



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CAMILA JOYCE ALVES DA SILVA

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTI-INFLAMATÓRIA E CICATRIZANTE *IN VITRO* PROMOVIDA PELOS FLOROGLUCINÓIS ISOLADOS DE *Harpalyce brasiliana* Benth.

Recife

2018

CAMILA JOYCE ALVES DA SILVA

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTI-INFLAMATÓRIA E CICATRIZANTE *IN VITRO* PROMOVIDA PELOS FLOROGLUCINÓIS ISOLADOS DE *Harpalyce brasiliana* Benth.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Microbiologia, Bioprocessos e Bioprodutos.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes

Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Cristiane Moutinho Lagos de Melo

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Silva, Camila Joyce Alves da
Avaliação da resposta anti-inflamatória e cicatrizante *in vitro*
promovida pelos floroglucínóis isolados de *Harpalyce brasiliiana* Benth
/ Camila Joyce Alves da Silva - 2018.
83 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Rafael Matos Ximenes
Coorientadora: Cristiane Moutinho Lagos de Melo
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia. Recife, 2018.

Inclui referências

1. Floroglucínóis 2. Harpalyce 3. Atividade imunológica
I. Ximenes, Rafael Matos (orient.) II. Melo, Cristiane Moutinho Lagos
de (coorient.) III. Título

615.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-088

CAMILA JOYCE ALVES DA SILVA

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTI-INFLAMATÓRIA E CICATRIZANTE *IN VITRO* PROMOVIDA PELOS FLOROGLUCINÓIS ISOLADOS DE *Harpalyce brasiliiana* Benth.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: 30/07/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dra. Jaciana dos Santos Aguiar (Avaliador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dra. Simone do Nascimento Fraga (Avaliador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

A Deus por me presentear com tudo que me torna mais forte e corajosa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pois se não fosse pelo Seu intermédio não teria passado na seleção do programa.

Agradeço a minha família, meu pai Severino, minha irmã Carolina e especialmente minha mãe Valdelice, que sempre cuidou de mim, principalmente nos períodos mais difíceis. A minha vó Maria, que é o meu significado de amor e trouxe a nossa família o uso das plantas medicinais. Eles muitas vezes sem entender, me permitiram estudar e ir sempre à frente.

Ao meu orientador prof. Dr. Rafael Ximenes (Ori), obrigada por ter me aceitado como orientanda, por todo o conhecimento ensinado, pela paciência com minha alegria e por sempre acreditar que os resultados seriam bons.

Aos meus amigos da EAPC, obrigada por sempre estarem ao meu lado, torcer pelo sucesso e me fazerem uma pessoa ainda mais feliz. A Marcelly (Guete), Juliana (Jubs) e Thuane (Thutinha) obrigada por serem as melhores amigas da vida, por cuidarem de mim, me abrigarem e cozinharem o cuscuz, amo vocês além do que posso expressar.

Agradeço a todos os professores colaboradores pela parceria, especialmente as professoras Cristiane, Teresinha e Jaciana pelo suporte na realização da pesquisa.

Aos LEAnos: Érima, Simone, Raudiney, João, Camila, Suellen pelo companheirismo nas lutas diárias de ser pesquisador. A Caio por todo conhecimento passado sobre a cultura de células, esse trabalho não seria possível sem sua paciência e ensinamentos. A Maria de Fátima (Fatinha) e Wellington (Elinho) pela convivência diária, pelos momentos compartilhados e amizade construída, onde se fizeram amigos.

Aos meus amigos do PPGBiotec: Beatriz, Ricardo, Alessandra e Úrsula pela conquista do padrão A, pelo incentivo e apoio sempre. E a Karol, pela amizade construída e pela parceria para que tudo desse certo.

A CAPES pelo auxílio e apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

“O essencial é invisível aos olhos”

O pequeno príncipe, Antoine de Saint-Exupéry, 1943, 32 p.

RESUMO

Harpalyce brasiliiana Benth (Fabaceae) é um arbusto encontrado principalmente nos Estados do Ceará, Piauí e Maranhão. Em virtude do uso etnobotânico da tintura de suas raízes (solução hidroalcoólica) como antiofídico oral pela população local, a espécie é designada popularmente como "raiz-de-cobra". Esta planta é usada na medicina popular, desde o início do século XX, no tratamento desses acidentes ofídicos. A prospecção fitoquímica de *H. brasiliiana* possibilitou o isolamento de novos pterocarpanos a partir das raízes e do lenho, enquanto do estudo químico das folhas foram obtidos floroglucínóis inéditos. O objetivo desse estudo foi investigar a resposta anti-inflamatória e cicatrizante *in vitro* promovida por floroglucínóis isolados de folhas *Harpalyce brasiliiana*. A avaliação da citotoxicidade foi realizada através do ensaio de MTT e significativamente nenhum dos 6 floroglucínóis isolados (HBF-5, -6, -7, -8, -9, -10) reduziram a viabilidade das linhagens de macrófagos e fibroblastos murinos nas concentrações de 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25 e 50 μ M. Com o ensaio de migração, em fibroblastos 3T3, no período de 24h os floroglucínóis todas as feridas estavam fechadas. Na dosagem de óxido nítrico (NO) com a linhagem de RAW 264.7 as HBF- 6, 7 e 9 reduziram a liberação de NO quando comparadas ao controle estimulado com LPS. O estudo biológico da resposta anti-inflamatória e cicatrizante *in vitro* promovido pelos floroglucínóis monoméricos prenilados/geranilados isolados de *H. brasiliiana*, avaliou seu efeito imunológico na condição de inflamação estimulada por LPS para dosagem de citocinas analisadas em citometria de fluxo por CBA, sendo capaz de reduzir secreção das principais citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α , INF- γ e IL-17 caracterizando um perfil anti-inflamatório, bem como a IL-10. Em conclusão, os floroglucínóis isolados do extrato etanólico das folhas de *H. brasiliiana* não apresentou atividade citotóxica e cicatrizante. Com atividade frente a redução de NO e anti-inflamatória, os resultados que indicam as atividades biológicas dessas substâncias, nunca antes estudadas.

Palavras-chave: Atividade imunológica. Floroglucínóis. *Harpalyce*.

ABSTRACT

Harpalyce brasiliiana Benth (Fabaceae) is a shrub found mainly in the states of Ceará, Piauí and Maranhão. Due to the ethnobotanical use of the dye of its roots (hydroalcoholic solution) as anti-phidic by the local population, the species is popularly called "snake root". This plant has been used in folk medicine since the beginning of the 20th century in the treatment of these ophidian accidents. The phytochemical prospection of *H. brasiliiana* allowed the isolation of new pterocarp from the roots and the wood, while the chemical study of the leaves was obtained unpublished phloroglucinols. The objective of this study was to investigate the anti-inflammatory and healing response in vitro promoted by phloroglucinols isolated from *Harpalyce brasiliiana* leaves. Cytotoxicity was assessed by the MTT assay and significantly none of the 6 phloroglucinols isolated (HBF-5, -6, -7, -8, -9, -10) reduced the viability of murine macrophages and fibroblast strains at concentrations of 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25 and 50 μ M. With the migration assay, in 3T3 fibroblasts, within 24 h the phloroglucinols all wounds were closed. In the nitric oxide (NO) dosage with the strain of RAW 264.7, HBF-6, 7 and 9 reduced NO release when compared to the LPS-stimulated control. The biological study of the anti-inflammatory and healing response in vitro promoted by the premanaged/geranylated monomeric phloroglucinols isolated from *H. brasiliiana*, evaluated its immunological effect in the inflammatory condition stimulated by LPS for cytokine dosage analyzed in CBA flow cytometry, being able to reduce secretion of the major proinflammatory cytokines IL-6, TNF- α , INF- γ and IL-17 characterizing an anti-inflammatory profile as well as IL-10. In conclusion, the phloroglucinols isolated from the ethanolic extract of the leaves of *H. brasiliiana* did not present cytotoxic and cicatrizant activity. With activity against NO reduction and anti-inflammatory, results indicate the biological activities of these substances, never before studied.

