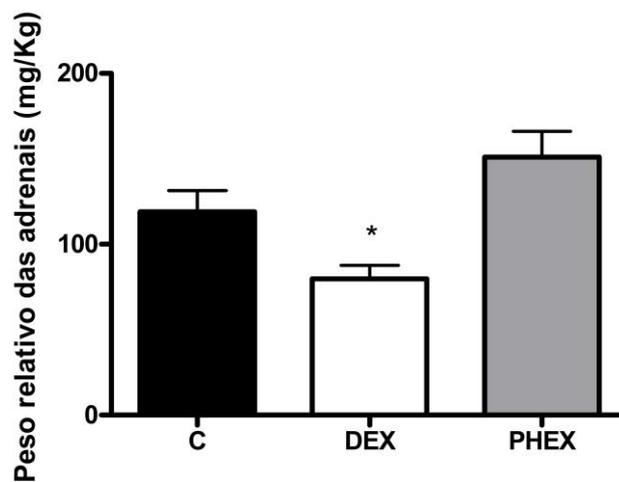


Figura 34 Efeito da PHEX e da dexametasona sobre o peso relativo das adrenais. Os animais foram tratados com PHEX (1,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha) 12/12 h durante 7 dias, na ausência de estímulo inflamatório. Ao final do tratamento os animais foram eutanasiados e as adrenais coletadas e pesadas. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. (n=6-8). * $p < 0,005$ representa o nível de significância em relação ao controle (C - acetona).

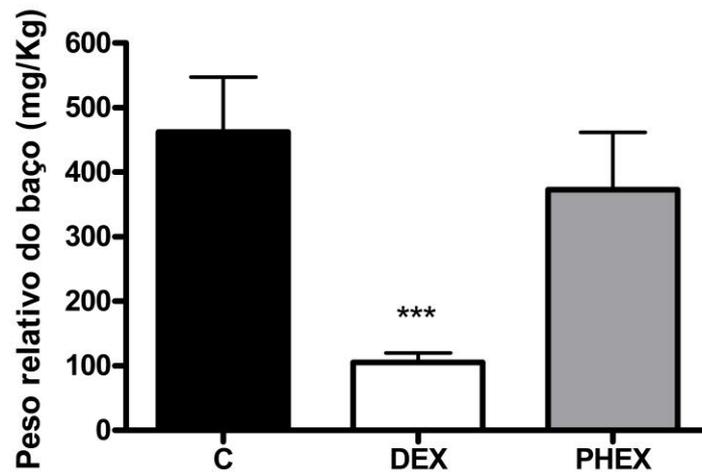


Figura 35 Efeito da PHEX e da dexametasona sobre o peso relativo do baço. Os animais foram tratados com PHEX (1,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha) 12/12 h durante 7 dias, na ausência de estímulo inflamatório. Ao final do tratamento os animais foram eutanasiados e o baço coletado e pesado. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. (n=6-8). *** $p < 0,0001$ representa o nível de significância em relação ao controle (C - acetona).

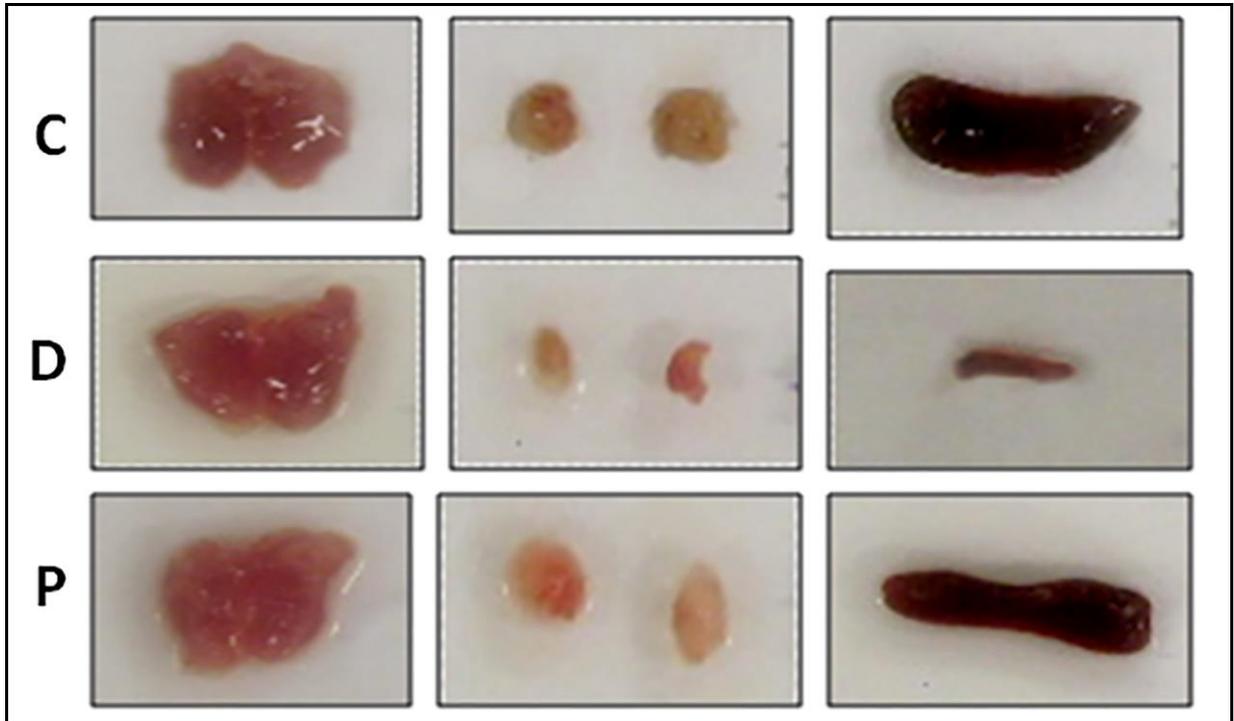


Figura 36 Fotografias representativas do aspecto clínico timo, das adrenais e baços dos camundongos. Os animais foram tratados com PHEX (P) (1,0 mg/orelha) ou dexametasona (D) (0,1 mg/orelha) ou veículo (C) (acetona) 12/12 h durante 7 dias. Os órgãos foram fotografados de uma distância padronizada de 20 cm.

4.3.5 Avaliação da Cicatrização pelo Método de Excisão

Para verificar se a formulação (ProPHEX) poderia influenciar na reparação de uma ferida cutânea, foi realizado um estudo de atividade cicatrizante pelo método de excisão. O tratamento com a dexametasona, comparado ao veículo, retardou a contração da ferida no 9º e 10º dias de experimento. Entretanto, o tratamento com a ProPHEX, além de não ter impedido essa reparação na pele, promoveu uma contração consideravelmente mais rápida da ferida. No 10º dia, proPHEX promoveu uma contração da ferida de 87%, enquanto o tratamento com proDEX, somente 45% (figura 37 e figura 38).

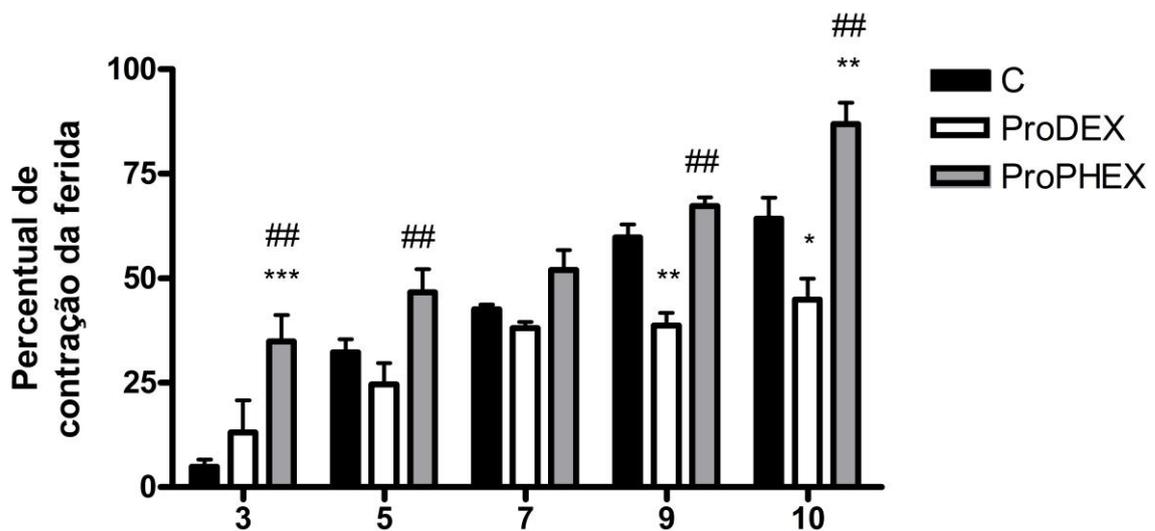


Figura 37 Efeito da PHEX (ProPHEX) e da dexametasona (ProDEX) aplicados por via tópica no modelo de cicatrização por excisão. Os tratamentos foram realizados diariamente, durante 10 dias, após a excisão. A área da lesão foi avaliada nos dias 0, 3, 5, 7, 9 e 10. As barras representam a média \pm E.P.M. do percentual de contração da ferida (n=5). ANOVA, seguido por Bonferroni foi utilizado como teste post-hoc. Valores significativos: $p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$; $p^{***} < 0,001$ vs controle. ## estatisticamente diferente da dexametasona.

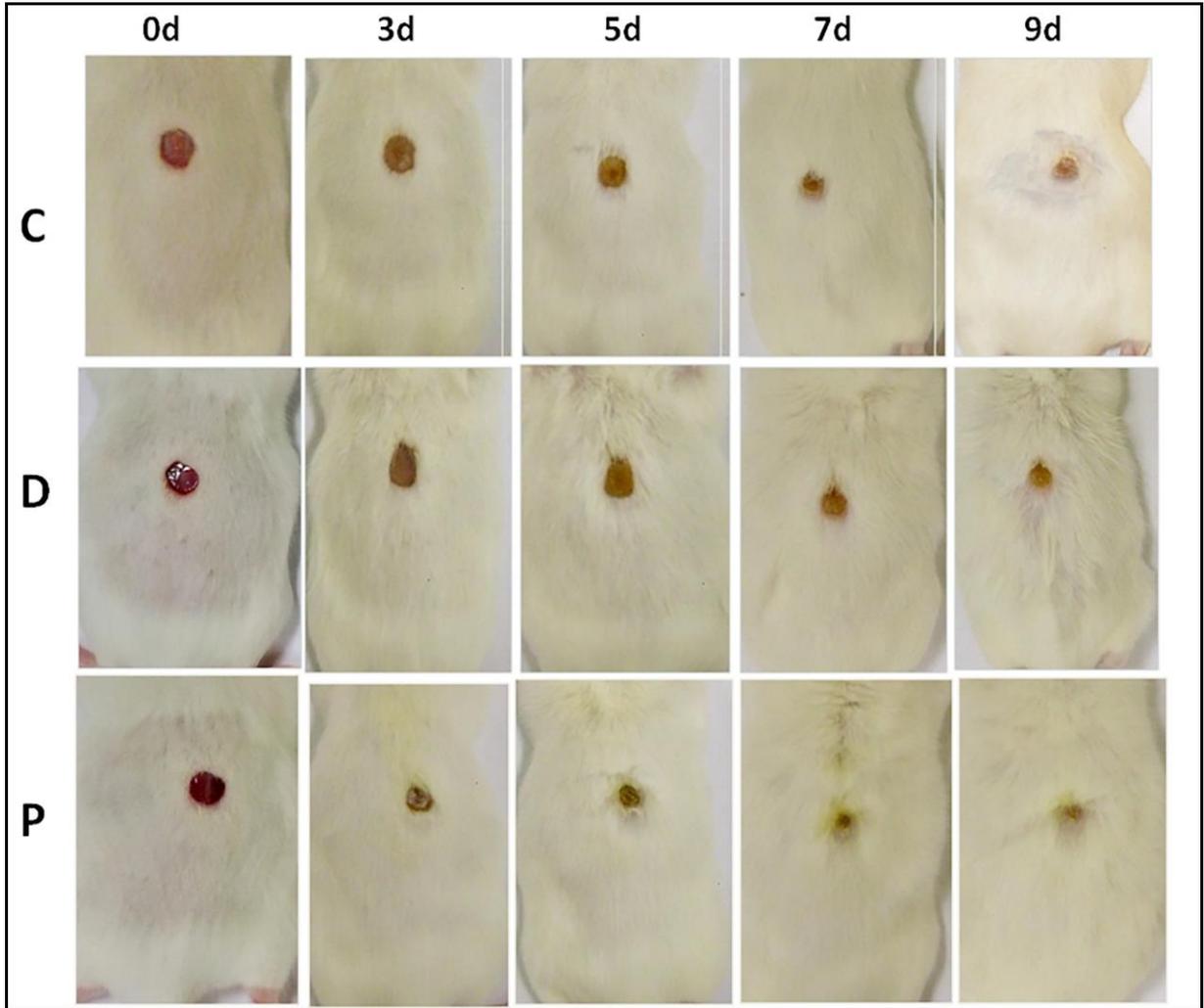


Figura 38 Efeito da PropHEX 6% (PHEX) e ProDEX 0,1% (dexametasona) na cicatrização de lesão por excisão. Fotos representativas da excisão nos dias 0, 3, 5, 7 e 9 nos animais tratados com veículo (creme VersaPro, C), PropHEX (P) ou ProDEX (D).

5 DISCUSSÃO

5.1 Atividade citotóxica sobre linhagens tumorais

Nos últimos anos, uma atenção considerável tem sido direcionada na identificação de substâncias naturais capazes de inibir, retardar ou reverter o processo de carcinogênese em seus vários estágios. Os medicamentos antineoplásicos com efeitos colaterais mínimos e com citotoxicidade específica para as células cancerosas têm sido aqueles de escolha (NAHATA et al., 2012).

Neste trabalho, foi avaliado o potencial citotóxico, *in vitro*, da PHEX e frações utilizando ensaios de citotoxicidade pelo método MTT, diante de linhagens tumorais e não tumorais. Esta técnica avalia a inibição da viabilidade celular pela metabolização do MTT, um sal de coloração amarela que, na presença de desidrogenases mitocondriais, transforma-se em formazan de coloração rósea púrpura, sendo solúvel em veículos aquosos. Este sal tem sido usado com sucesso para verificar a capacidade de redução mitocondrial e viabilidade (KIM et al., 2009).

Foi avaliada a atividade citotóxica da PHEX e frações sobre as linhagens HL60, Jurkat e MCF-7. A citotoxicidade da PHEX também foi avaliada sobre a linhagem de fibroblastos 3T3. Na figura 9 (p. 66), podemos observar que a PHEX não impediu a proliferação celular diante das três linhagens tumorais, entretanto, após seu fracionamento, várias frações apresentaram atividade. Este fato pode ser atribuído, provavelmente, às pequenas concentrações das substâncias citotóxicas na partição hexânica, as quais foram concentradas após fracionamento com solventes apropriados. A PHEX também foi inativa sobre a linhagem não tumoral 3T3 (figura 10, p. 67).

Dentre as frações obtidas após o fracionamento cromatográfico de PHEX, verificou-se que a sua atividade citotóxica concentrou-se nas frações FH7 a FH16. Dentre estas, as mais ativas para células tumorais foram FH7, FH9 e FH16, as quais não apresentaram toxicidade para macrófagos murinos (tabela 4, p. 70) na máxima concentração testada (100 µg/mL). Assim, FH7 e FH9F3 foram selecionadas para a determinação da CI_{50} sobre as linhagens HL60 e Jurkat.

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI), valores de $CI_{50} \leq 30$ $\mu\text{g/mL}$ são significativos para extratos vegetais, e foram adotados neste trabalho (SUFFNESS e PEZZUTO, 1990). De acordo com a tabela 2 (p. 67), FH7 exibiu uma baixa atividade para a linhagem HL60, e a linhagem Jurkat apresentou resistência diante do tratamento com esta amostra. Em contrapartida, FH9F3 apresentou potente atividade citotóxica para ambas as linhagens.

Cabe-se ressaltar que a linhagem Jurkat apresenta maior resistência à apoptose comparada à linhagem HL60. Um estudo realizado por Karpinich e colaboradores (2006) demonstrou que a linhagem Jurkat não expressa P53 e Bax, duas proteínas pró-apoptóticas fundamentais para indução de apoptose desencadeada por dano no DNA, o que justifica a maior resistência à fragmentação do DNA mediado por substâncias citotóxicas. Desta forma, os resultados obtidos com FH9F3 são bastante relevantes.

Na literatura, inúmeros trabalhos evidenciam as propriedades anticâncer do sitosterol, o qual é um dos mais prevalentes fitoesteróis derivados de vegetais na dieta. Os fitoesteróis são estruturalmente semelhantes ao colesterol, mas com algumas modificações. Estas envolvem a cadeia lateral e incluem a adição de uma ligação dupla e/ou de grupos metil ou etil (AWAD et al., 2000). Moon e colaboradores (2008) elucidaram alguns mecanismos responsáveis pela atividade antiproliferativa do sitosterol em células leucêmicas (HL60 e U937). Os autores observaram que esta substância induz a parada em G2/M do ciclo celular, endoreduplicação e apoptose através das vias de sinalização de PI3K/Akt. Desta forma, a atividade citotóxica observada para FH9F3 poderia estar relacionada a um dos mecanismos moleculares encontrados pelos autores do estudo mencionado, considerando que esta fração é rica em sitosterol (70%).

Ainda, estudo conduzido por Li e colaboradores (2004), mostrou que o sitosterol é um inibidor seletivo da DNA polimerase e foi capaz de potencializar a ação de Bleomicina (fármaco antitumoral) em células tumorais humanas cultivadas. Sitosterol também teve sua citotoxicidade determinada sobre células Hep2 (carcinoma de laringe humana), o qual mostrou ser mais potente que a Cisplatina, medicamento de referência utilizado como controle positivo (MATOS et al., 2006).

Alguns trabalhos similares também elucidaram os mecanismos pelo qual o sitosterol exerce sua função antiproliferativa em diversas linhagens tumorais. Estudos suportam a hipótese que sitosterol é um agente promotor de apoptose

eficaz, principalmente por ativar a sinalização mediada por receptor Fas em linhagens de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) (AWAD et al., 2007). Outros estudos (PARK et al., 2007) mostraram que esta substância induz também apoptose em linhagens leucêmicas U937, por meio da ativação de caspase-3 e indução da razão de Bax/Bcl-2. Outro trabalho (EL-READI et al., 2010) mostrou que sitosterol glicosilado inibe a atividade de P-glicoproteína (P-gp) em linhagens leucêmicas multiresistentes (CEM/ADR5000). P-gp é uma proteína transportadora de membrana, responsável pelo controle do influxo de drogas nas células e desempenha um importante papel na multiresistência a fármacos. Sitosterol ainda promoveu pronunciada citotoxicidade em linhagens A549 (carcinoma de pulmão) (HSU et al., 2011), induziu a parada do ciclo celular em G2/M e apoptose por meio da supressão de c-Myc em células MCF-7 e A549 (SUNDARRAJ et al., 2012) e também apresentou mais de 50% de citotoxicidade contra as linhagens tumorais de próstata, cólon, fígado e células leucêmicas em um recente trabalho (NAHATA et al., 2013).

Com relação ao fitol, Malek e colaboradores (2009) testaram sua citotoxicidade bem como a de outros constituintes isolados de *Pereskia bleo*. Fitol apresentou atividade sobre células KB (carcinoma de nasofaringe humano) (CI_{50} 7,1 $\mu\text{g/mL}$), sobre células CasKi (carcinoma cervical humano) (CI_{50} 18 $\mu\text{g/mL}$), MCF-7 (CI_{50} 34 $\mu\text{g/mL}$) e A549 (CI_{50} 31 $\mu\text{g/mL}$). O fitol também exibiu alta citotoxicidade sobre células HeLa (carcinoma cervical humano), WI-38 (fibroblasto de pulmão humano) e HL60 (CI_{50} 13,8 - 16,4 $\mu\text{g/mL}$) (BLOCK et al., 2004).

Em conclusão, os resultados encontrados com as algumas frações ativas vão ao encontro dos resultados obtidos por outros autores, os quais verificaram que tanto sitosterol quanto fitol são substâncias citotóxicas para linhagens tumorais, principalmente HL60. Entretanto não há dados na literatura evidenciando a atividade citotóxica de sitosterol sobre a linhagem Jurkat.

5.2 Atividade leishmanicida

A quimioterapia, particularmente no caso das leishmanioses, ainda representa o pilar para o seu controle (KOUNI, 2003). Considerando todos os

inconvenientes citados neste trabalho e levando-se em consideração que as doenças tropicais ganham importância à parte devido à globalização da sociedade atual, o desenvolvimento de novos agentes leishmanicidas é consideravelmente importante.

Foram realizados testes de citotoxicidade de PHEX e frações para as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania*, uma vez que ambas as fases do parasito são utilizadas na pesquisa de fármacos leishmanicidas (SERENO et al., 2007; VERMEERSCH et al., 2009; TEMPONE et al., 2011). Além disso, foram também realizados testes de citotoxicidade das amostras sobre macrófagos peritoneais, que são as células hospedeiras do parasito. Estudos anteriores mostraram que a PHEX apresentou significativa atividade leishmanicida frente às formas promastigotas do parasito, justificando-se, desta forma, o fracionamento biomonitorado por esta atividade (SILVA et al., 2011).

Na avaliação da atividade antipromastigota, a PHEX e frações foram testadas sobre quatro espécies de *Leishmania*, consistindo de três espécies de *Leishmania* do Novo Mundo (*L. braziliensis*, *L. chagasi* e *L. amazonensis*) e uma espécie do Velho Mundo (*L. major*). Na tabela 3 (p. 69), podemos observar que as diferentes espécies apresentaram variações de sensibilidade nas amostras testadas, resultados também relatados por outros autores (ESCOBAR et al., 2002; CROFT, SEIFERT e YARDLEY, 2006; SERENO et al., 2007). A PHEX foi ativa diante de três espécies do parasito, e apenas *L. chagasi* apresentou resistência. Além disso, esta espécie de *Leishmania* foi resistente a todas as frações, contudo sete frações foram ativas para as demais espécies de *Leishmania*: *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. major*. A fração FH9 foi a mais ativa diante de *L. braziliensis* (CI_{50} 19,4 ± 0,46 µg/mL) e *L. amazonensis* (CI_{50} 20,4 ± 0,8 µg/mL) e FH7 foi mais ativa diante de *L. major* (CI_{50} 15,5 ± 0,3 µg/mL). Cabe-se ressaltar, que várias amostras apresentaram atividade sobre algumas espécies de *Leishmania*, quando testadas para sua atividade antipromastigota. A citotoxicidade de algumas frações foi inclusive maior do que a verificada para a miltefosina, primeiro fármaco oral para o tratamento da LV e principal avanço na terapia das leishmanioses nas últimas décadas (SINGH, KUMAR e SINGH, 2012).

Com relação aos efeitos tóxicos das amostras sobre a célula hospedeira de *Leishmania*, a maioria apresentou baixa toxicidade para macrófagos peritoneais até a máxima concentração utilizada (100 µg/mL). Embora muitos produtos naturais sejam tradicionalmente utilizados, a sua segurança não é garantida, logo, tanto sua

eficácia quanto sua segurança requerem investigação (TIUMAN et al., 2011). As frações obtidas da PHEX mais seletivas para as formas promastigotas foram FH7 e FH9. Ambas não foram citotóxicas para macrófagos ($CC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$) (tabela 4, p. 70).

Embora as formas promastigotas do gênero *Leishmania* sejam mais utilizadas para a triagem de compostos bioativos, o ensaio é considerado geralmente preliminar, pois este estágio do parasito é significativamente mais suscetível aos efeitos induzidos por drogas que a fase amastigota, sendo esta fase, a forma de vida responsável por todas as manifestações clínicas em humanos. Logo, o modelo intracelular tem sido citado como o padrão - ouro na pesquisa *in vitro* de drogas que combatem a leishmaniose (VERMEERSCH et al., 2009; TEMPONE et al., 2011). Neste trabalho, a PHEX e a FH7 foram escolhidas para a avaliação da citotoxicidade em amastigotas de *L. amazonensis*, devido aos resultados expressivos na atividade antipromastigota e ausência e/ou baixa citotoxicidade em macrófagos. Esta espécie é responsável principalmente pelas manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar. A PHEX apresentou um expressivo resultado para a atividade anti-amastigota ($CI_{50} 6,9 \pm 4,0 \mu\text{g/mL}$), bem como FH7, a qual foi mais eficaz na redução das formas amastigotas ($CI_{50} 32,6 \pm 5,82 \mu\text{g/mL}$) do que promastigotas ($CI_{50} 44,0 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$), com índice de seletividade (IS) para amastigotas, portanto maior. Com relação ao índice de especificidade (IE), FH7 mostrou-se ativa para ambos os estágios do parasito, bem como a PHEX.