Keywords: Immunological activity. Phloroglucinols. Harpalyce.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotos de diferentes partes de <i>H. brasiliiana</i> : (A) sementes, (B) flor, (C) raiz, (D) espécime completo em seu <i>habitat</i> natural.....	23
Figura 2 - Estrutura do 1,3,5-tri-hidroxi-benzeno THB	24
Figura 3 - Estruturas das subclasses dos floroglucínóis: diméricos (2), triméricos (3), tetraméricos (4) e florotaninos (5)	26
Figura 4 - Estruturas dos tipos de floroglucínóis monoméricos: prenilados (1.1) e geranilados (1.2), acilados (1.3), terpênicos (1.4), glicosilados (1.5), halogenados (1.6), α -pironas substituídos (1.7) e policetídicos cíclicos.....	28
Figura 5 - Estruturas químicas dos floroglucínóis isolados da <i>H. brasiliiana</i> Benth. e a fração da qual foi obtido (HBF)	29
Figura 6 - Componentes das respostas inflamatórias e suas principais funções	31
Figura 7 - Interleucinas envolvidas na resposta imune	34
Figura 8 – Macrófagos e sua atuação na imunidade adaptativa	35
Figura 9 – Células envolvidas nas fases da cicatrização	38
Figura 10 - Linhagem de 3T3 / RAW 264.7	41
Figura 11 - Porcentagem de viabilidade das células de fibroblastos 3T3 tratadas com o HBF-5 após 24h, 48h e 72h	46
Figura 12 - Porcentagem de viabilidade das células de fibroblastos 3T3 tratadas com o HBF-6 após 24h, 48h e 72h	46
Figura 13 - Porcentagem de viabilidade das células de fibroblastos 3T3 tratadas com o HBF-7 após 24h, 48h e 72h	47
Figura 14 - Porcentagem de viabilidade das células de fibroblastos 3T3 tratadas com o HBF-8 após 24h, 48h e 72h	48

Figura 15 - Porcentagem de viabilidade das células de fibroblastos 3T3 tratadas com o HBF-9 após 24h, 48h e 72h	49
Figura 16 - Porcentagem de viabilidade das células de fibroblastos 3T3 tratadas com o HBF-10 após 24h, 48h e 72h	50
Figura 17 - Porcentagem de viabilidade das células RAW 264.7 tratadas com o HBF-5 após 24h, 48h e 72h	51
Figura 18 - Porcentagem de viabilidade das células RAW 264.7 tratadas com o HBF-6 após 24h, 48h e 72h	51
Figura 19 - Porcentagem de viabilidade das células RAW 264.7 tratadas com o HBF-7 após 24h, 48h e 72h	52
Figura 20 - Porcentagem de viabilidade das células RAW 264.7 tratadas com o HBF-8 após 24h, 48h e 72h	53
Figura 21 - Porcentagem de viabilidade das células RAW 264.7 tratadas com o HBF-9 após 24h, 48h e 72h	53
Figura 22 - Porcentagem de viabilidade das células RAW 264.7 tratadas com o HBF-10 após 24h, 48h e 72h	54
Figura 23 - Taxa de migração de células (%) fibroblastos 3T3 murinos tratados com os compostos floroglucínóis HBF-5, HBF-6, HBF-7, HBF-8, HBF-9 e HBF- 10, determinado pela velocidade de fechamento da ferida	57
Figura 24 - Fotos microscópicas dos fibroblastos 3T3 no controle – tratados com meio, no tempo de 0h (A), 12h (B) e 24h (C). Tratados com o HBF-7 na concentração de 1,56 μ M no tempo de 0h (D), 12h (E) e 24h (F) para o fechamento da “ferida”. Controle + tratado com fitohemaglutinina (5 μ g/mL) no tempo de 0h (G), 12h (H) e 24h (I)	59
Figura 25 - Concentração de NO (μ M) em macrófagos murinos RAW 264.7 tratados por 24h com os compostos floroglucínóis HBF-5, HBF-6, HBF-7, HBF-8, HBF-9 e HBF- 10 nas concentrações de 1,56, 6,25 e 25 μ M	61
Figura 26 - Influência dos floroglucínóis na secreção de IL-17 (% de citocina) determinada pelo ensaio de CBA. Controle negativo células RAW 264.7 estimuladas e	

não estimuladas com LPS (5µg/mL) e controles positivo Dexametasona (10 µg/mL) e L-NAME (25 µg/mL).....	63
Figura 27 - Influência dos floroglucínóis na secreção de TNF-α (% de citocina) determinada pelo ensaiode CBA.....	63
Figura 28 - Influência dos floroglucínóis na secreção de INF-γ (% de citocina) determinada pelo ensaiode CBA.....	64
Figura 29 - Influência dos floroglucínóis na secreção de IL-4 (% de citocina) determinada pelo ensaiode CBA.....	64
Figura 30 - Influência dos floroglucínóis na secreção de IL-2 (% de citocina) determinada pelo ensaio de CBA.....	65
Figura 31 - Influência dos floroglucínóis na secreção de IL-6 (% de citocina) determinada pelo ensaio de CBA.....	65
Figura 32 - Influência dos floroglucínóis na secreção de IL-10 (% de citocina) determinada pelo ensaiode CBA.....	66

LISTA DE TABELA

Tabela 1 Espécies do gênero <i>Harpalyce</i> aceitas no ILDIS e disponíveis na Lista de Plantas – (The Plant List – A working list of all plant species 2010).....	22
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Analysis of Variance (Análise de variância, inglês)
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
DMEM	Meio de cultura <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
FACS	Fluorescence-activated cell-sorting (Triagem de células ativadas por fluorescência, inglês)
ELISA	Enzyme -Linked Immunosorbent Assay
HPP	<i>H. perforatum</i> ssp. <i>perforatum</i>
HPV	<i>H. perforatum</i> ssp. <i>veronese</i>
IL	Interleucina
IL – 1	Interleucina 1
IL – 2	Interleucina 2
IL – 4	Interleucina 4
IL – 5	Interleucina 5
IL – 6	Interleucina 6
IL – 10	Interleucina 10
IL – 13	Interleucina 13
IL – 17	Interleucina 17
IL - 1 β	Interleucina 1beta
IFN- α	Interferon alfa
IFN- γ	Interferon gama
iNOS	Inducible nitric oxide synthase, Oxido nítrico sintase indutível
IFNR	Receptor de interferon
LPS	Lipopolissacárido
M	Molar
MEC	Matriz Extracelular
MTT	Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio
NFkB	(do inglês, Nuclear Factor kappa B)

NO	Nitric Oxide (Óxido Nítrico)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salina
PHA	Fitohemaglutinina
Th1	Perfil pró-inflamatório
Th2	Perfil anti-inflamatório
TLR	Toll <i>like</i> receptor, Receptores do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TGF- β	Fator de necrose tumoral beta
Toll- <i>like</i> 4	Receptor Toll like 4
Treg	Células T reguladoras
THB	1,3,5-tri-hidroxi-benzeno
μ g	micrograma
μ L	microlitro
mM	milimolar
μ M	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.2	OBJETIVO GERAL	19
2.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1	FAMÍLIA <i>Fabaceae</i>	20
3.1.2	<i>Harpalyce brasiliiana</i> Benth.	21
3.2	FLOROGLUCINÓIS	23
3.3	SISTEMA IMUNE E O MECANISMO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA	30
3.3.2	Processo básico de cicatrização da ferida	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	MATERIAIS	40
4.2	CULTURA DAS CÉLULAS FIBROBLASTOS 3T3 E MACRÓFAGOS RAW 264.7 MURINOS	40
4.3	ENSAIO DE MTT EM FIBROBLASTOS 3T3 E CÉLULAS RAW 264.7	41
4.4	ENSAIO DE MIGRAÇÃO DE FIBROBLASTOS 3T3	41
4.5	ESTIMULO A PRODUÇÃO DE CITOCINAS E NO COM LPS EM MACRÓFAGOS 264.7 DOSAGEM DE CITOCINAS EM CÉLULAS RAW 264.7	42
4.6	DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EM MACRÓFAGOS MURINOS ...	43
4.7	DOSAGEM DE CITOCINAS EM CÉLULAS RAW 264.7	43
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICAS	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DOS SEIS DERIVADOS MONOMÉRICOS DO FLOROGLUCINOL EM FIBROBLASTOS E MACRÓFAGOS	45
5.1.2	Fibroblastos 3T3 tratados com os floroglucínóis	45

5.1.3	Células RAW 264.7 tratadas com os floroglucinóis	50
5.2	ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> EM FIBROBLASTOS 3T3	56
5.3	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)	60
5.4	DOSAGEM DE CITOCINAS EM CÉLULAS RAW 264.7	62
6	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são fontes de agentes terapêuticos utilizados ao longo dos tempos no tratamento das doenças, prática tão antiga quanto a civilização humana e transmitida através do conhecimento tradicional, sendo reconhecido como parte da medicina convencional pela Organização Mundial de Saúde (OMS). As plantas medicinais são importantes como fitoterápicos e na descoberta de novos fármacos, onde se encontra no reino vegetal a maior contribuição para medicamentos (BORCHARDT, 2002; CRAGG e NEWMAN, 2013).

O Brasil possui um número de espécies vegetais estimado entre 350.000 e 550.000, dentre as quais apenas 55.000 são catalogadas e distribuídas entre as diferentes regiões do país. Essa diversidade proporciona um campo para pesquisa científica na descoberta de compostos naturais, com a compreensão da imunomodulação na atividade biológica e o conhecimento sobre sua diversidade química para uma melhor utilização e preservação deste recurso terapêutico oferecido pela natureza (KOEHN e CARTER, 2005; BRASIL, 2011).

A região Nordeste apresenta uma forte cultura popular de utilização das plantas medicinais, com um grande número de plantas conhecidas mas apenas algumas foram fitoquimicamente investigada e avaliada para determinar seu potencial farmacológico. Mesmo entre as plantas medicinais tradicionais, ainda há muitas que não foram estudadas para confirmar sua eficácia e segurança em humanos (BRUNING et al., 2012).

Harpalyce brasiliiana Benth (Fabaceae) é um arbusto do Nordeste brasileiro encontrado principalmente nos estados do Ceará, Piauí e Maranhão, designada popularmente como "raiz-de-cobra". O uso etnobotânico das raízes de *H. brasiliiana* pela população local, é empregado no tratamento de acidentes ofídicos e suas folhas em atividades anti-inflamatórias (SILVA et al., 1999; XIMENES et al., 2012).