A fração FH9 não teve sua atividade anti-amastigota determinada, pois trabalho conduzido por Torres – Santos e colaboradores (2004), ao avaliarem a atividade anti-amastigota diante da espécie *L. amazonensis* de uma fração rica em estigmasterol + sitosterol isolada de *Pourouma guianensis*, encontraram valores de CI_{50} acima de $100 \mu\text{g/mL}$.

Desta forma, considerando que FH7 foi ativa sobre as formas promastigotas e amastigotas e não foi citotóxica sobre *L. amazonensis* nas doses testadas, bem como devido à falta de dados na literatura reportando o potencial leishmanicida do fitol, objetivou-se elucidar o modo pelo qual este diterpeno provoca a morte celular do parasito.

O fitol é um diterpeno pertencente ao grupo dos álcoois acíclicos insaturados de cadeia longa e ramificada e produto do metabolismo da clorofila em plantas

(VETTER et al., 2012). Várias propriedades terapêuticas de fitol têm sido relatadas, incluindo a sua atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis* (REJAB et al., 1998) ou *Staphylococcus aureus* (INOUE et al., 2005), anticonvulsivo (COSTA et al., 2012), antiespasmódico (PONGPRAYOON et al., 1992), anticâncer (LEE et al., 1999) e atividades antinociceptiva, antioxidante (SANTOS et al., 2013) e anti-inflamatória (SILVA et al., 2013). Estudos recentes mostraram que o fitol apresentou atividade esquistossomicida, sendo a esquistossomose outra importante doença tropical negligenciada (MORAES et al., 2014). Além disso, testes em ratos revelaram que esta substância é bem absorvida (30-66% da dose administrada) (MIZE et al., 1966) e de baixa toxicidade (DL50 por via oral e aguda superior a 10.000 mg/kg) (MCGINTY et al., 2010).

Em protozoários tripanosomatídeos, como *Leishmania*, a mitocôndria única é essencial para a sobrevivência do parasito e, portanto, qualquer dano ou disfunção a esta organela leva à morte celular (MENNAA-BARRETO et al., 2014). Isso faz com que a mitocôndria seja um alvo importante para a destruição, a fim de assegurar a morte celular programada (PCD - programmed cell death) ou apoptose. Além disso, a manutenção do potencial de membrana é essencial para a função mitocondrial e, conseqüentemente, a sobrevivência do parasito. Recentemente, um número crescente de estudos mostrando compostos que possuem como alvo a mitocôndria de espécies de *Leishmania* têm sido descritos (INÁCIO et al., 2012; BRITTA et al., 2014). Em células de mamíferos, um exemplo clássico de desordens induzidas por alterações no $\Delta\psi_m$ é um aumento na produção de ROS que possa alterar o estado redox celular (MANZOTE et al., 2014).

O efeito de FH7 sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em formas promastigotas foi avaliado por fluorimetria usando o JC-1, um marcador fluorescente que forma agregados e emite fluorescência vermelha em mitocôndrias funcionais. Em células em apoptose com um baixo $\Delta\psi_m$, o corante permanece no citoplasma e emite fluorescência verde (MACEDO-SILVA et al., 2013). FH7 exerceu a sua atividade antipromastigota produzindo acentuada despolarização do potencial de membrana mitocondrial em todas as concentrações e tempos testados em comparação com o controle negativo, com exceção da maior dose, após 48 h de tratamento (figura 11, p. 72).

Um estresse oxidativo foi também claramente observado neste estudo, refletido pelo aumento dos níveis de ROS em promastigotas de *L. amazonensis*

tratadas com FH7 (figura 12, p. 73) sugerindo-se um evento, sobretudo, tempo-dependente que pode ter contribuído com a morte celular do parasito. Cabe-se ressaltar, que não há diferença estatística entre as doses utilizadas, em ambos os ensaios.

Para investigar os efeitos de FH7 na membrana do parasito, promastigotas foram coradas com IP, um marcador utilizado para distinguir células apoptóticas de células necróticas. Este é um agente intercalante de ácidos nucleicos que seletivamente se difunde através da membrana plasmática e se liga ao DNA e RNA de células cuja membrana plasmática foi lesada (BRITTA et al., 2014). Promastigotas tratadas com FH7 não alteraram a intensidade da fluorescência do IP em todas as concentrações e tempos avaliados, eliminando assim, qualquer evento relacionado à necrose (figura 13, p. 74). Logo, estes resultados sugerem que a necrose não é o principal mecanismo de morte do parasito induzida por FH7.

Nesta parte do trabalho, foi observado que a despolarização do potencial mitocondrial está associada com a produção de ROS em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com FH7, mas o tratamento não conduziu à ruptura da membrana plasmática. Isto sugere que apoptose é o principal mecanismo induzido por fitol através de um processo que envolve a mitocôndria do parasito. No entanto, novos estudos relacionados a outros eventos apoptóticos tais como exposição de fosfatidilserina, alteração do ciclo celular e fragmentação do DNA nuclear são necessários para confirmar os resultados obtidos com FH7.

5.3 Atividade anti-inflamatória tópica

Recentes estudos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa, com a espécie *L. pubescens*, mostraram que a PHEX possui uma significativa atividade anti-edematogênica quando administrada topicamente na orelha de camundongos submetidos à indução de um processo inflamatório agudo (SILVA et al., 2012^b). Um dos objetivos deste trabalho, portanto, foi investigar o efeito da PHEX administrada topicamente utilizando diferentes agentes irritantes, a fim de confirmar sua atividade anti-inflamatória, determinar a melhor dose a ser administrada e desvendar seus possíveis mecanismos de ação. Antes da realização dos ensaios para a pesquisa da

atividade anti-inflamatória desta espécie, foi investigada sua possível toxicidade tópica. Após um período de exposição de 4 h ao tratamento com PHEX, nenhuma resposta dérmica, incluindo eritema e/ou edema, foi encontrada nos animais. Assim, PHEX se revelou segura quando administrada topicamente em ratos.

Vários modelos farmacológicos experimentais podem ser usados para avaliar a atividade anti-inflamatória de drogas. O modelo do edema de orelha induzido por diferentes agentes irritantes (óleo de cróton, AA, fenol, capsaicina, histamina e EPP) permite identificar substâncias com atividade anti-inflamatória e propor seu possível mecanismo de ação. Esse modelo é bastante útil na busca pelo tratamento de doenças inflamatórias da pele, pois promovem condições que se assemelham a alguns tipos de dermatites observadas em humanos (VANE e BOTTING, 1998; GABOR, 2000).

O presente trabalho fornece evidências de que a fração mais apolar das folhas de *L. pubescens* claramente exerceu seus efeitos em todos os modelos utilizados, exceto no modelo do edema de orelha induzido pela capsaicina, de maneira similar à dexametasona e/ou à indometacina, os anti-inflamatórios de referência utilizados neste estudo.

O óleo de cróton contém 13-acetato de 12-O-tetracanoilforbol (TPA) como principal agente irritante, e quando aplicado topicamente, os resultados são um aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, migração de leucócitos polimorfonucleares (principalmente neutrófilos), liberação de histamina e serotonina e uma moderada síntese de eicosanoides (TUBARO et al, 1985; BADILLA et al, 2007). O óleo de cróton provoca efeitos semelhantes ao TPA, ativando a proteína quinase C (PKC), a qual por sua vez leva à ativação de outros grupos enzimáticos, tais como proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e PLA2 (fosfolipase A2). A PLA2 induz a liberação de ácido araquidônico (AA), o qual desencadeia consequentemente a produção de eicosanoides inflamatórios por meio das enzimas ciclo-oxigenases (COX) ou lipo-oxigenases (LOX) (FERRANDIZ et al., 1996; WANG et al., 2000; MURAKAWA et al., 2006). Estes metabólitos, assim como as citocinas, são mediadores das vias inflamatórias e são responsáveis por desencadear e manter a inflamação (STANLEY et al., 1991). Assim, o óleo de cróton induz um processo inflamatório ativando diversas vias inflamatórias, e inibidores da COX e 5-LOX, antagonistas dos leucotrienos B4 (LTB4) e glicocorticoides mostram ação anti-inflamatória tópica em modelos animais de inflamação cutânea induzida por TPA ou

óleo cróton (MURAKAWA et al., 2006). No que diz respeito ao modelo do edema de orelha induzido pelo óleo cróton com uma aplicação única, PHEX não apresentou atividade antiedematogênica por via oral (SILVA et al., 2012^b). Quando administrada topicamente, PHEX evidenciou uma diminuição significativa do edema em todas as doses testadas (figura 14, p. 77), sugerindo, portanto, que esta amostra possui atividade exclusivamente por esta via de administração.

Como mostrado na figura 15 (p. 78), PHEX foi capaz de reduzir o número de leucócitos no tecido inflamado evidenciado pela atividade da MPO. A MPO é conhecida como um marcador direto da infiltração de neutrófilos; por conseguinte, a inibição da sua atividade pode ser utilizada como um indicador da ação anti-inflamatória de um determinado extrato ou substância (BRADLEY et al., 1982). No nosso estudo, PHEX foi capaz de diminuir a atividade desta enzima, sugerindo a possibilidade de interferência na migração celular durante o processo inflamatório. A análise histopatológica confirmou que PHEX, assim como a dexametasona, inibiram o influxo de polimorfonucleares induzido por óleo de cróton para a derme da orelha dos camundongos, bem como a intensidade do edema e, portanto, pode ser uma abordagem terapêutica para doenças dermatológicas (figura 16, p. 79).

A aplicação local de AA estimula uma rápida resposta inflamatória que contribui para uma vasodilatação imediata e eritema, seguido pelo desenvolvimento de edema, que coincide com o extravasamento de proteínas e leucócitos (YOUNG et al., 1984; CRUMMEY et al., 1987). O AA é um precursor de eicosanoides inflamatórios, tais como a prostaglandina E₂ e leucotrienos (produzidos por meio de COX - 1, COX - 2 e 5 - LOX). A indometacina, um AINE, cuja ação anti-inflamatória está relacionada com a inibição não seletiva das isoformas de COX (COX - 1 e COX - 2), reverte claramente o edema induzido pela aplicação tópica de AA, tal como descrito na literatura (GABOR, 2000). Dexametasona, igualmente modula a produção de metabolitos do AA, provavelmente por meio da inibição de enzimas COX e LOX ou através da produção de eicosanoides anti-inflamatórios (LAWRENCE et al., 2002). Metabólitos do AA estão também envolvidos na degranulação de mastócitos, a qual é acompanhada por liberação de histamina. Consequentemente, anti-histamínicos são também capazes de reduzir o edema induzido por AA (CRUMMEY et al., 1987). A PHEX nas doses de 1 e 0,5 mg/orelha diminuiu o edema neste modelo em relação ao grupo controle negativo (figura 17, p. 80). Estes dados

indicam que PHEX pode diminuir a produção de eicosanoides inflamatórios contribuindo para o efeito anti-inflamatório observado (CARLSON et al., 1985).

O edema de orelha induzido por fenol é um modelo que simula as dermatites de contato. Quando fenol entra em contato direto com a pele, ceratinócitos produzem mediadores químicos que são importantes em respostas de irritação de contato primário, incluindo citocinas associadas com propriedades pró-inflamatórias, tais como IL-1 α , TNF- α e IL-8 (LIM et al., 2004). Este mecanismo independe da via de ativação de PKC, o que por sua vez resulta na liberação de outros mediadores inflamatórios, como espécies reativas de oxigênio (ROS) (WILMER et al., 1994; MURRAY et al., 2007). A PHEX, em todas as doses, reduziu significativamente o edema induzido por fenol, quando comparada com o grupo controle negativo, indicando uma provável atividade contra a dermatite de contato (figura 18). Os compostos presentes em PHEX poderiam estar modulando a produção de ROS, considerando os estudos anteriores que evidenciaram uma moderada atividade antioxidante desta mesma amostra (SILVA et al., 2012^a).

A capsaicina, em contato com a epiderme, exerce um efeito imediato sobre um alvo, os receptores vaniloides subtipo-1 (TRPV1). Uma imediata resposta inflamatória neurogênica é uma consequência desta ação, caracterizada por vasodilatação arteriolar, aumento do fluxo sanguíneo e consequente extravasamento de plasma e sensibilização à dor (GABOR, 2000), com a liberação de neuropeptídeos (tais como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, substância P e taquicininas) e monoaminas (histamina e serotonina) (GABOR e RAZZA, 1992; INOUE, NAGATA e KOSHIHARA, 1995^{a, b}). O edema de orelha induzido por capsaicina é inibido por inibidores funcionais da capsaicina, como rutênio vermelho, por antagonistas de receptores de taquicinina NK1 e antagonistas de receptores de histamina H1 e/ou 5-HT2, mas não por inibidores da via do ácido araquidônico (INOUE, NAGATA e KOSHIHARA, 1993; INOUE, NAGATA e KOSHIHARA, 1995^{a, b}). A PHEX não apresentou redução significativa neste modelo, o que sugere a sua falta de interferência nas substâncias e receptores envolvidos em vias inflamatórias ativadas por capsaicina.