O estudo fitoquímico de *H. brasiliiana* possibilitou o isolamento de novos pterocarpanos a partir das raízes e do caule. Enquanto do químico das folhas de *H. brasiliiana* foram obtidos floroglucínóis inéditos, que nunca haviam sido encontrados na família Fabaceae (ARAÚJO, 2008).

As propriedades curativas das plantas dependem, em grande parte da presença de substâncias oriundas do seu metabolismo secundário, pertencentes a classes químicas diversas

como os alcaloides, terpenoides e flavonoides (CSEKE et al., 2006; GARCIA-LAFUENTE et al., 2009; PRASAD et al., 2010). Os floroglucínóis constituem uma das maiores classes de metabólitos secundários com larga ocorrência principalmente nos gêneros *Hypericum* (ROWE, 1989; XIAO e QING, 2007; NOR et al., 2008) e *Eucalyptus* (GHISALBERTI, 1996) das famílias Hypericaceae e Mirtaceae, respectivamente (ARAÚJO, 2008).

O floroglucinol 1 (1,3,5-tri-hidroxi-benzeno) é o precursor de diversas moléculas com atividades biológicas. Em estudos com plantas, o floroglucinol foi aplicado no enraizamento de estacas lenhosas e na reação morfogênica de segmento (RUFATO, et al., 2001). Pesquisas em animais, foram descritas as atividades anticonvulsivante, antidepressiva, antimicrobiana, antialérgica e anti-inflamatória (FRANÇA e KUSTER 2009; LUNARDELLI, 2012; STEIN, et al., 2012).

Uma resposta inflamatória apropriada vai depender do controle do perfil pró-inflamatório (Th1) e anti-inflamatório (Th2) promovido por diferentes famílias de citocinas (MANJULA et al., 2006). O processo de qualquer inflamação inclui uma variedade de fatores derivados do sistema imune, tais como células imunológicas, sistema complemento, citocinas e mediadores da inflamação. Esse evento também é acompanhado por um processo complexo e multifatorial, caracterizado pela eliminação do agente agressor, pela irrigação, nutrição e oxigenação do tecido lesionado, a cicatrização (EFRON e MOLDAWER, 2004; AMMON, 2010; BECKER et al., 2013).

As plantas usadas tradicionalmente no tratamento da cicatrização, febre, infecção, edema ou doenças reumáticas apresentam indicadores da presença de compostos com propriedades anti-inflamatórias e, assim, devem ser investigadas e sua eficácia comprovada, através de estudos feitos em modelos experimentais (RAUH, 2008; CATÃO, 2006).

Nessa perspectiva, esse estudo visa avaliar o perfil anti-inflamatório e cicatrizante promovido pelos floroglucínóis inéditos isolados de *Harpalyce brasiliiana*, em ensaios pré-clínicos *in vitro* em linhagem de células macrófagos RAW 264.7 e 3T3 fibroblastos murinos.

2 OBJETIVOS

2.2 OBJETIVO GERAL

Investigar a resposta anti-inflamatória e cicatrizante *in vitro* promovida por floroglucínóis isolados das folhas de *Harpalyce brasiliiana* Benth.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a citotoxicidade dos floroglucínóis isolados de *H. brasiliiana* frente as linhagens de fibroblastos e macrófagos murinos;
- Avaliar a atividade cicatrizante dos fibroblastos murinos estimulados pelos floroglucínóis isolados de *H. brasiliiana*;
- Avaliar a potencial atividade anti-inflamatória dos floroglucínóis isolados de *H. brasiliiana* e a liberação de óxido nítrico (NO);
- Avaliar a liberação de citocinas Th1 e Th2 em macrófagos estimulados e não estimulados com LPS e tratados com os floroglucínóis isolados de *H. brasiliiana*;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 FAMÍLIA *Fabaceae*

Fabaceae é uma das maiores famílias botânicas, sendo a terceira maior família de Angiospermas, compreendendo cerca de 727 gêneros e 19.325 espécies, ficando atrás apenas da Orchidaceae e Asteraceae (LEWIS et al., 2005). Espalhadas em todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, presentes em menor número nas regiões temperadas. No Brasil, existem cerca de 210 gêneros e 2.694 espécies, que se destacam como elemento florístico nas principais formações florestais brasileiras, principalmente em trechos da Mata Atlântica e do Cerrado (LIMA et al., 2010).

As plantas dessa família apresentam-se como grandes árvores nas matas tropicais e ainda como arbustos, subarbustos, ervas anuais ou perenes (ARAÚJO, 2008). As raízes de quase todas as leguminosas apresentam nodosidades. O caule se apresenta bem variado. As folhas são alternas espiraladas, compostas, às vezes, unifoliolada e o tipo de folha auxilia a caracterizar a subfamília. Seus frutos são do tipo legume, também conhecido como vagem, característico dessa família (PONTES, 2014).

Os frutos apresentam importância econômica devido ao seu número de variedades alimentícias ricas em carboidratos, como a soja (*Glycine Max*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), ervilha (*Pisum sativum*), amendoim (*Arachis hypogaeae*) entre outras; medicinais, madeireiras com as espécies *Dypterix*, *Dalbergia*, e *Hymenolobium*, ornamentais produtora de fibras e óleo, e no cultivo do solo por contribuir na agricultura como adubos naturais (WOJCIECHOWSKI et al., 2004).

Pertencente à ordem Fabales, a família Fabaceae é dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (Faboideae) (RIBEIRO et al., 1999). Fabaceae é considerada mono-parafilética, assim como as subfamílias Papilionoideae e Mimosoideae, distribuída em 70 gêneros e aproximadamente 3.270 espécies, sendo a segunda maior subfamília de Fabaceae (LEWIS et al., 2005) e Cesalpinioideae é parafilética e considerada a mais primitiva, de grande importância como grupo taxonômico, predomina árvores, arbustos e ervas. Com aproximadamente 154 gêneros e 2.800 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, principalmente na América do Sul, África tropical e sudeste da

Ásia (COWAN, 1981; LEWIS, 1987; LEWIS & POLHILL, 1998; WOJCIECHOWSKI et al., 2004).

Papilionoideae é a maior das três subfamílias com cerca de dois terços de todos os gêneros e espécies, apontada como a mais evoluídas dentre as leguminosas, compreende por volta de 28 tribos, 478 gêneros e 13.800 espécies, sendo principalmente árvores e arbustos (LEWIS et al., 2005; RIBEIRO et al., 1999). “Papilio” é uma palavra que significa “borboleta”, sendo o formato característico da flor que nomeou a espécie. A presença de nodosidade nas raízes é mais presente nessa subfamília (RIBEIRO et al., 1999; ARAÚJO, 2008).

Essa subfamília apresenta diversas espécies de uso na medicina popular como *Abrus precatorius* L., a qual possui saponinas com atividade anti-inflamatória já descrita e a lectina abrina, dentre as substâncias químicas de maior toxicidade, na sua composição química (DEL SOL, et al., 2006). *Desmodium adscendens* (Sw.) DC. utilizada na cultura indígena na Amazônia como antimalárico e contraceptivo (BRANDÃO, et al., 1992). *Erythrina mulungu* Mart. Ex Benth, empregada no tratamento de distúrbios do sistema nervoso, como ansiedade, tosse nervosa e sedativo (CRUZ, 1995; CORRÊA, et al., 1998). *Poiretia tetraphylla* (Poir.) Burk usada como anti-inflamatória, anti-helmíntica, tratamento de impotência e inseticida (BURKART, 1943). Foram descritos na Papilinoideae metabólitos atribuídos às propriedades medicinais, como os isoflavonóides e taninos, mais de 200 alcalóides quinolizidínicos também foram identificados, além de vários tipos de aminas, cumarinas, diterpenos e triterpenos, fenilpropanóides, inibidores de proteases e lectinas se destacando nas atividades anti-inflamatória, antialérgico, hipotensora e analgésica (GOTTLIEB; KAPLAN; BORIN, 1996.; ROYER, 2011).

3.1.3 *Harpalyce brasiliiana* Benth.

O gênero *Harpalyce* compreende 30 espécies originárias do Brasil, Cuba, México e Nicarágua e descritas e aceitas no The International Legume Database and Information Service (ILDIS), descritas na Tabela 1. As espécies *H. maisiana* e a *H. cubensis* tem ocorrência apenas em Cuba, aonde se encontram na Lista vermelha de espécies ameaçadas da IUCN (PONTES, 2014).