Sabe-se que os mastócitos provocam reações alérgicas do tipo imediato em resposta a alergênicos devido a liberação de mediadores químicos, em particular a histamina (MARSHALL e BIENENSTOCK, 1994). A histamina causa vasodilatação e aumento da permeabilidade microvascular (CLOUGH, BENNETT e CHURCH, 1998;

CLOUGH, 1999), bem como estimula as fibras nervosas (GREAVES e WALL, 1996). Os fármacos anti-histamínicos e glicocorticoides reduzem o edema neste modelo. Em nosso trabalho, a PHEX modificou o edema de orelha induzido pela histamina, na dose de 1 mg/orelha, quando comparada ao controle negativo (solução salina) (figura 20, p. 83).

A resposta inflamatória local por EPP é principalmente de natureza vascular, envolvendo um aumento da permeabilidade e fluxo sanguíneo e a infiltração de leucócitos (JUST et al., 1998). Este evento é causado pela liberação de vários mediadores inflamatórios, tais como histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas (BRATTSAND et al., 1982). Como na maioria dos outros modelos, a PHEX inibiu significativamente a formação de edema de orelha induzido por EPP (figura 21, p. 84).

Este estudo também mostrou que o óleo de cróton é capaz de induzir a expressão de citocinas inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , as quais, segundo alguns autores, são peças centrais no processo inflamatório cutâneo (MURAKAWA et al., 2006; LEE et al., 2009). A IL-1 β ativa uma via que resulta na transcrição de uma série de genes que levam a expressão de diversas moléculas importantes para o processo inflamatório como moléculas de adesão, quimiocinas, citocinas secundárias, a enzima óxido nítrico sintase e ciclo-oxigenase (OTUKI et al., 2005). O TNF- α também é responsável pela indução da expressão de diversos genes que sustentam a resposta inflamatória cutânea. Além disso, o TNF- α ativa a via de sinalização de transdução que ativa o NF- κ B, o que leva um “feedback” pró-inflamatório positivo (AMIGÓ et al., 2007). Um estímulo nocivo, rapidamente gera também a indução da expressão e liberação de IL-6. Essa citocina atua de maneira sinérgica com o TNF- α desencadeando uma resposta inflamatória aguda. IL-6 é conhecida por ser liberada principalmente por células T e por ativar células B (PAQUET e PIERARD, 1996). Quando comparado ao controle negativo, o tratamento com PHEX (1 mg/orelha) e a dexametasona (0,1 mg/orelha) significativamente diminuíram os níveis das citocinas inflamatórias investigadas neste trabalho (figuras 22, 23 e 24, pp. 86 e 87). Os resultados sugerem que este mecanismo, ao menos parcialmente, contribuiu para a resposta anti-inflamatória de PHEX em processo inflamatório agudo na pele.

Considerando que o efeito anti-inflamatório mais significativo da PHEX foi diante do modelo do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton e pelo fenol,

estes foram selecionados para verificar, se de alguma maneira, FH7 e FH9F3 contribuíram para a atividade anti-inflamatória observada para PHEX. Além disso, o fenol é um interessante modelo de dermatite de contato irritativa, as quais são responsáveis por 10% das consultas atendidas em consultórios dermatológicos e alergistas e mais de 90% de todas as dermatoses ocupacionais são dermatites de contato causadas pelo contato direto com produtos químicos no local de trabalho (MOTTA et al., 2011; NICHOLSON et al., 2010). De fato, a fração rica em sitosterol (FH9F3) evidenciou uma significativa diminuição no edema de orelha, na mesma dose da dexametasona, em ambos os modelos (figuras 25 e 26, pp. 88 e 89). Além disso, no modelo do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, a PHEX na dose de 0,1 mg/orelha, diminuiu 65% da inflamação, mesma inibição verificada para FH9F3. Logo, esse resultado confirma a contribuição da fração rica em sitosterol na atividade anti-inflamatória tópica de *L. pubescens*.

A fração FH7 também foi avaliada no modelo do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton e exibiu semelhante perfil de atividade anti-inflamatória tópica quando comparado à dexametasona (figura 25, p. 88). Recentemente, Silva e colaboradores (2013) mostraram que fitol atenua a resposta inflamatória por inibir a migração de neutrófilos, que é, em parte, causada pela redução na IL-1 β , TNF- α e estresse oxidativo. Em contrapartida, esta fração não diminuiu a inflamação no modelo de dermatite de contato irritativa, induzida pelo fenol (figura 26, p. 89).

Enquanto a aplicação única de óleo de cróton fornece dados relativos à atividade antiedematogênica em um processo inflamatório agudo, aplicações múltiplas do óleo de cróton podem ser usadas para avaliar a atividade antiedematogênica em um processo inflamatório estabelecido (crônico) (STANLEY et al., 1991). De fato, a aplicação repetida do óleo de cróton está associada a um aumento no peso da orelha, intensa infiltração leucocitária, migração de macrófagos e células T (CD4⁺ e CD8⁺) e hiperproliferação da epiderme (acantose), condições presentes em lesões psoriáticas. Glicocorticoides e inibidores de 5-LOX reduzem o efeito edematogênico neste modelo, enquanto que os inibidores de COX e anti-histamínicos mostram pouco ou nenhum efeito (GREEN e SHUSTER, 1987). No que diz respeito a este modelo de inflamação, inicialmente a dose escolhida foi a mais baixa (0,1 mg/orelha), uma vez que na aplicação única do óleo de cróton a atividade de PHEX não havia sido dose-dependente. Neste modelo, a PHEX não causou a supressão do edema na dose administrada (figura 27, p. 90). Estes dados foram

posteriormente confirmados pela análise histopatológica (figura 28, p. 91). Entretanto, apesar da terapêutica com a PHEX não ter suprimido o edema neste modelo crônico, houve redução na espessura da epiderme, apesar de menos significativa quando comparada à dexametasona. Essa redução se caracteriza pela ausência de hiperqueratose, leve hipergranulose e menor número de células espinhosas. Logo, houve redução da hiperplasia epidérmica com o tratamento de PHEX (figura 28C, p. 91).

A análise dos resultados histopatológicos das orelhas submetidas ao processo inflamatório crônico nos levou a supor que, possivelmente a ineficácia neste modelo poderia ser decorrente da má absorção da amostra devido ao espessamento da epiderme. Além disso, tanto a dose escolhida (0,1 mg/orelha), quanto o veículo utilizado (acetona) talvez não seriam os apropriados, tendo em vista que apesar de não ter suprimido o edema, a PHEX foi eficaz em reduzir a espessura da epiderme. Desta forma, um novo experimento foi realizado, mas utilizando um veículo cremoso e emoliente. De fato, a uma formulação com creme base, no qual foi incorporada a PHEX (proPHEX) na concentração de 6%, diminuiu significativamente o edema quando comparada ao veículo (figura 29, p. 93).

Assim, após análise dos resultados apresentados para PHEX, sugerimos um efeito do tipo glicocorticoide. Este fato é suportado, pelo menos em parte, pela presença de sitosterol, um esteroide com estrutura semelhante à dexametasona e que reduziu significativamente o edema induzido por óleo de cróton. Os glicocorticoides, incluindo a dexametasona, se ligam a receptores intracelulares específicos que ativam ou reprimem a transcrição de genes, a fim de inibir as ações do sistema imunológico como um todo. Eles também inibem a expressão de COX-2, iNOS, fatores de adesão, citocinas e o sistema complemento; podem também induzir a expressão de outras proteínas, tais como a anexina-1, que inibe a síntese de prostanoídes (RANG et al., 2007). Estes dados são suportados pela literatura, a qual indica que o sitosterol (dose de 0,5 mg/orelha), isolado de *Achillea ageratum*, é eficaz como um agente anti-inflamatório tópico em processos inflamatórios agudos e crônicos (GOMES et al., 1999).

Os glicocorticoides, em concentrações farmacológicas adequadas, apresentam potentes efeitos anti-inflamatórios. Assim, inúmeras desordens autoimunes, inflamatórias e alérgicas, tais como asma, artrite reumatóide, colite ulcerativa, e rinite alérgica são muitas vezes tratadas com glicocorticoides sintéticos,

tais como a dexametasona. Apesar da sua excelente eficácia anti-inflamatória, o uso desses agentes terapêuticos muitas vezes é restringida devido a dois inconvenientes. Primeiro, o tratamento de longo prazo é muitas vezes acompanhado por efeitos secundários severos, tais como diabetes, osteoporose e hipertensão. Em segundo lugar, o aparecimento de resistência a esses medicamentos também limita o sucesso de muitas terapias (VANDEVYVER et al., 2013). Desta forma, uma vez que PHEX possivelmente apresenta um efeito do tipo glicocorticoide, objetivou-se investigar se a mesma poderia desencadear alguns efeitos adversos semelhantes aos da dexametasona.

Considerando que a via tópica foi escolhida neste trabalho, inicialmente verificou-se a influência de PHEX em um ensaio de atrofia cutânea. Neste sentido, os glicocorticoides causam uma redução na atividade mitótica dos ceratinócitos da camada basal e achatamento das papilas dérmicas. Eles também podem causar uma perda de substância fundamental e redução do tamanho dos fibroblastos. Estas mudanças, em última análise, provocam afinamento da derme e aumentam a fragilidade da pele. Em alguns casos, os esteroides têm efeito no desenvolvimento da célula endotelial microvascular provocando a formação de telangiectasia, enquanto a perda de substância fundamental diminui o apoio estrutural para os vasos sanguíneos e aumenta a sua dilatação, levando conseqüentemente a equimoses (POETKER e REH, 2010). Neste experimento, ficou demonstrado que a aplicação tópica repetida da PHEX não conduziu à fragilidade e afinamento da pele, ao contrário dos animais tratados com a dexametasona (figura 31, p. 95).

Um modelo experimental de cicatrização cutânea em camundongos foi realizado para analisar a possível interferência da PHEX neste processo. A cicatrização de feridas ocorre de forma ordenada e a resposta inicial a uma lesão é uma reação inflamatória, na qual a ferida é invadida por leucócitos polimorfonucleares e linfócitos. Estas células são posteriormente substituídas por macrófagos circulantes, sendo sua presença essencial para a normal cicatrização de feridas. Dentro de 48 horas, ocorrem a reepitelização e angiogênese, que fazem parte da fase de proliferação, e inclui a formação de brotos capilares e proliferação de fibroblastos no local da ferida. A deposição de colágeno começa dentro de 4 ou 5 dias, e é responsável pela resistência da ferida inicial. Os glicocorticoides inibem o processo natural de reparação tecidual de vários modos. Em primeiro lugar, eles diminuem os monócitos circulantes, reduzindo assim o influxo de macrófagos. Com o

número reduzido de macrófagos pode haver a diminuição da fagocitose, bem como a produção de fatores de crescimento e citocinas. Além disso, glicocorticoides podem atrasar a reepitelização, diminuir a resposta dos fibroblastos, levar a uma lenta proliferação capilar, inibir a síntese de colágeno e a maturação de feridas, levando assim a um retardo na cicatrização e a diminuição da força de tração (POETKER e REH, 2010). O tratamento com ProPHEX, além de não ter inibido o processo cicatricial normal, promoveu uma contração mais rápida da ferida. A dexametasona, ao contrário, prejudicou substancialmente a reparação tecidual ao longo do experimento (figuras 37 e 38, pp. 99 e 100).

Os glicocorticoides, mesmo quando administrados por via tópica, podem ser absorvidos sistemicamente em quantidades suficientes, e causar efeitos adversos significativos, como a supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (NIEMAN, 2011). Além disso, afetam vários sistemas do corpo, incluindo o cardiovascular, músculo-esquelético, nervoso e imunológico. De fato, neste trabalho observou-se que, após a eutanásia dos animais submetidos ao modelo de atrofia cutânea, alguns efeitos adversos foram observados somente nos animais tratados com a dexametasona. Esses efeitos incluem a perda de massa muscular devido aos seus efeitos catabólicos no metabolismo de proteínas (figura 32, p. 96) e a supressão de tecidos linfóides, como o baço (figura 35, p. 98). A atrofia das glândulas adrenais foi também constatada (figura 34, p. 97) (MCKAY e CIDLOWSKI, 2003).