Espécies do gênero *Harpalyce*

<i>Harpalyce acunae</i> Borhidi & O.Muniz	<i>Harpalyce alainii</i> Leon
<i>Harpalyce baracoensis</i> Borhidi & O.Muniz	<i>Harpalyce arborescens</i> A.Gray
<i>Harpalyce borhidii</i> O.Muniz	<i>Harpalyce brasiliiana</i> Benth.
<i>Harpalyce cristalensis</i> Borhidi & O.Muniz	<i>Harpalyce cubensis</i> Griseb.
<i>Harpalyce ekmanii</i> var. <i>angustiflora</i> (Leon & Alain) Arroyo	<i>Harpalyce ekmanii</i> Urb.
<i>Harpalyce flexuosa</i> Borhidi & O.Muniz	<i>Harpalyce foliosa</i> Borhidi & O.Muniz
<i>Harpalyce formosa</i> var. <i>goldmanii</i> (Rose) Arroyo	<i>Harpalyce formosa</i> DC.
<i>Harpalyce hilariana</i> var. <i>Speciosa</i> (Taub.) Arroyo	<i>Harpalyce hilariana</i> Benth.
<i>Harpalyce macrocarpa</i> Britton & Wilson	<i>Harpalyce lepidota</i> Taub.
<i>Harpalyce maisiana</i> Leon & Alain	<i>Harpalyce mexicana</i> Rose
<i>Harpalyce moana</i> Borhidi & O.Muniz	<i>Harpalyce menor</i> Benth.
<i>Harpalyce parvifolia</i> H.S.Irwin & Arroyo	<i>Harpalyce nipensis</i> Urb.
<i>Harpalyce robusta</i> H.S.Irwin & Arroyo	<i>Harpalyce pringlei</i> Rose
<i>Harpalyce rupicola</i> Donn.Sm.	<i>Harpalyce sousai</i> Arroyo
<i>Harpalyce toaensis</i> Borhidi & O.Muniz	<i>Harpalyce villosa</i> Britton & Wilson

Tabela 1. Espécies do gênero *Harpalyce* aceitas no ILDIS e disponíveis na Lista de Plantas – (The Plant List – A working list of all plant species 2010).

H. brasiliiana é uma planta nativa do Brasil, pertencente a subfamília Papilionoideae, encontrada principalmente nos estados do Ceará, Maranhão e Piauí onde é conhecida popularmente como “raiz-de-cobra” ou “erva-de-cobra” por ser utilizada como tratamento para acidentes com serpentes e escorpiões, principalmente nos locais de difícil acesso ao soro antiofídico. Nas regiões rurais quando ocorrem os casos de acidentes com picadas e há liberação do veneno, existe a prática de preparar e ingerir uma solução hidroalcoólica com raízes da planta como tratamento imediato após o incidente (ARAUJO, 2008; PONTES, 2014).

Na obra *Flora Brasiliensis* publicada pelo botânico Carl Friedrich Philip von Martius em 1859, a *H. brasiliiana* foi descrita por sua ação medicinal empregada no tratamento de picadas de serpentes, através do uso de preparações antiofídicas conhecidas como ‘específicos’ pela população local (XIMENES, 2012).

A espécie *Harpalyce brasiliiana* é um arbusto medindo de 1 a 4 metros de altura com ramos alongados. Suas folhas apresentam coloração verde escura, aveludadas, estípulas pequenas, setáceas e caducas, com 7 a 11 folíolos com 2,5 a 3,5 cm de comprimento. As flores são alaranjadas. O fruto legume do tipo vagem se apresenta reto glabro de 5,0 a 7,5 cm de comprimento e 1,2 a 3,0 cm de largura (Figura 1) (ARAÚJO, 2008).

Fotos: Prof. Edilberto R. Silveira; Maurício Mercadante.



Figura 1 - Fotos completo em de diferentes partes de *H. brasiliiana*: (A) sementes, (B) flor, (C) raíz, (D) espécime em seu *habitat* natural.

Os estudos fitoquímicos realizados com *H. brasiliiana* identificaram a presença de pterocarpanos, isoflavonas, chalconas, triterpenos entre outras substâncias. Foram isolados de extratos das raízes diversos flavonoides (incluindo três pterocarpanos com atividade antiofídica comprovada, as cabernegrinas A-I e A-II e a harpalicina I) e do extrato etanólico das folhas da *H. brasiliiana* foram isolados por Araújo (2008) os compostos químicos floroglucínóis, inéditos, e nunca encontrados na família Fabaceae e a isoflavona harpalicina 2 (SILVA, 1999; ARAÚJO, 2008; XIMENES, 2009; PONTES, 2014).

3.2 FLOROGLUCINÓIS

Como produto do metabolismo secundário normal, os vegetais são capazes de biossintetizar um elevado número de compostos fenólicos, alguns dos quais são indispensáveis para o desempenho suas funções fisiológicas e outros são de utilidade para defesa e adaptação. Os compostos fenólicos compreendem um grupo heterogêneo de substâncias com estruturas químicas relativamente simples e outras complexas, destacando – se os floroglucínóis e seu derivados, compostos polifenólicos abundantes em certos vegetais, frutas, sementes e algas considerado como uma classe de nutrientes semi-essenciais para os seres humanos e relatados pelos seus efeitos benéficos para eliminar radicais de oxigênio, com atividade antibacteriana e combate ao câncer (NAIR et al., 2006; AHN et al., 2010; LUNARDELLI, 2012).

Os derivados do floroglucinol são resultantes de inúmeras substituições ou oxidações no esqueleto básico **1,3,5-tri-hidroxi-benzeno (THB)** (Figura 2), que é o floroglucinol em si, também chamado de floroglucina. Quase sempre contém uma carbonila de cetona ou de aldeído, conjugada com o anel benzênico. A estrutura do floroglucinol não se encontra como tal na natureza, o que torna seus derivados não muito abundantes, com sua biogênese muito complexa, aonde na origem destes compostos a presença da carbonila é biogeneticamente favorecida (ARAÚJO, 2008).

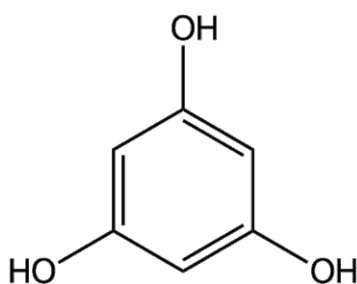


Figura 2 - Estrutura do 1,3,5-tri-hidroxi-benzeno (THB).

Os floroglucínóis são relatados como presentes principalmente nas famílias *Hypericaceae* e *Mirtaceae*, mas também foram encontrados nas famílias *Asteraceae*, *Cannabinaceae*, *Clusiaceae*, *Crassulaceae*, *Euforbiaceae*, *Guttiferae*, *Lauraceae*, *Fagaceae*, *Rutaceae* e *Rosaceae* e a partir de fontes marinhas e de micro-organismos (SIGH e BHARATE, 2006; PONTES, 2014).

Biossinteticamente os floroglucínóis se formam através da via do acetado, com viabilidade de substituição dos hidrogênios do anel, geralmente com substituintes do tipo acila ou aquila. Após sua ligação ao anel eles podem estar suscetíveis à ciclizações e oxidações, podendo resultar em moléculas mais complexas, bicíclicas, tricíclicas. O que proporciona uma

variedade de estruturas com potencial atividade biológica a ser estudada (SCHMIDT et al., 2012). O estudo de ANH et al. (2010) foi o primeiro a identificar o papel de um floroglucinol na ativação da resposta imune ou no seu mecanismo posterior, demonstrando que o floroglucinol ativou a proliferação de linfócitos sem citotoxicidade e a produção de IL-2 ativando a via de sinalização NFκB.

Estudos recentes demonstraram que a variedade estrutural de floroglucinol isolado de *Ecklonia cava* induz atividades farmacológicas atuando na inibição da apoptose e protegendo as células contra o estresse oxidativo. O floroglucinol atuou como citotóxico para células de câncer de mama (HT-29), sendo estudado para determinar seus efeitos farmacológicos e imunológicos (KANG et al., 2014).

Estudos com atividade comprovada antihelmíntica, especialmente tenicida (SOCOLSKY et al., 2012). Ação antibacteriana e antioxidante (VAN KLINK et al., 2005; RUKACHAISIRIKUL et al., 2006). Compostos derivados do floroglucinol com atividade anticonvulsiva em zebrafish (*Danio rerio*) (LUNARDELI, 2012) foram relatados.

O floroglucinol também apresentou atividade radioprotetor contra danos oxidativos induzidos por radiação gama e induzidos por UVB, diminuindo o nível de EROs intracelular e os danos causados a componentes celulares (KANG et al., 2010; IM et al., 2016). Atividades anti-inflamatórias e antinociceptivos foram comprovadas com o floroglucinol isolado de *Callistemon citrinus* (Myrtaceae), constituinte vegetal presente na dieta dos aborígenes, atuando na inflamação e dor, proporcionando uma melhor chance de sobrevivência em condições adversas do meio ambiente (RADULOVIĆ et al., 2015). Atividade anti-inflamatória também, de um derivado ativo de floroglucinol, watsonianone A, isolado do fruto de *Rhodomyrtus tomentosa* (ZHANG et al., 2018).

Estruturalmente, os floroglucinóis podem ser subclassificados como: monoméricos (1), diméricos (2), triméricos (3), tetraméricos (4) e florotaninos (5) (Figura 3). Os floroglucinóis monoméricos são encontrados principalmente em plantas, com uma grande variedade de atividade biológica a ser estudada. E por causa da grande variedade estrutural os monoméricos são divididos em: prenilados (1.1) e geranilados (1.2), acilados (1.3), terpenilados (1.4), glicosilados (1.5), halogenados (1.6), α -pironas substituídos (1.7) e policetídeos cíclicos (1.8) (Figura 4) (SINGH e BHARATE, 2006).

Fontes: Arisawa, 2003; Woldemariam et al., 1992; Glombitz E Li, 1991.