Em resumo, os resultados demonstraram a eficácia de PHEX como agente anti-inflamatório tópico, em processos inflamatórios agudos e crônicos, e pode servir como uma fonte para o desenvolvimento de um fitoterápico eficaz para distúrbios inflamatórios da pele. O mecanismo de ação de PHEX foi associado à inibição de diversos mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas, metabólitos do ácido araquidônico e histamina, o que sugere um efeito do tipo glicocorticoide, também reforçado pela presença do esteroide sitosterol. Importante ressaltar que o tratamento com PHEX foi igualmente potente quando comparado à dexametasona, entretanto não promoveu os graves efeitos adversos observados nos animais tratados com este glicocorticoide.

Apesar do efeito do tipo glicocorticoide, a PHEX apresenta outras substâncias que poderiam estar atuando sinergisticamente e contribuindo para a atividade encontrada para *L. pubescens*, sendo tal característica bastante relevante, tendo em

vista a atual busca pelas empresas farmacêuticas por medicamentos que atuam em doenças multifatoriais.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou, pela primeira vez, que uma fração rica em sitosterol apresenta significativa atividade citotóxica sobre linhagens tumorais resistentes de linfócitos T e confirma os dados encontrados na literatura, os quais demonstram o efeito protetor dessa substância contra vários tipos de cânceres.

Várias frações obtidas da PHEX foram ativas sobre protozoários do gênero *Leishmania*. A fração rica em fitol apresentou significativa atividade antipromastigota, antiamastigota e seletividade sobre *L. amazonensis*. Esta fração conduziu a uma despolarização do potencial mitocondrial associada com a produção de ROS, sugerindo que seu principal mecanismo de ação é a apoptose em promastigotas de *L. amazonensis*.

A PHEX apresenta potente atividade anti-inflamatória tópica, diminuindo alguns parâmetros que causam inflamação, como edema, migração celular e a produção de mediadores inflamatórios, como as citocinas pró-inflamatórias. A formulação contendo a PHEX também apresentou potente atividade anti-inflamatória em um processo crônico. Os resultados obtidos apontaram para um efeito do tipo glicocorticoide, sendo a principal vantagem do tratamento com a PHEX a inexistência dos efeitos adversos que são observados em pacientes que fazem uso prolongado de glicocorticoides em doenças de pele.

As frações semipurificadas contendo fitol ou sistosterol, apesar de não inéditas estruturalmente, abrem perspectiva de uso, pois são abundantes na natureza e novas atividades para estas substâncias foram identificadas neste trabalho. Além disso, os resultados obtidos com a PHEX de *L. pubescens* são promissores para o desenvolvimento de um fitoterápico de uso tópico, em doenças inflamatórias de pele, que cursam com hiperproliferação epitelial epidérmica, como as dermatites de contato crônicas e a psoríase vulgar. Cabe-se ressaltar que os estudos fitoquímicos e farmacológicos são inéditos, sobretudo para a família Lacistemataceae.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. 1995. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**, Illinois: Allured Publishing Corporation, 469 p.

AGRIPINO, D.G; LIMA, M.E; SILVA, M.R.; MEDA, C.I.; BOLZANI, V.S.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M.C.M.; MORENO, P.R. **Screening of Brazilian plants for antimicrobial and DNA damaging activities. i. atlantic rain forest - ecological station Juréia-Itatins**. Disponível em: <http://www.biotaneotropica.org.br>. Acesso em: 12 Out 2014.

AHN, S. K. BAK, H.N.; PARK, B.D.; KIM, Y.H.; YOUM, J.K.; CHOI, E.H.; HONG, S.P.; LEE, S.H. 2006. Effects of a multilamellar emulsion on glucocorticoid-induced epidermal atrophy and barrier impairment. **Journal of Dermatology**, **33 (2)**:80-90.

ALBERTS, B.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS,K.; WALTER,J.D. 2010. **Biologia Molecular da célula**. 5º ed. Porto Alegre: Artmed. 1386 p.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, **112(18)**: 2993-3002.

AMATO, V.S.; PADILHA, A.R.S.; NICODEMO, A.C.; DUARTE, M.I.S.; VALENTINI, M.; UIP, D.E.; BOULOS M.; AMATO V.N. 2000. Use of Itraconazole in the treatment of mucocutaneous Leishmaniasis: A pilot study. **International Journal of Infectious Diseases**, **4**:153-7.

AMIGÓ, M.; PAYÁ, M.; DE ROSA, S.; TERCENIO, M.C. 2007. Antipsoriatic effects of avarol-3'-thiosalicylate are mediated by inhibition of TNF-alpha generation and NF-kappaB activation in mouse skin. **British Journal of Pharmacology**, **152**: 353-365.

ASHFORD, R. W. 2000. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, **30**: 1269-1281.

AWAD, A. B.; FINK, C. S. 2000. Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action. **Journal of Nutrition**, **130(9)**: 2127-2130.

AWAD, A.B.; CHAN, K.C.; DOWNIE, A.C.; FINK, C.S. 2000. Peanuts as a source of beta-sitosterol, a sterol with anticancer properties. **Nutrition and Cancer**, **36**: 238–241.

AWAD, A. B.; CHINNAM, M.; FINK, C. S.;BRADFORD, P. G. 2007. Beta-sitosterol activates Fas signaling in human breast cancer cells. **Phytomedicine**, **14(11)**: 747-754.

BADILLA, B.; CAMBRONERO, J.; CICCIO, J.F. 2007. Determination of topical anti-inflammatory activity of the essential oil and extracts of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae), using the model of mouse ear edema induced by TPA and AA. **Pharmacognosy Magazine** **3**.

BARBOSA, W.L.R.; PINTO, L.N. 2003. Documentação e valorização da fitoterapia tradicional Kayapó nas aldeias A'Ukre e Pykanu - sudeste do Pará, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **13**: 47-49.

BLOCK, S.; BACCELLI, C.; TINANT, B.; VAN MEERVELT, L.; ROZENBERG, R.; JIWAN, J. L. H.; LLABRES, G.; DE PAUW-GILLET, M. C.;QUETIN-LECLERCQ, J. 2004. Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. **Phytochemistry**, **65(8)**: 1165-1171.

BOGLIOLO, L.; BRASILEIRO-FILHO, G. 2006. **BOGLIOLO: Patologia**. 7. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1472 p.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.;ROTHSTEIN, G. 1982. Measurement of cutaneous inflammation - estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, **78(3)**: 206-209.

BRAND, C.; TOWNLEY, S. L.; FINLAY-JONES, J. J.;HART, P. H. 2002. Tea tree oil reduces histamine-induced oedema in murine ears. **Inflammation Research**, **51(6)**: 283-289.

BRATTSAND, A. THALCN, K.; ROEMPK, L.; KALLSTROM, AND E. GMVSTAD, 1982. **J. Stwoid Biochem**, 16: 779.

BRASIL. Ministério da Saúde – **Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. Brasília, 2006. Disponível em http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf. Acesso em 03 mar. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 90 de 16.3.2004. Determina a publicação do “**Guia para a realização de estudos de toxicidade pré clínica de fitoterápicos**”. Diário Oficial da União, 18.3.2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral**. Brasília (DF), 2006. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral.pdf. Acesso em 03 mar. 2014.

BRASILEIRO FILHO, G. 2004. **Patologia geral**. 3.ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan. 379 p.

BRITTA, E.; SCARIOT, D.; FALZIROLLI, H.; NAKAMURA, T.U.; SILVA, C.; FILHO, B.; BORSALI, R.; NAKAMURA, C. 2014. Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S –limonene. **BMC Microbiology, (14)**: 236.

BUBENIK, J. & VONKA, V. 2003. MHC class I status of tumours and design of immunotherapeutic strategies. **Immunology Letters, 90(2-3)**: 177-178.

BUCKLE, D. R. & HEDGECOCK, C. J. R. 1997. Drug targets in inflammation and immunomodulation. **Drug Discovery Today, 2(8)**: 325-332.

BURBACH, G. J.; ANSEL, J.C.; ARMSTRONG, C.A. 2000. Cytokines in the skin. In: **The Biology of the Skin**. 1 ed. The New York:Parthenon Publishing Group, p. 299-3319.

CALDERON, A. I.; ANGERHOFER, C. K.; PEZZUTO, J. M.; FARNSWORTH, N. R.; FOSTER, R.; CONDIT, R.; GUPTA, M. P.; & SOEJARTO, D. D. 2000. Forest plot as a tool to demonstrate the pharmaceutical potential of plants in a tropical forest of Panama. **Economic Botany, 54(3)**: 278-294.

CAMARGO, L. B.; LANGONI, H. 2006. Impact of leishmaniasis on public health. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 12(4)**: 528-548.

CARLSON, R.; O'NEILL-DAVIS, L.; CHANG, J.; LEWIS, A.J. 1985. Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. **Agents Actions, 17**: 197–204.

CANDI, E., SCHMIDT, R., & MELINO, G. 2005. The cornified envelope: A model of cell death in the skin. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, **6(4)**: 328-340.

CLOUGH, G.F.; BENNETT, A.R.; CHURCH, M.K. 1998. Effects of H1 antagonists on the cutaneous vascular response to histamine and bradykinin: a study using scanning laser Doppler imaging. **British Journal of Dermatology**, **138**: 806–14.

CLOUGH G. 1999. Experimental models of skin inflammation. **Clinical & Experimental Allergy**, **29 (3)**: 105–8.

COSTA, J.P.; FERREIRA, P.B.; SOUSA, D.P.; JORDAN, J.; FREITAS, R.M. 2012. Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice. **Neuroscience Letters**; **523**: 115–118.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. 2013. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, **1830(6)**: 3670-3695.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. 2003. Leishmaniasis - current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, **19(11)**: 502-508.

CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. 2006. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, **123(3)**: 399-410.

CRUMMEY, A.; HARPER, G. P.; BOYLE, E. A.; MANGAN, F. R. 1987. Inhibition of arachidonic-acid induced ear edema as a model for assessing topical antiinflammatory compounds. **Agents and Actions**, **20(1-2)**: 69-76.

CUNNINGHAM, A. C. 2002a. Parasitic adaptive mechanisms in infection by Leishmania. **Experimental and Molecular Pathology**, **72(2)**: 132-141.

CUNNINGHAM, A. C. 2002b. Parasitic adaptive mechanisms in infection by Leishmania. **Experimental and Molecular Pathology**, **72(2)**: 132-141.

DE ALMEIDA, V.L.; LEITÃO A.; REINA, B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, MTP. 2005. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-específicos e ciclo-celular não-específicos que interagem com DNA: uma introdução. **Química Nova**. **28(1)**:118-129.

DE MUYLDER, G.; ANG, K. K. H.; CHEN, S.; ARKIN, M. R.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H. 2011. A Screen against *Leishmania* Intracellular Amastigotes: Comparison to a Promastigote Screen and Identification of a Host Cell-Specific Hit. **Plos Neglected Tropical Diseases**, **5(7)**: 9.

DELHASE, M. 2003. **I κ B kinase and NF- κ B signaling in response to pro-inflammatory cytokines**. In: WINYARD, P.G. e WILLOUGHBY, D.A. Inflammation protocols, New Jersey: Humana Press, p.7.

DEBENEDICTIS, C.; JOUBEH, S.; ZHANG, G. Y.; BARRIA, M.; GHOHESTANI, R. F. 2001. Immune functions of the skin. **Clinics in Dermatology**, **19(5)**: 573-585.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. 2002. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 ed. São Paulo: Editora UNESP, 592 p.

DOMINGUEZ, M.; MORENO, I.; AIZPURUA, C.;TORANO, A. 2003. Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. **Microbes and Infection**, **5(6)**: 507-513.

EL KOUNI, M. H. 2003. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. **Pharmacology & Therapeutics**, **99(3)**: 283-309.

EL-READI, M. Z.; HAMDAN, D.; FARRAG, N.; EL-SHAZLY, A.;WINK, M. 2010. Inhibition of P-glycoprotein activity by limonin and other secondary metabolites from Citrus species in human colon and leukaemia cell lines. **European Journal of Pharmacology**, **626(2-3)**: 139-145.

ESCOBAR, P.; MATU, S.; MARQUES, C.;CROFT, S. L. 2002. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH₃ (edelfosine) and amphotericin B. **Acta Tropica**, **81(2)**: 151-157.

FERRANDIZ, M.L.; GIL, B.; SANZ, M.J. 1996. Effect of bakuchiol on leucocyte functions and some inflammatory responses in mice. **Journal of Pharmacology** **48**, 975–980.

FIRESTEIN, G.S. 2004. **Mechanisms of inflammation and tissue repair**. In: GOLDMAN, L. e ANSIELLO, D. Textbook of Medicine, 22 ed., p. 227.