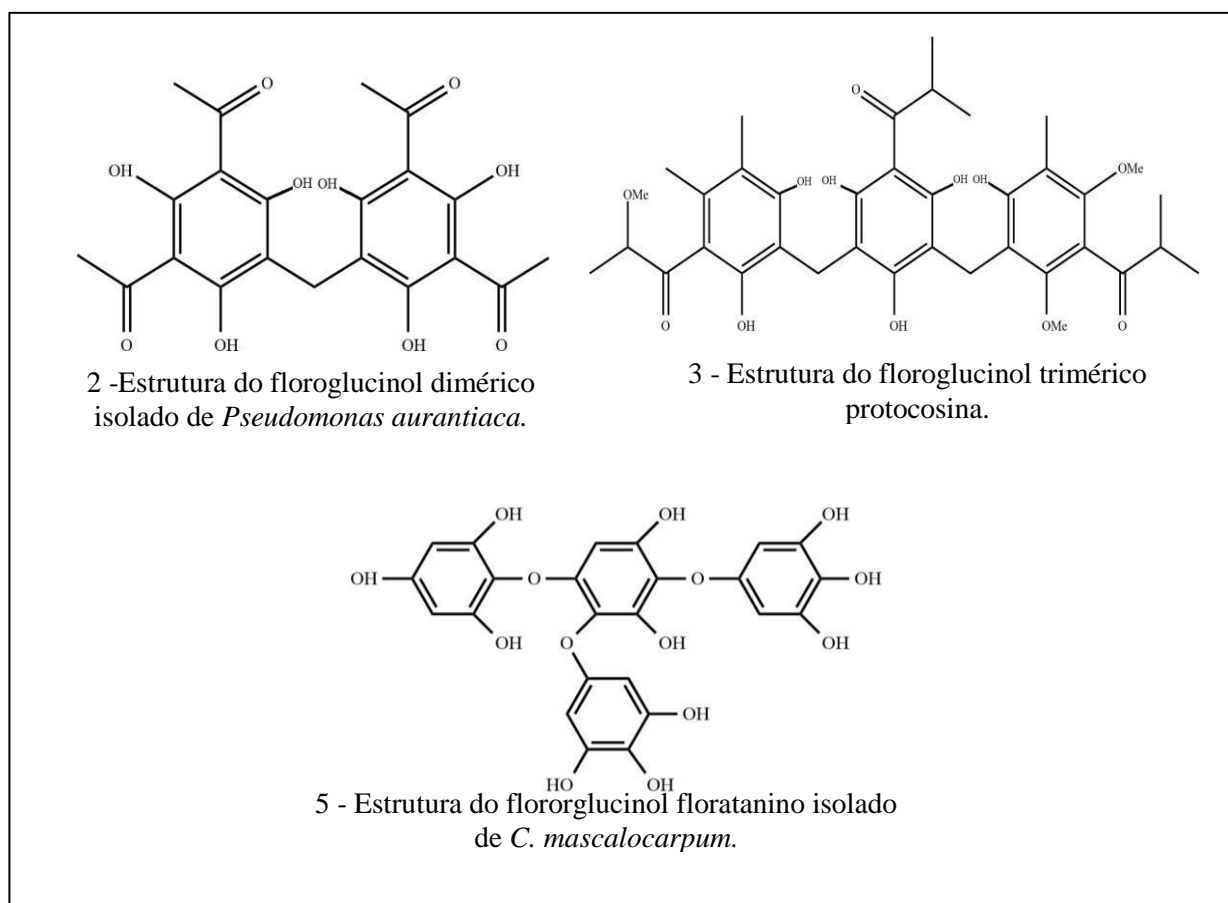


Figura 3 - Estruturas das subclasses dos floroglucínios: diméricos (2), triméricos (3), tetraméricos (4) e florotaninos (5).

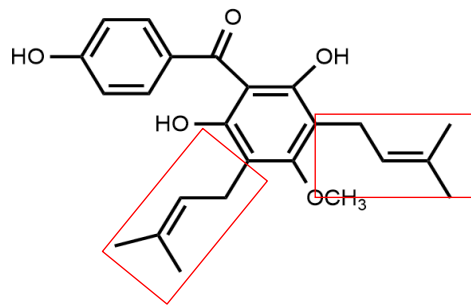
Muitas espécies de plantas apresentam floroglucínios monoméricos, como as do gênero *Eucalyptus*, onde *Eucalyptus grandis* foi isolado o grandinol, principal representante dos floroglucínios acilados, com atividade antiviral e bactericida estudada (BLOOR, 1992); da *Vidalia obtusiloba*. (C. Agardh) J. Agardh, floroglucínios halogenados com ação anti-inflamatória (SINGH e BHARATE, 2006). Espécies do gênero *Helichrysum*, com floroglucínios ligados a anel α -pirona com propriedades antifúngicas (TOMAS- LORENTE *et al.*, 1989). Floroglucínios policéticos cíclicos demonstraram ação antimicrobiana e antimalárica, isolados de espécies do gênero *Eucalyptus* e *Hypericum*; podendo também ser poliéticos policíclicos onde se destaca a hiperforina e suas atividades antibacteriana, antifúngica, antiutnoral e antidepressiva, como o representante mais estudado dessa subclasse (VUUREN *et al.*, 2006; BEERHUES, 2006).

Na classe dos diméricos as estruturas são formadas por duas unidades de floroglucínios, não obrigatoriamente idênticos, ligados por um carbono metileno. Na estrutura 2 (Figura 4)

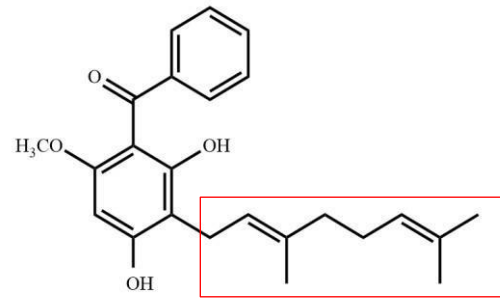
temos a primeira substância isolada dessa classe, a partir cultura de *Pseudomonas aurantiaca*, apresentando ação antibiótica contra algumas bactérias Gram-positivas (ESIPOV et al., 1975; ARISAWA, 2003). Os floroglucinóis triméricos e tetraméricos, são formados por três ou mais unidades de floroglucinóis, ligados por carbonos metilênicos, respectivamente, onde dos tetraméricos possuem apenas seis compostos isolados e relatados na literatura.

Os floroglucinóis unidos entre si de forma diversa são classificados como florotaninos, apresentando instabilidade nos fenóis livres isolados por isso na forma de paracetatos, são metabolitos secundários do floroglucinol THB que foi polimerizado através de ligações éter, fenila ou 1,4-dibenzodioxina (Figura 3) e sendo encontrados até hoje apenas em algas marrons e vermelhas (ARAÚJO, 2008). Os florotaninos são responsáveis por uma variedade de atividades biológicas, o phlorofucofuroeckol Bisolado de *Eisenia arborea* suprime a liberação de histamina de células murinas de leucemia basófilas (SUGIURA et al., 2006); apoiando as atividades anti-inflamatórias, isolados florotaninos da alga marrom *Eisenia bicyclis* apresentaram atividades inibitórias *in vitro* na redução da produção de NO, iNOS, expressão da proteína COX-2 e geração de ROS (JUNG et al, 2013). Florotaninos isolados dessa mesma alga tinham apresentado atividades inibitórias de hialuronidase, fosfolipase A2, lipoxigenase, e enzimas COX, que estão envolvidas na resposta inflamatória (SHIBATA et al., 2003).

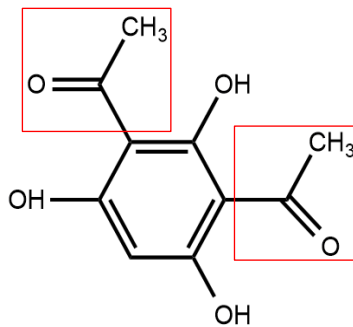
Fontes: Isnansetyo, 2003; Takasaki, 2000; Bohlmann e Mahanta, 1980; Zhang, 1992; 2002; Morris et al., 1987; Nakagawa-Goto et al., 2005; Tomas-Barberan et al., 1990.



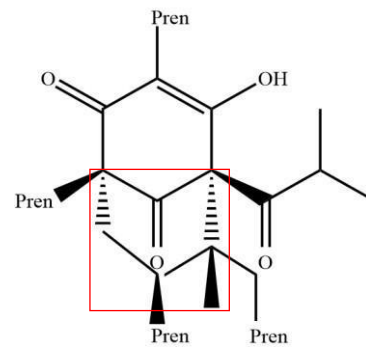
1.1 - Estrutura do vismiafenona D (prenilado).



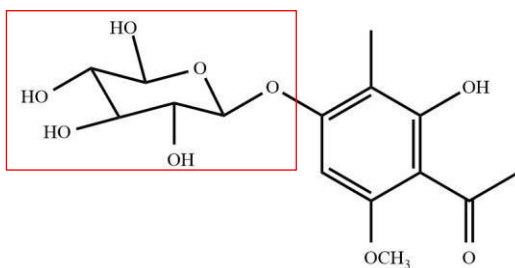
1.2 - Estrutura da marupona (geranilado).



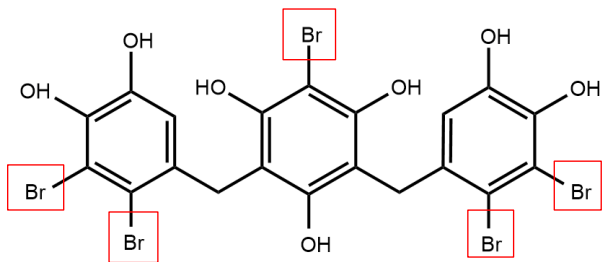
1.3 - Estrutura do 2,4-diacetilfloroglucinol (acilfloroglucinol).



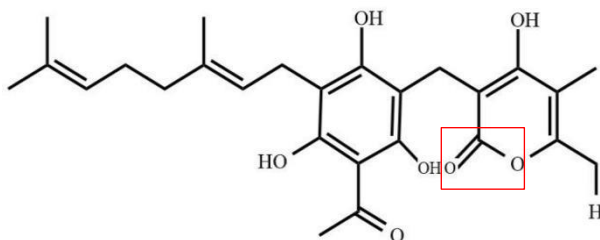
1.4 - Estrutura do euglobal G1 (monomérico terpenilado).



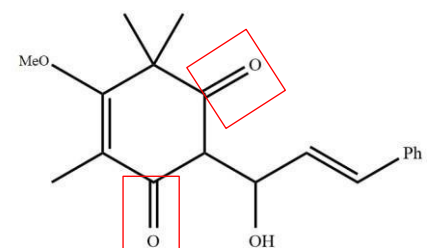
1.5 - Estrutura do floroglucinol O-glicosilado.



1.6 - Estrutura do floroglucinol halogenado isolado da *Dactyloctenium aegyptium*.



1.7 - Estrutura do floroglucinol α -pirona isolado da *Helichrysum decumbens*.



1.8 - Estrutura da desmodumotina C (policetídeo cíclico).

Figura 4 - Estruturas dos tipos de floroglucínóis monoméricos: prenilados (1.1) e geranilados (1.2), acilados (1.3), terpênicos (1.4), glicosilados (1.5), halogenados (1.6), α -pironas substituídos (1.7) e policetídeos cíclicos.

Os floroglucínóis (HBF-5, -6, -7, -8, -9, -10) objetos desse estudo, são monoméricos prenilados/geranilados, ligados diretamente ao anel aromático do THB, estruturas mostradas na Figura 5.

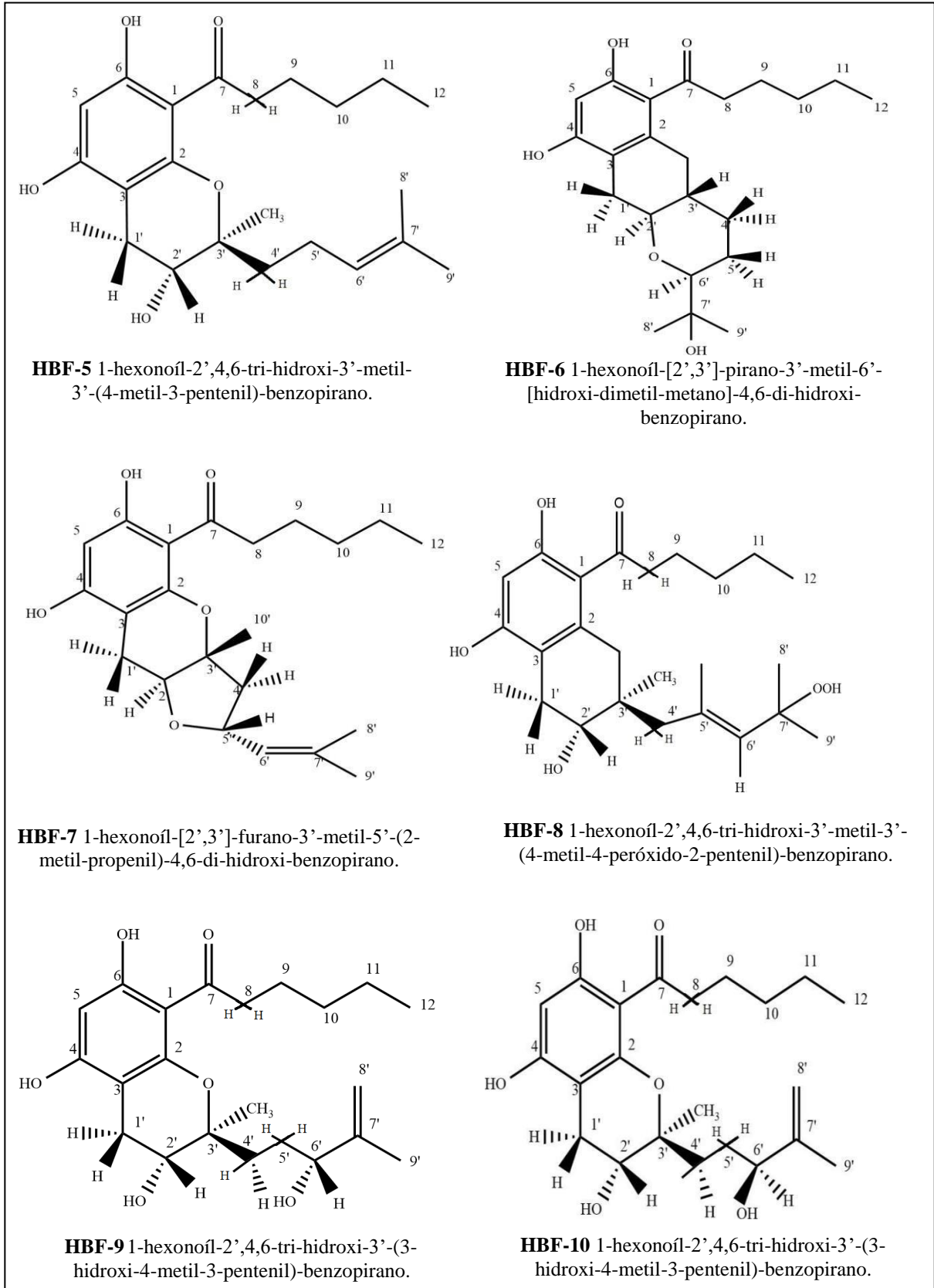


Figura 5 - Estruturas químicas dos floroglucínóis isolados da *H. brasiliiana* Benth. e a fração da qual foi obtido (HBF).

3.3 SISTEMA IMUNE E O MECANISMO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

As pesquisas etnofarmacológicas voltadas ao estudo do efeito imunomodulador de plantas medicinais, utilizadas pela comunidade para o tratamento de diversas doenças, impulsionam a busca pela pesquisa clínica sobre as respostas que o sistema imune pode expressar, com o uso dos produtos naturais, destacando-se sua ação na ativação das citocinas e diversas condições fisiopatológicas, com a inflamação e a cicatrização (OLIVEIRA, 2010; GERTSCH et al., 2010).

Todos os organismos vivos, dos mais simples aos mais complexos, possuem um mecanismo de resposta a estímulos agressores, que configura um sistema que busca continuamente manter o seu equilíbrio homeostático. No sítio inflamatório, as células do sistema imunitário desempenham, em associação coletiva, a resposta de defesa contra substâncias estranhas ou micro-organismos infecciosos, injúria tecidual, irritação química ou por toxinas que desencadeiam o processo de inflamação, capaz assim, de envolver aspectos da fisiologia, imunologia e bioquímica do organismo (BEHM et al., 2011; DASH & MURTHY, 2011).

Independentemente do fator desencadeante, os mecanismos envolvidos no processo inflamatório são comuns a todos os sinais padrão e de inflamação. Sendo expressos por um aumento do fluxo de sangue, elevado metabolismo celular, vasodilatação, libertação de mediadores solúveis, extravasamento de fluidos e influxo celular. A fase aguda, parte um da inflamação, tem duração curta (Figura 6). Nessa fase ocorre a liberação de exsudato com proteínas plasmáticas que vão culminar em edema e migração de células circulantes (neutrófilos e monócitos) para o sítio inflamatório, sendo marcada pelo aparecimento dos sinais cardinais da resposta inflamatória, tais como calor, rubor, edema, dor, e pode evoluir até perda de função. A inflamação aguda vai promover a regeneração normal do tecido, com retorno da função ou formação de um tecido fibrótico. A depender da duração do estímulo, da intensidade da resposta à inflamação e ao comprometimento do sistema imune, a resposta imunológica se torna crônica, passando a assumir um caráter patológico, com presença de células como os linfócitos e macrófagos, a angiogênese e formação de tecido conjutivo (MEDZHITOV, 2008; LIN et al., 2008).