FIETZ, S.; BONDZIO, A.; MOSCHOS, A.; HERTSCH, B.; EINSPIANIER, R. 2008. Measurement of equine myeloperoxidase (MPO) activity in synovial fluid by a modified MPO assay and evaluation of joint diseases - An initial case study. **Research in Veterinary Science**, **84(3)**: 347-353.

FILHO, RB. 2010. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, **33 (1)**: 229-239.

FONSECA-SILVA, F.; INACIO, J. D. F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. 2011. Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Dysfunction Contribute to Quercetin Induced Death in *Leishmania amazonensis*. **PLoS One**, **6**.

FRANCK, X.; FOURNET, A.; PRINA, E.; MAHIEUX, R.; HOCQUEMILLER, R.; FIGADERE, B. 2004. Biological evaluation of substituted quinolines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, **14(14)**: 3635-3638.

FREINKEIL, R.K.; WOODLEY, D.T. 2000. Introduction. FREINKEIL, R.K.; WOODLEY, D.T. In: **The Biology of the Skin**. 1 ed. New York : The Parthenon Publishing Group, p.15-17.

FUCHS, E. & RAGHAVAN, S. 2002. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. **Nature Reviews Genetics**, **3(3)**: 199-209.

GABOR, M. & RAZGA, Z. 1992. Development and inhibition of mouse ear edema induced with capsaicin. **Agents and Actions**, **36(1-2)**: 83-86.

GABOR, M. 2000. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Budapeste: Akadémiai Kiadó.

GARTNER, L.P.; HIATT J.L.; STRUM J.M. 2011. **Cell Biology and Histology**. Philadelphia: Editora Lippincott Williams & Wilkins, 6 ed.

GINER, R. M.; VILLALBA, M. L.; RECIO, M. C.; MANEZ, S.; CERDA-NICOLAS, M.; & RIOS, J. L. 2000. Anti-inflammatory glycoterpenoids from *Scrophularia auriculata*. **European Journal of Pharmacology**, **389(2-3)**: 243-252.

GLOBBO-NETO, L.; LOPES, P. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, **30**: 374-381.

GNIADDECKI, R. 1998. Regulation of keratinocyte proliferation. **General Pharmacology**, **30(5)**: 619-622.

GOMEZ, M. A.; SAENZ, M. T.; GARCIA, M. D.; & FERNANDEZ, M. A. 1999. Study of the topical anti-inflammatory activity of *Achillea ageratum* on chronic and acute inflammation models. **Zeitschrift Fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences**, **54(11)**: 937-941.

GOODWIN, A. W. & WHEAT, H. E. 2004. Sensory signals in neural populations underlying tactile perception and manipulation. **Annual Review of Neuroscience**, **27**: 53-77.

GOLDSMITH, L.; KATZ, S.; GILCHREST, B.; PALLER, A.; LEFFELL, D.; WOLFF, K. 2012. **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**. 8 ed.

GRAMICCIA, M. & GRADONI, L. 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, **35(11-12)**: 1169-1180.

GREAVES, M. W. & WALL, P. D. 1996. Pathophysiology of itching. **Lancet**, **348(9032)**: 938-940.

GREEN, C. A. & SHUSTER, S. 1987. Lack of effect of topical indomethacin on psoriasis. **British Journal of Clinical Pharmacology**, **24(3)**: 381-384.

GRIMALDI, G. & TESH, R. B. 1993. Leishmaniasis of the new-world - current concepts and implications for future-research. **Clinical Microbiology Reviews**, **6(3)**: 230-250.

HAASS, N. K. & HERLYN, M. 2005. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, **10(2)**: 153-163.

HAAKE, A.; SCOTT, G.A.; HOLBROOK, K.A. 2000. **Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis**. FREINKEIL,R.K.; WOODLEY, D.T In: the Biology of the Skin. p.15-17, 1 ed. New York: The Parthenon Publishing Group.

HAC-WYDRO, K. 2013. The effect of beta-sitosterol on the properties of cholesterol/phosphatidylcholine/ganglioside monolayers-The impact of monolayer

fluidity. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, **110**: 113-119.

HEMALSWARYA, S. & DOBLE, M. 2006A. Potential synergism of natural products in the treatment of cancer. **Phytotherapy Research**, **20(4)**: 239-249.

HEMALSWARYA, S. & DOBLE, M. 2006B. Potential synergism of natural products in the treatment of cancer. **Phytotherapy Research**, **20(4)**: 239-249.

HENNINO,A.; VOCANSON, M.; CHAVAGNAC, C.; SAINT-MEZARD, P.; DUBOIS, B.; KAISERLIAN, D. NICOLAS, J. 2005. Fisiopatologia da dermatite de contato alérgica: papel das células T CD8 efetora e das células T CD4 regulatórias. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, **80(4)**: 335-347.

HILL PH, TANNOCK IF. 1992. **Introduction: Cancer as a Cellular Disease**. *In*: The Basic Science of Oncology. Tannock IF, Hill RP. 2nd ed. USA: McGraw-Hill;

HOFFMANN, P. 2005. Malpighiales: An Introduction. Disponível em: <http://www.kew.org/>. Acesso em: 06 Out 2014.

HOLZER, P. 1991. Capsaicin - cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacological Reviews**, **43(2)**: 143-201.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P. J., & LEE, C. C. 2007. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, **42(4)**: 377-387.

HSU, H. F.; HUANG, K. H.; LU, K. J.; CHIOU, S. J.; YEN, J. H.; CHANG, C. C., & HOUNG, J. Y. 2011a. Typhonium blumei extract inhibits proliferation of human lung adenocarcinoma A549 cells via induction of cell cycle arrest and apoptosis. **Journal of Ethnopharmacology**, **135(2)**: 492-500.

HSU, H. F.; HUANG, K. H.; LU, K. J.; CHIOU, S. J.; YEN, J. H.; CHANG, C. C., & HOUNG, J. Y. 2011b. Typhonium blumei extract inhibits proliferation of human lung adenocarcinoma A549 cells via induction of cell cycle arrest and apoptosis. **Journal of Ethnopharmacology**, **135(2)**: 492-500.

INACIO, J.D.; CANTO-CAVALHEIRO, M.M.; MENNA-BARRETO, R.F.; ALMEIDA-AMARAL E.E. 2012. Mitochondrial damage contribute to epigallocatechin-3-gallate induced death in *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, **132**:151-5.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa 2014: **Incidência de Câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 124p. : il. col., mapas.

INOUE, H.; NAGATA, N.; & KOSHIHARA, Y. 1993. Profile of capsaicin-induced mouse ear edema as neurogenic inflammatory model - comparison with arachidonic acid-induced ear edema. **British Journal of Pharmacology**, **110(4)**: 1614-1620.

INOUE, H.; NAGATA, N.; & KOSHIHARA, Y. 1995a. Involvement of substance-p as a mediator in capsaicin-induced mouse ear edema. **Inflammation Research**, **44(11)**: 470-474.

INOUE, H.; NAGATA, N.; & KOSHIHARA, Y. 1995b. Participation of serotonin in capsaicin-induced mouse ear edema. **Japanese Journal of Pharmacology**, **69(1)**: 61-68.

INOUE, Y.; HADA, T.; SHIRAISHI, A.; HIROSE, K.; HAMASHIMA, H. 2005 Biphasic effects of geranylgeraniol, teprenone, and phytol on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. **49**: 1770–1774.

JANEWAY, C.A.; WALPORT, P.T.M.; SHLOMCHIK, M. 2002. **Imunologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 5.ed. Porto Alegre:Artmed, p.767.

JUST, M. J.; RECIO, M. C.; GINER, R. M.; CUELLAR, M. J.; MANEZ, S.; BILIA, A. R.; & RIOS, J. L. 1998. Anti-inflammatory activity of unusual lupane saponins from *Bupleurum fruticosens*. **Planta Medica**, **64(5)**: 404-407.

KABASHIMA, K. & MIYACHI, Y. 2004. Prostanoids in the cutaneous immune response. **Journal of Dermatological Science**, **34(3)**: 177-184.

KARPINICH, N. O.; TAFANI, M.; SCHNEIDER, T.; RUSSO, M. A.; & FARBER, J. L. 2006. The course of etoposide-induced apoptosis in Jurkat cells lacking p53 and Bax. **Journal of Cellular Physiology**, **208(1)**: 55-63.

KATHURIA, M.; BHATTACHARJEE, A.; SASHIDHARA, K.V.; SINGH, S.P.; MITRA, K. 2014. Induction of mitochondrial dysfunction and oxidative stress in *Leishmania donovani* by orally active clerodane diterpene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **58(10)**: 5916-28

KEISER, M. J., SETOLA, V., IRWIN, J. J., LAGGNER, C., ABBAS, A. I., HUFSEIN, S. J., JENSEN, N. H., KUIJER, M. B., MATOS, R. C., TRAN, T. B., WHALEY, R., GLENNON, R. A., HERT, J., THOMAS, K. L. H., EDWARDS, D. D., SHOICHET, B. K., & ROTH, B. L. 2009. Predicting new molecular targets for known drugs. **Nature**, **462(7270)**: 175-U148.

KIERSZENBAUM, ABRAHAM L. 2008. O Editor **Histologia e Biologia Celular: uma Introdução à Patologia** / Abraham L. Kierszenbaum ; [revisão científica Marcelo Sampaio Narciso; tradução Adriana Paulino do Nascimento .. et al.]. - Rio de Janeiro: Elsevier.

KIM, H.; YOON, S. C.; LEE, T. Y.; & JEONG, D. 2009. Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. **Toxicology Letters**, **184(1)**: 13-17.

KO, W. G.; KANG, T. H.; LEE, S. J.; KIM, N. Y.; KIM, Y. C.; SOHN, D. H.; & LEE, B. H. 2000. Polymethoxyflavonoids from *Vitex rotundifolia* inhibit proliferation by inducing apoptosis in human myeloid leukemia cells. **Food and Chemical Toxicology**, **38(10)**: 861-865.

KO, E.C.; WANG, X.; FERRONE, S. 2003. Immunotherapy of malignant diseases. Challenges and strategies. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, **132**: 294-309.

KRUEGER, J. G. & BOWCOCK, A. 2005. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, **64**: 30-36.

^aKUPPER, T. S. 1990. Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues - mechanisms and speculations. **Journal of Clinical Investigation**, **86(6)**: 1783-1789.

^bKUPPER, T.S. 1990. The role of epidermal cytokines. In: SHEVACH, E. e OPPENHEIM, Immunophysiology: **The role of cells and cytokines in immunity and inflammation**. New York: Oxford University Press, p. 285-305.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ASTER., J. 2010. Robbins & Cotran - **Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters WJ, Killick- Kendrick (Eds). The leishmaniasis in Biology and Medicine. **Academic Press**, 1-120.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; & GILROY, D. W. 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, **2(10)**: 787-795.

LEE, K.L.; LEE, S.H.; PARK, K.Y. 1999. Anticancer activity of phytol and eicosatrienoic acid identified from *Perilla* leaves. **Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition**, **28**: 1107–1112.

LEE, D. Y.; CHOO, B. K.; YOON, T.; CHEON, M. S.; LEE, H. W.; LEE, A. Y.; & KIM, H. K. 2009. Anti-inflammatory effects of *Asparagus cochinchinensis* extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, **121(1)**: 28-34.

LEE, J. L.; MUKHTAR, H.; BICKERS, D. R.; KOPELOVICH, L., & ATHAR, M. 2003. Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications. **Toxicology and Applied Pharmacology**, **192(3)**: 294-306.

LEUNG, D. Y. M.; BOGUNIEWICZ, M.; HOWELL, M. D.; NOMURA, I., & HAMID, O. A. 2004. New insights into atopic dermatitis. **Journal of Clinical Investigation**, **113(5)**: 651-657.

LI, S. S.; GAO, Z. J.; FENG, X. Z.; JONES, S. H., & HECHT, S. M. 2004. Plant sterols as selective DNA polymerase beta lyase inhibitors and potentiators of bleomycin cytotoxicity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **12(15)**: 4253-4258.

LIM, H.; PARK, H., & KIM, H. P. 2004. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin. **Archives of Pharmacal Research**, **27(4)**: 442-448.

LOPES, M.V.; DESOTI, V.C.; CALEARE, A.O.; NAKAMURA, T.U.; SILVA, S.O. NAKAMURA, C.V. 2012. Mitochondria superoxide anion production contributes to geranylgeraniol - induced death in *Leishmania amazonensis*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: (2012)**: 1- 9.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALVES, W. A.; DE SOUSA-GOMES, M. L.; DE SENA, J. M., & LUNA, E. A. 2008. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos De Saude Publica**, **24(12)**: 2941-2947.