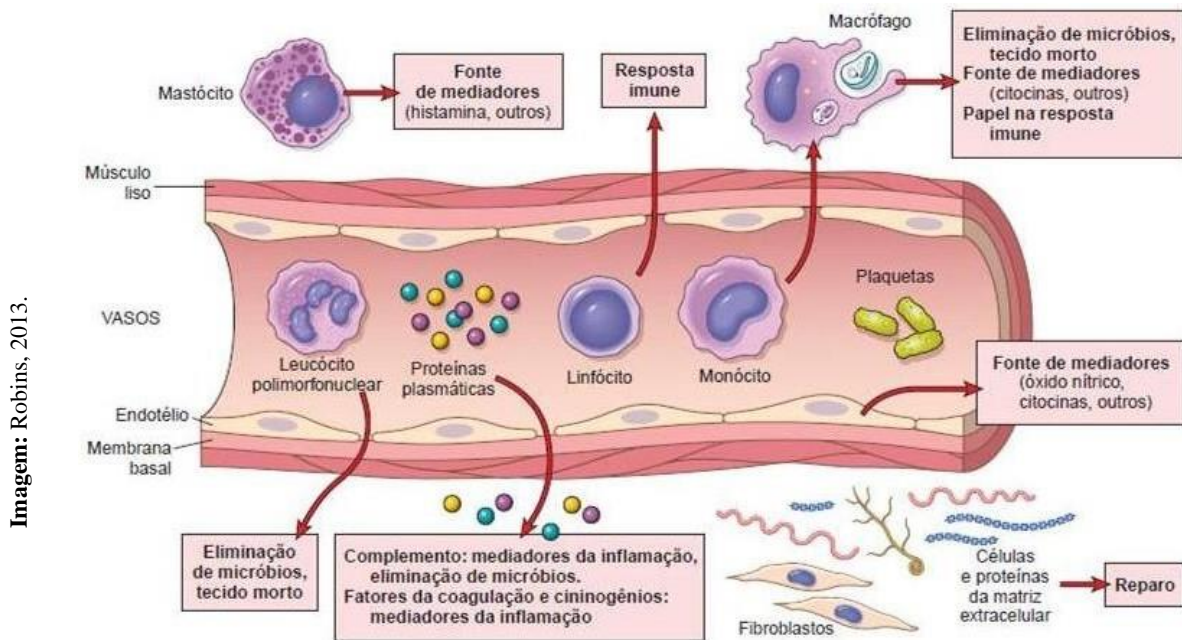


Figura 6 - Componentes das respostas inflamatórias e suas principais funções.

A defesa contra agentes infecciosos que desencadeiam o processo da resposta inflamatória, é mediada pelas reações iniciais da imunidade inata e pelas respostas tardias da imunidade adaptativa. O sistema imune inato é baseado em barreiras físicas e químicas à infecção e também nos diferentes tipos de células que reconhecem patógenos invasores e ativam respostas imunes antimicrobianas. Os mecanismos físicos e químicos de defesa são representados pela epiderme, epitélio respiratório ciliado, endotélio vascular e superfícies mucosas com secreções antimicrobianas. Os patógenos entram em contato com as primeiras células de defesa os fagócitos, células dendríticas e células *Natural Killer* (NK), as quais compõem à imunidade inata, juntamente com o sistema complemento. Ativação de células no sistema imune adaptativo é um processo ditado por múltiplos sinais da imunidade inata. Com a ativação de linfócitos de maneira antígeno-específica, diferenciando-se em células produtoras de anticorpos (linfócitos B) e células efetoras (linfócitos T) e com as células dendríticas fazendo a conexão entre a imunidade inata e adaptativa, quando se transformam em células apresentadoras de antígeno (JANEWAY et al., 2000; BASSET et al., 2003; MOGENSEN, 2009; ABBAS et al., 2015).

As respostas imunes e proliferativas são mediadas por citocinas, proteínas secretadas pelas células da imunidade inata e adaptativa em resposta a micro-organismos e outros antígenos, que medeiam a comunicação intercelular no sistema imunológico, regulando a inflamação local

e sistêmica. Elas são agrupadas em diferentes famílias como fatores de necrose tumoral (TNFs), interleucinas (IL), interferons (IFNs) e fatores estimuladores de colônias (CSFs) atuando no crescimento e a diferenciação de linfócitos, ativação de diferentes células efetoras para eliminação de antígenos e estimulando a produção de células hematopoiéticas. As células que determinam funções eficazes dos compostos do sistema imunológico, como os macrófagos e linfócitos, se destacam como as principais fontes de citocinas (HARSCH et al., 2003; DUQUE; DESCOTEAUX, 2014; ESQUIVEL-VELÁZQUEZ et al., 2015).

Cada citocina se liga a um receptor específico da superfície celular, ativando uma cascata de sinalização que medeia a função celular, em resposta a estímulos direfentes, em populações celulares distintas (células polimorfonucleares, células endoteliais e epiteliais, adipócitos e células do tecido conjuntivo), concentrações elevadas de citocinas indicam ativação das vias das citocinas associadas à inflamação ou progressão da doença, que se classificam como pró e anti-inflamatórias (THOMPSON et al., 2003; STENKEN; POSCHENRIEDER, 2015).

As células de perfil Th1 produzem IL-2, IL-6 e *IFN-γ*, que é essencial para a eliminação de patógenos, enquanto que as células de perfil Th2 secretam IL-4, -5, -10 e -13, que são cruciais para a eliminação de organismos extracelulares e a manutenção de reações alérgicas. A imunidade do tipo 1 e do tipo 2 refere-se as respostas imunes inata e adaptativa, respectivamente. As respostas do tipo 1 são definidos por células Th1 e células Th17, células T citotóxicas, grupo 1 e 3 de células linfóides inatas (ILCs), as imunoglobulinas IgM e IgA e classes específicas de anticorpos. Conferindo imunidade a muitos micro-organismos incluindo bactérias, vírus, fungos e protozoários (MELO et al., 2010; WYNN, 2017).

A imunidade do tipo 2 fornece proteção contra grandes parasitas extracelulares, aumentando as barreiras de defesas, onde as células do tipo 2 oferecem uma resposta imune que ajuda a manter a homeostase metabólica e a promover a remodelação após lesão. As respostas imunes tipo 2 são caracterizadas por linfócitos ativados CD4⁺ e CD8⁺, células Th2, ILCs do grupo 2, eosinófilos, basófilos, mastócitos, interleucina-4 (IL-4) e macrófagos ativados por IL-13, a subclasse de anticorpos IgE e as citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25 e IL-35 (WYNN, 2017).

O perfil Th17 inclui as citocinas interleucinas IL-17 (A-F) apresentando fatores de de transcrição que não se sobrepõe aos fatores necessários para as células Th1 ou Th2, sendo mais complexos pois a produção de IL-17 pode ser induzida por diferentes combinações de citocinas.

A IL-17 pode induzir a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias sozinhas ou em cooperação com outras citocinas, como o TNF- α e IL-6, relacionada com uma grande variedade de doenças autoimunes. A estimulação de IL-17 ativa as vias de sinalização NF κ B e MAPKs. As células Th17 impulsionam o recrutamento de neutrófilos e a produção de peptídeos antimicrobianos em resposta a bactérias extracelulares e fungos. Um defeito na produção de IL-17 resulta em aumento da disseminação bacteriana, correlacionando-se com mediadores inflamatórios reduzidos e recrutamento de neutrófilos deficiente (GAFFEN et al., 2014; SHAO et al., 2017; MISIAK et al., 2017).

A IL-1 β é um dos mediadores centrais da reação inflamatória, em baixa concentração, age nas células endoteliais, aumentando a expressão das moléculas de superfície que medeiam a adesão dos leucócitos. Em altas concentrações, a IL-1 β exerce efeitos endócrinos, induzindo febre e síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado. O TNF – α ativa células endoteliais e tissulares, estimulando a angiogênese, incluindo a IL-6, que atua como citocina regulatória sobre esse fator e é uma citocina produzida por células linfóides ativadas e uma variedade de células não linfóides, como macrófagos ativados, adipócitos e células musculares esqueléticas, estando envolvida na regulação da hematopoiese, respostas imunes e reações de fase aguda (Figura 7) Na imunidade inata (tipo 1), atua como estímulo para a produção de neutrófilos e de proteínas de fase aguda; e na imunidade adaptativa (tipo 2), atua na diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, sendo também fator de crescimento de plasmócitos neoplásicos, considerada assim uma citocina regulatória (MELO et al., 2010; CAMPOS, 2007).

A Interleucina 2 (IL-2) é uma citocina importante, que controla a proliferação e diferenciação de células do sistema imune. Esta citocina é produzida principalmente por linfócitos ativados CD4⁺ e CD8⁺, células dendríticas e células T reguladoras (Treg), e ativa o crescimento das células T *in vitro*. O IFN- γ , uma citocina secretada por células T ativadas do subconjunto e células NK, que regula a defesa do hospedeiro, a inflamação e autoimunidade. A IL-10 é uma citocina imunorreguladora, secretada também por macrófagos, com efeitos sobre vários tipos de células, que influenciam na resposta imune inata e adaptativa e promovem ainda a ativação e diferenciação de linfócitos T CD4⁺ em células Th17, prevenindo uma resposta inflamatória exacerbada, importante nas reações autoimunes (Figura 7) (YOON et al., 2009; MELO et al., 2011).