MACEDO-SILVA, S.T.; URBINA, J.A.; DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J.C.F. 2013. In Vitro Activity of the Antifungal Azoles Itraconazole and Posaconazole against *Leishmania amazonensis*. **PLOS ONE**, **8(12)**: e83247.

MAKRANTONAKI, E. & ZOUBOULIS, C. C. 2007. The skin as a mirror of the aging process in the human organism - State of the art and results of the aging research in the German National Genome Research Network 2 (NGFN-2). **Experimental Gerontology**, **42(9)**: 879-886.

MALEK, S. N. A.; SHIN, S. K.; WAHAB, N. A., & YAACOB, H. 2009. Cytotoxic Components of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) Leaves. **Molecules**, **14(5)**: 1713-1724.

MAN, M. Q.; SHI, Y. J.; MAN, M.; LEE, S. H.; DEMERJIAN, M.; CHANG, S.; FEINGOLD, K. R., & ELIAS, P. M. 2008. Chinese herbal medicine (Tuhuai extract) exhibits topical anti-proliferative and anti-inflammatory activity in murine disease models. **Experimental Dermatology**, **17(8)**: 681-687.

MARSHALL, J. S. & BIENENSTOCK, J. 1994. The role of mast-cells in inflammatory reactions of the airways, skin and intestine. **Current Opinion in Immunology**, **6(6)**: 853-859.

MATOS, M. F. C.; LEITE, L.; BRUSTOLIM, D.; DE SIQUEIRA, J. M.; CAROLLO, C. A.; HELLMANN, A. R.; PEREIRA, N. F. G., & DA SILVA, D. B. 2006. Antineoplastic activity of selected constituents of *Duguetia glabriuscula*. **Fitoterapia**, **77(3)**: 227-229.

MCGINTY, D.; LETIZIA; C.S.; API, A.M. 2010. Fragrance material review on phytol. **Food and Chemical Toxicology**, **48 (3)**: S59–S63.

MCKAY, L.; CIDLOWSKI, J. 2003. *Physiologic and pharmacologic effects of corticosteroids*. **Holland-Frei Cancer Medicine**. 6th edition.

MELBY, P. C. 2002. Recent developments in leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, **15(5)**: 485-490.

MENNA-BARRETO, R.F.S.; DE CASTRO, S.L. 2014. The Double-Edged Sword in Pathogenic Trypanosomatids: The Pivotal Role of Mitochondria in Oxidative Stress and Bioenergetics. **BioMed Research International (14014)**:1-14.

MIZE, C.E.; AVIGAN, J.; BAXTER, J.H.; FALES, H.M.; STEINBERG, D. 1966 Metabolism of phytol-U-14C and phytanic acid-U-14C in the rat. **The Journal of Lipid Research**, **7**: 692–697.

MMA – MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Conselho de Gestão do Patrimônio Genético**. Brasília, 2010. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=150&idconteudo=8277>. Acesso em: 5 mar. 2014.

MONTEIRO, P.S.; LACERDA, M.M.; ARIAS, J.R. 1994. Controle da Leishmaniose no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **27**: 67-72.

MONZOTE, L.; GARCIA, M.; PASTOR, J.; GIL, L.; SCULL, R.; MAES, L.; COS, P.; GILLE, L. 2014. Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and main components: Activity against Leishmania, their mitochondria and other microorganisms. **Experimental Parasitology**, **136**: 20–26.

MOON, D.; KIM, M.; CHOI, Y.; KIM, G. 2008. Beta-Sitosterol induces G2/M arrest, endoreduplication, and apoptosis through the Bcl-2 and PI3K/Akt signaling pathways. **Cancer Letters**, **264**:181–191.

MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cyto-toxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, **65(1-2)**: 55-63.

MORAES, J.; OLIVEIRA, R.N.; COSTA, J.P.; JUNIOR, A.L. G.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M.; ALLEGRETTI, S. M.; PINTO, P.L. S. 2014. Phytol, a Diterpene Alcohol from Chlorophyll, as a Drug against Neglected Tropical Disease Schistosomiasis Mansonii. **PLoS Neglected Tropical Diseases**; **8(1)**:1.

MOTTA, A.; AUN, M.; KALIL, J.; GIAVINA-BIANCHI, P. 2011. Dermatite de contato. **Revista brasileira de alergologia e imunopatologia**, **34(3)**: 73-82:

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y., & FUKUDA, Y. 2006. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)-alpha in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochemical Pharmacology**, **71(9)**: 1331-1336.

MURRAY, A. R.; KISIN, E.; CASTRANOVA, V.; KOMMINENI, C.; GUNTHER, M. R.; & SHVEDOVA, A. A. 2007. Phenol-induced in vivo oxidative stress in skin: Evidence for enhanced free radical generation, thiol oxidation, and antioxidant depletion. **Chemical Research in Toxicology**, **20(12)**: 1769-1777.

NAHATA, A.; SAXENA, A.; SURI, N.; SAXENA, A. K.; & DIXIT, V. K. 2013. Sphaeranthus indicus Induces Apoptosis Through Mitochondrial-Dependent Pathway

in HL-60 Cells and Exerts Cytotoxic Potential on Several Human Cancer Cell Lines. **Integrative Cancer Therapies, 12(3): 236-247.**

NAKAMURA, C.V.; SANTOS, A.O.; VENDRAMETTO, M.C.; LUIZE, O.S.; DIAS FILHO B.P.; CORTEZ, D.A.G., UEDA-NAKAMURA, T. 2006. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia, 16:** 61-66.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M., & SNADER, K. M. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products, 66(7): 1022-1037.**

NICHOLSON, P. J.; LLEWELLYN, D.; ENGLISH, J. S., & GUIDELINES DEV, G. 2010. Evidence-based guidelines for the prevention, identification and management of occupational contact dermatitis and urticaria. **Contact Dermatitis, 63(4): 177-186.**

NICKOLOFF, B. J. & NESTLE, F. O. 2004. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. **Journal of Clinical Investigation, 113(12): 1664-1675.**

NIEMAN, L.K. 2013. Consequences of systemic absorption of topical glucocorticoids. **Journal of the American Academy of Dermatology, 65(1): 250–252.**

NISBET, L. J. & MOORE, M. 1997. Will natural products remain an important source of drug research for the future? **Current Opinion in Biotechnology, 8(6): 708-712.**

NITZ, A.C.; ELY, J.B.; D'ACAMPORA, A.J.; TAMES, D.R.; CORRÊA, B.P. 2006. Estudo morfométrico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, usando: *Coronopa didymus* e *Calendula officinalis*. **Arquivos Catarinenses de Medicina, 35(4): 75-79.**

NORRIS, D.A. 2004. **Structure and function of the skin.** GOLDMAN, L. e ANSIELLO, D. Textbook of Medicine, 22 ed., p. 2444-2446.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2002a. **Acute dermal irritation/corrosion** (Test No. 404, Adopted on April 24, 2002), OECD guidelines for testing of chemicals.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines** - Report of a WHO global survey. Genebra 2005. 156p.

OTUKI, M. F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHAIROS, K.; YUNES, R. A., & CALIXTO, J. B. 2005. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, **507(1-3)**: 253-259.

PADILLA, M.A. **Atividade antiviral de extratos de plantas do Cerrado contra herpesvírus**. Campinas, 2011. Tese de doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

PAQUET, P. & PIERARD, G. E. 1996. Interleukin-6 and the skin. **International Archives of Allergy and Immunology**, **109(4)**: 308-317.

PARK, C.; MOON, D. O.; RHU, C. H.; CHOI, B. T.; LEE, W. H.; KIM, G. Y.; & CHOI, Y. H. 2007. Beta-Sitosterol induces anti-proliferation and apoptosis in human leukemic U937 cells through activation of caspase-3 and induction of Bax/Bcl-2 ratio. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, **30(7)**: 1317-1323.

PASCUAL, G. & GLASS, C. K. 2006. Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, **17(8)**: 321-327.

PEDROSO, L. S.; FAVERO, G. M.; DE CAMARGO, L. E. A.; MAINARDES, R. M., & KHALIL, N. M. 2013. Effect of the o-methyl catechols apocynin, curcumin and vanillin on the cytotoxicity activity of tamoxifen. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, **28(4)**: 734-740.

POETKER, D.M. & REH, D.D. 2010. A comprehensive review of the adverse effects of systemic corticosteroids. **Otolaryngologic Clinics of North America**. **43(4)**: 753-68.

PORTUGAL, M.; BARAK, V.; GINSBURG, I., & KOHEN, R. 2007. Interplay among oxidants, antioxidants, and cytokines in skin disorders: Present status and future considerations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, **61(7)**: 412-422.

PRATA, M.B.; HADDAD, C.H.; GOLDENBERG, S.; SIMÕES, M.J.; MOURA, L.A.R.; TRABULSI, L.R. 1998. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em rato. **Acta Cirúrgica Brasileira**, **2(3)**: 43-8.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M., & JENSEN, J. M. 2008. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, **17(12)**: 1063-1072.

PONGPRAYOON, U.; BAECKSTREOM, P.; JACOBSSON U.; LINDSTREOM M.; BOHLIN L. 1992. Antispasmodic activity of beta-damascenone and e-phytol isolated from *Ipomoea pes-caprae*. **Planta Medica**. **58**: 19–21.

RANG, H. P.; DALE, M.M; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. 2007. **Farmacologia**. Rio de Janeiro:Elsevier, 6 ed.

RAYCHAUDHURY, B.; BANERJEE, S.; GUPTA, S.; SINGH, R. V., & DATTA, S. C. 2005. Antiparasitic activity of a triphenyl tin complex against *Leishmania donovani*. **Acta Tropica**, **95(1)**: 1-8.

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESUS, M.N.; MARZAL P.C., ANDRADE JÚNIOR H.F.; TEMPONE, A.G. 2003. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quimica Nova**, **26**: 550-553.

RECIO, M. C.; GINER, R. M.; URIBURU, L.; MANEZ, S.; CERDA, M.; DE LA FUENTE, J. R., & RIOS, J. L. 2000. In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. **Life Sciences**, **66(26)**: 2509-2518.

RAJAB, M.S.; CANTRELL, C.L.; FRANZBLAU, S.G.; FISCHER, N.H. 1998. Antimycobacterial activity of (E)-phytol and derivatives: a preliminary structure-activity study. **Planta Medica**. **64**: 2–4

REINER, S. L.; ZHENG, S. C.; WANG, Z. E.; STOWRING, L.; & LOCKSLEY, R. M. 1994. *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4(+) t-cells during initiation of infection. **Journal of Experimental Medicine**, **179(2)**: 447-456.

RIBEIRO, G.A., CUNHA-JUNIOR, E.F., PINHEIRO, R.O., DA SILVA, S.A., CANTO-CAVALHEIRO, M.M., DA SILVA, A.J., COSTA, P.R., NETTO, C.D., MELO, R.N. 2013. LQB-118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative stress and apoptosis in *Leishmania amazonensis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **68**:789–799.

ROGERS, K. A., DEKREY, G. K., MBOW, M. L., GILLESPIE, R. D., BRODSKYN, C. I., & TITUS, R. G. 2002. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **Fems Microbiology Letters**, **209**(1): 1-7.

ROSS, M.H.; PAWLINA, M.D. 2011. **Histology: A Text and Atlas**. 6 ed. Rio de Janeiro: Ed. LWW, p. 974.

ROUMY, V.; GARCIA-PIZANGO, G.; GUTIERREZ-CHOQUEVILCA, A. L.; RUIZ, L., JULLIAN, V.; WINTERTON, P.; FABRE, N.; MOULIS, C., & VALENTIN, A. 2007. Amazonian plants from Peru used by Quechua and Mestizo to treat malaria with evaluation of their activity. **Journal of Ethnopharmacology**, **112**(3): 482-489.

RYAN, T. 2004. The ageing of the blood supply and the lymphatic drainage of the skin. **Micron**, **35**(3): 161-171.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, **2**: 845-858.

SANTANA, A.; MEDINA, C.; PAZ-CABRERA, M.C.; DIAZ-GONZALEZ, F.; FARRE, E.; SALAS, A.; RADOMSKI, M.W.; QUINTERO E. 2006. Attenuation of dextran sodium sulphate induced colitis in matrix metalloproteinase-9 deficient mice. **World J Gastroenterol**, **12**: 6464-72.

SANTOS, C.C.; SALVADORI, M.S.; MOTA, V.G.; COSTA, L.M.; ALMEIDA, A.A. 2013 Antinociceptive and antioxidant activities of phytol in vivo and in vitro models. **The Journal of Neuroscience**, **2013**:1-9.

SANTOS, J.R.; WADA, M.L.F. 2005. **Diferenciação celular**. In: A célula. São Paulo: Editora Manole Ltda

SARKER, S.; LATIF, Z.; GRAY, A. 2006. **Natural Products Isolation**. 2nd ed.

SARTOR, C. F. P.; AMARAL, V. DO; GUIMARÃES, H. E. T.; BARROS, K. N.; FELIPE, D. F.; CORTEZ, L. E. R.; VELTRINI, V. C. 2010. Estudo da ação cicatrizante de folhas de *Pereskia aculeata*. **Revista Saúde e Pesquisa**, **3**(2): 149-154.

SCHIANTARELL, P.; CADEL, S.; ACERBI, D.; PAVESI, L. 1982. Antiinflammatory activity and Bioavailability of percutaneous piroxican. **Arzneim.- Forsch./Drug Research**, **32**:230-235.

SEELIGER, S., DERIAN, C. K., VERGNOLLE, N., BUNNETT, N. W., NAWROTH, R., SCHMELZ, M., VON DER WEID, P. Y., BUDDENKOTTE, J., SUNDERKOTTER, C., METZE, D., ANDRADE-GORDON, P., HARMS, E., VESTWEBER, D., LUGER, T. A., & STEINHOFF, M. 2003. Proinflammatory role of proteinase-activated receptor-2 in humans and mice during cutaneous inflammation in vivo. **Faseb Journal**, **17(13)**: 1871-1885.

SERENO, D.; DA SILVA, A. C.; MATHIEU-DAUDE, F.; & OUAISSI, A. 2007. Advances and perspectives in Leishmania cell based drug-screening procedures. **Parasitology International**, **56(1)**: 3-7.

SHERWOOD, E.R E TOLIVER-KINSKY, T. 2004. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anesthesiology**, **18**: 385-405.

SILVA, R.; SOUSA, F.; DAMASCENO, S.; CARVALHO, N.; SILVA, V.; ET AL. 2013. Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, 1-10.

SIMMONS, D. L. 2006. What makes a good anti-inflammatory drug target? **Drug Discovery Today**, **11(5-6)**: 210-219.

SIMONI, I.C.; MANHA, A.P.S.; SCIESSERE, L.; HOE, V.M.H.; TAKINAMI, V.H.; FERNANDES, M.J.B. 2007. Evaluation of the antiviral activity of Brazilian cerrado plants against animal viruses. **Vírus Reviews & Research**, **12**:1-17.

SILVA, C.S. E CARVALHO, J.C.T. 2004. INFLAMAÇÃO. In: **Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. São Paulo:Tecmed.

SILVA, C.T.; REIS,G.G.; REIS, M.G.F.; ELIAS SILVA, E.; CHAVES, R.A. 2004. Avaliação temporal da florística arbórea de uma floresta secundária no município de viçosa, Minas Gerais. **Revista Árvore**, **28**: 429-441.

SILVA, N.R.S. 2002. **Florística e estrutura horizontal de uma floresta estacional semidecidual montana – Mata do Juquinha de Paula, Viçosa, MG**. Dissertação de Mestrado-Universidade Federal de Viçosa.

SILVA, J.M. 2011. **Lacistema pubescens Mart.: perfil fitoquímico e atividades biológicas**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Juiz de Fora.

^A SILVA, J.M.; MOTTA, E.V.S.; MENDES, R.; SCIO, E. 2012. Caracterização fitoquímica e avaliação da capacidade antioxidante de diferentes partições de *Lacistema pubescens* Mart. **HU Revista**, **37**: 342-7.

^BSILVA, J.M.; MOTTA, E.V.S.; MENDES, R.; BELLOZI, P.M.Q., LIMA, I.V, RIBEIRO A.; SCIO, E. 2012. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the hexane extract of *Lacistema pubescens* mart. leaves. **Pharmacologyonline**, **1**:9-15.

SILVA, R.; SOUSA, F.; DAMASCENO, S.; CARVALHO, N.; SILVA, V.; ET AL. 2013. Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, 1-10

SINDERMANN, H.; CROFT, S. L.; ENGEL, K. R.; BOMMER, W.; EIBL, H. J.; UNGER, C., & ENGEL, J. 2004. Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, **193(4)**: 173-180.

SINGH, N.; KUMAR, M.; & SINGH, R. K. 2012. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, **5(6)**: 485-497.

SOARES, M. A. Medicamentos não Prescritos. Lisboa: Publicações Farmácia Portuguesa. 1995.

SOBRINHO, F.A.P. 2007. **Conhecimento etnobotânico de mateiros residentes no entorno de Unidades de Conservação no estado do Rio de Janeiro**. Dissertação de Mestrado - Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

SONG, H.Y.; LEE, J.A.; JU, S.M.; YOO, K.Y.; WON, M.H.; KWON, H.J.; EUM, W.S.; JANG, S.H.; CHOI, S.Y.; PARK, J. 2008. Topical transduction of superoxide dismutase mediated by HIV-1 Tat protein transduction domain ameliorates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced inflammation in mice. **Biochemical Pharmacology**, **75**:1348-1357.

SONY, H. Y., LEE, J. A., JU, S. M., YOO, K. Y., WON, M. H., KWON, H. J., EUM, W. S., JANG, S. H., CHOI, S. Y., & PARK, J. 2008. Topical transduction of superoxide dismutase mediated by HIV-1 Tat protein transduction domain ameliorates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced inflammation in mice. **Biochemical Pharmacology**, **75(6)**: 1348-1357.

SPELLBERG, B. 2000. The cutaneous citadel - A holistic view of skin and immunity.

Life Sciences, 67(5): 477-502.

STANLEY, P. L.; STEINER, S.; HAVENS, M., & TRAMPOSCH, K. M. 1991. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin Pharmacology, 4(4): 262-271.**

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M. 1990. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann K, (ed.). **Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity.** London: Academic Press, p. 71-133.

SUNDARRAJ, S.; THANGAM, R.; SREEVANI, V.; KAVERI, K.; GUNASEKARAN, P.; ACHIRAMAN, S., & KANNAN, S. 2012. Gamma-Sitosterol from *Acacia nilotica* L. induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis through c-Myc suppression in MCF-7 and A549 cells. **Journal of Ethnopharmacology, 141(3): 803-809.**

TEMPONE, A. G.; DE OLIVEIRA, C. M., & BERLINCK, R. G. S. 2011. Current Approaches to Discover Marine Antileishmanial Natural Products. **Planta Medica, 77(6): 572-585.**

TIUMAN, T. S.; SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS, B. P., & NAKAMURA, C. V. 2011A. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases, 15(8): E525-E532.**

TORRES-SANTOS, E. C.; LOPES, D., OLIVEIRA, R. R.; CARAUTA, J. P. P.; FALCAO, C. A. B., KAPLAN, A. A. C., & ROSSI-BERGMANN, B. 2004A. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. **Phytomedicine, 11(2-3): 114-120.**

TRINDADE, E.F.S. 2007. **Atributos físico-hídricos e matéria orgânica do solo em função de sistemas de uso e manejo da vegetação secundária.** Dissertação de Mestrado – Universidade Federal Rural da Amazônia.

TUBARO, A., DRI, P., DELBELLO, G., ZILLI, C., DELLA-LOGGIA, R. 1985. The croton oil test revisited. **Agents Actions, 17: 347–349.**

UCHI, H.; TERAU, H.; KOGA, T., & FURUE, M. 2000. Cytokines and chemokines in the epidermis. **Journal of Dermatological Science, 24: S29-S38.**

URICH-MERZENICH, G.; ZEITLER, H.; JOBST, D.; PANEK, D.; VETTER, H., & WAGNER, H. 2007. Application of the "-omic-" technologies in phytomedicine. **Phytomedicine, 14(1): 70-82.**

VANDEVYVER, S.; DEJAGER, L.; TUCKERMANN, J.; LIBERT, C. 2013. New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. **Endocrinology**, **154(3)**: 993-1007.

VANE, J.R.; BOTTING, R.M. 1998. Mechanism of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **American Journal of Medicine**, **104**: 2S–8S.

VERMEERSCH, M., DA LUZ, R. I., TOTE, K., TIMMERMANS, J. P., COS, P., & MAES, L. 2009A. In Vitro Susceptibilities of Leishmania donovani Promastigote and Amastigote Stages to Antileishmanial Reference Drugs: Practical Relevance of Stage-Specific Differences. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **53(9)**: 3855-3859.

VERPOORTE, R., CHOI, Y. H., & KIM, H. K. 2005. Ethnopharmacology and systems biology: A perfect holistic match. **Journal of Ethnopharmacology**, **100(1-2)**: 53-56.

VETTER, W.; SCHRODER, M.; LEHNERT, K. 2012. Differentiation of refined and virgin edible oils by means of the trans- and cis-phytol isomer distribution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. **60**: 6103–6107.

VOULDOUKIS, I.; ROUGIER, S.; DUGAS, B.; PINO, P.; MAZIER, D., & WOEHRLE, F. 2006. Canine visceral leishmaniasis: Comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. **Veterinary Parasitology**, **135(2)**: 137-146.

WALL, M. E.; WANI, M. C.; HUGHES, T. J., & TAYLOR, H. 1988. Plant antimutagenic agents .1. general bioassay and isolation procedures. **Journal of Natural Products**, **51(5)**: 866-873.

WANG, B. H., FUJISAWA, H., ZHUANG, L. H., FREED, I., HOWELL, B. G., SHAHID, S., SHIVJI, G. M., MAK, T. W., & SAUDER, D. N. 2000. CD4(+) Th1 and CD8(+) type 1 cytotoxic T cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity. **Journal of Immunology**, **165(12)**: 6783-6790.

WANG, M., LAMERS, R., KORTHOUT, H., VAN NESSELROOIJ, J. H. J., WITKAMP, R. F., VAN DER HEIJDEN, R., VOSHOL, P. J., HAVEKES, L. M., VERPOORTE, R., & VAN DER GREEF, J. 2005. Metabolomics in the context of systems biology: Bridging traditional Chinese medicine and molecular pharmacology. **Phytotherapy Research**, **19(3)**: 173-182.

WILLIAMS, H. C. ATOPIC DERMATITIS. 2005. **The New England Journal of Medicine**, **352(22)**:2314-2324.

WILLOUGHBY, D. A.; MOORE, A. R.; COLVILLE-NASH, P. R., & GILROY, D. 2000. Resolution of inflammation. **International Journal of Immunopharmacology**, **22(12)**: 1131-1135.

WILMER, J. L.; BURLESON, F. G.; KAYAMA, F.; KANNO, J., & LUSTER, M. I. 1994. Cytokine induction in human epidermal-keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin. **Journal of Investigative Dermatology**, **102(6)**: 915-922.

WINYARD, P.G.2003. **Key stages in the acute inflammatory response and their relevance as therapeutic targets**. In: WINYARD, P.G. e WILLOUGHBY, D.A. Inflammation protocols, New Jersey: Humana Press, p.3-4.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> >. Acesso em 05 mar. 2014.

YOUNG, F.E. 2008. **Lacistemataceae Holistic Database**. Disponível em: www.lacistemataceae.org. Acesso em 02 Mar 2014.

YOUNG, J. M.; SPIRES, D. A.; BEDORD, C. J.; WAGNER, B.; BALLARON, S. J., & DEYOUNG, L. M. 1984. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic-acid. **Journal of Investigative Dermatology**, **82(4)**: 367-371.

ZHANG, T.; MAEKAWA, Y.; SAKAI, T.; NAKANO, Y.; ISHII, K.; HISAEDA, H.; DAINICHI, T.; ASAO, T.; KATUNUMA, N., & HIMENO, K. 2001. Treatment with cathepsin L inhibitor potentiates T(h)2-type immune response in *Leishmania major*-infected BALB/c mice. **International Immunology**, **13(8)**: 975-982.

ANEXOS

| | |
|----------------------------|-----|
| ANEXO A - PUBLICAÇÕES..... | 141 |
|----------------------------|-----|

PUBLICAÇÕES

Artigo 1 publicado

Silva J, Antinarelli L, Pinto N *et al.* 2014. HPLC-DAD analysis, antileishmanial, antiproliferative, and antibacterial activities of *Lacistema pubescens*: an Amazonian medicinal plant. *Biomed Research International* **2014**: 0-7.

Artigo 2 submetido

Silva J, Conegundes J, Freitas R *et al.* 2015. Topical application of a non-polar fraction of *Lacistema pubescens* reduces skin inflammation and cytokine production in animal model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.

Artigo 3 em fase de submissão

Silva J, Antinarelli L, *et al.* 2015 Antileishmanial activity of Phytol isolated from *Lacistema pubescens* is mediated to mitochondrial dysfunction in *L. amazonensis*.