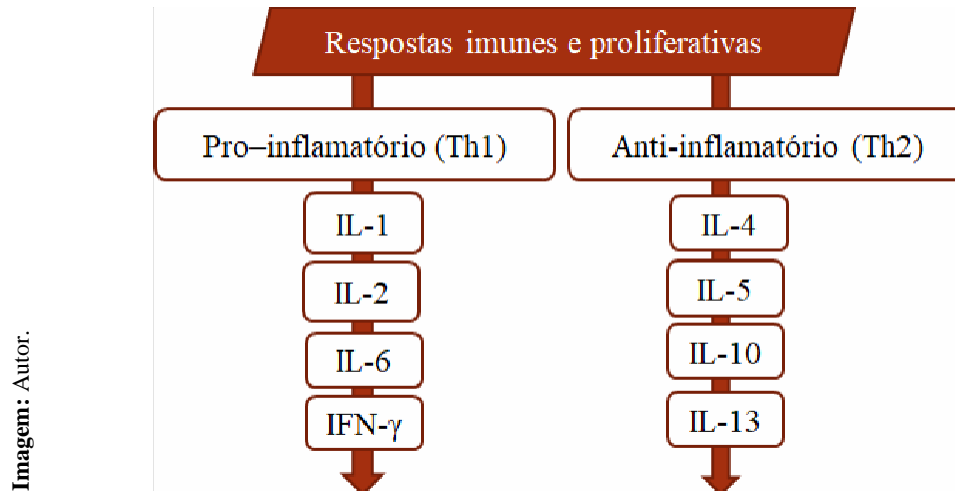


Figura 7 - Interleucinas envolvidas na resposta imune.

A produção destas citocinas pró-inflamatórias pode ser induzida pelo lipopolissacarídeo (LPS), também conhecido como endotoxina. Uma molécula tóxica derivada da membrana celular externa de bactérias gram-negativas, que desencadeia vias de sinalização intracelular através de sua ligação a receptores próprios, sendo os principais localizados na membrana celular e denominados receptores *Toll-like 4* (TLR4). Este receptor ativado desencadeia diversas vias de sinalização, como MAPK (do inglês Mitogen-Activated Protein Kinase), AP-1 (Activator Protein 1), STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) IRF3 (interferon (IFN) -regulatory factor 3). Com uma das principais vias ativadas pelo LPS é a via do fator do NFkB, um fator de transcrição central da resposta inflamatória em células imunocompetentes, tanto as periféricas como macrófagos, quanto no sistema nervoso central, como as células da glia. (RAETZ & WHITFIELD, 2002).

Através das citocinas produzidas ao decorrer do processo infeccioso, o LPS atua em receptores *Toll-like 4*, para que esses efeitos ocorram para amplificação e propagação do sinal gerado inicialmente, visto que TNF também é um regulador importante da atividade do fator de transcrição NFkB, sendo uma das primeiras citocinas produzidas durante o processo infeccioso. A ativação por estímulos inflamatórios como o TNF ou LPS culmina na repressão ou transcrição de vários genes, levando as células a um estado ativado pronto para responder a injúria e também para gerar proteínas que na fase anti-inflamatória induzem a finalização adequada do processo (RIVEST, 2003; MACHADO, 2010).

O LPS não age diretamente contra as células ou órgãos, mas através da ativação do sistema imune, com uma cascata de sinalização intracelular, especialmente através de macrófagos, que liberam uma série de mediadores pró-inflamatórios, influenciam o aumento

na produção de citocinas como TNF (fator de necrose tumoral), a IFN- γ e interleucinas (IL-6 E IL-1), incluído o óxido nítrico (NO), exercendo funções regulatórias a fim de restaurar a homeostase do tecido (ZHAO, et al., 2008).

A fagocitose desenvolvida pelos macrófagos compõe o início do conjunto das atividades biológicas de toda a resposta imunológica e da resposta inata, e é constituída pelas etapas de aderência ao substrato, quimiotaxia, ingestão de células e partículas inertes e produção radicais livres (Figura 8). Os macrófagos são extensamente distribuídos pelo organismo, apresentando uma resposta rápida e persistente no local de ação, por possuírem uma grande quantidade de receptores em que as respostas e esses estímulos podem acontecer de múltiplas maneiras diferentes, essenciais não só para a imunidade, mas também para o desenvolvimento e homeostase tecidual. Derivados de células precursoras da medula óssea que se dividem produzindo os monócitos. Estes circulam no sangue, cruzam a parede das vênulas e capilares, onde, ao penetrarem no tecido conjuntivo, adquirem característica morfológicas e funcionais de macrófagos, tendo a fagocitose como uma de suas principais funções, podendo produzir inúmeras substâncias moleculares para auxiliar na destruição do que foi fagocitado e ativar de outras células da imunidade inata e adaptativa, através da liberação de mediadores inflamatórios como as citocinas (DELVES; ROITT, 2000; STOUT; SUTTLES, 2005; GORDON, 2002).

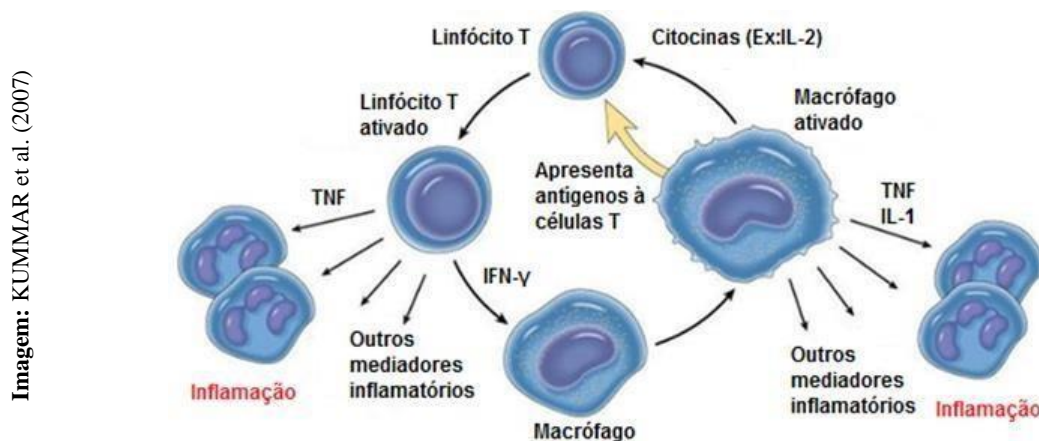


Figura 8 – Macrófagos e sua atuação na imunidade adaptativa.

Embora a fagocitose possa fornecer o estímulo inicial antigênico, a atividade dos macrófagos pode ser aumentada por citocinas secretadas por células T auxiliares, com o IFN- γ sendo um dos mais potentes ativadores de macrófagos. Como também, os macrófagos são

capazes de quimiotaxia, ou seja, o processo de ser atraído e deslocado para um determinado localização por moléculas específicas. Além da fagocitose, macrófagos desempenham um papel central na inflamação, pois apresentam ao sistema imunológico resposta contra micro-organismos, uma vez que os macrófagos são das primeiras células a entrar em contato com esses invasores. Isto é em parte devido aos seus receptores *Toll-like* e *scavenger*, que têm especificidade de se ligar a lectinas, lipoproteínas, proteínas, oligonucleotídeos, polissacarídeos e outras moléculas. Além de essas funções, macrófagos expressam maior histocompatibilidade moléculas complexas (MHC) classe II em suas membranas e também apresentam antígenos aos linfócitos. Quando os macrófagos fagocitam, seus antígenos são processados e situados a superfície externa, onde eles serão reconhecidos por células auxiliares T. Após este reconhecimento, os linfócitos T liberam citocinas que ativam linfócitos B e secretam anticorpos específicos para os antígenos apresentado pelo macrófago (SIWEKE et al., 2013; DUQUE; DESCOTEAUX, 2014).

O óxido nítrico (NO) produzido em níveis mais elevados por macrófagos, via estimulação IFN- γ , como também pelos receptores do tipo TLRs, tem atividade citotóxica contra micro-organismos, parasitas e células tumorais, exercendo uma função importante no sistema imunológico (KUMAR-ROINÉ et al., 2009). O iNOS produz uma quantidade micromolar de NO por um longo período quando induzido pela ativação de sinais como o LPS e ou citocinas. Como uma molécula reguladora, o NO presente em altas concentrações pode atuar como uma molécula citotóxica desencadeando dano tecidual, enquanto em concentrações nanomolares de NO produzidas por formas constitutivas de NO sintases, são essenciais para manter as funções celulares normais tais como atividade antimicrobiana e modulação da resposta imune, metabolismo ósseo e apoptose (MELO et al., 2011; BOGDAN, 2015).

O NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina em um processo catalisado por isoenzimas, que são globalmente denominadas NO sintases (NOS), em várias células e tecidos animais. Estas enzimas são classificadas em três tipos: NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) e NOS induzida (iNOS). A produção destas isoformas parece ser tecido-específica, produzido em grande quantidade pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em células inflamatórias ativadas, a NOS endotelial é produzida pelas células endoteliais e osteoclastos e a iNOS é identificada em fibroblastos, macrófagos e células vasculares. A presença de NO é fundamental para a cicatrização normal, uma vez que promove a síntese de colágeno e angiogênese (VITRAL, 2008).

3.3.2 Processo básico de cicatrização da ferida

A utilização de plantas e extratos vegetais com o intuito de melhorar a cicatrização, estancar hemorragias, realizar curativos e tratar feridas, é um conhecimento bem difundido entre as comunidades indígenas e diferentes grupos étnicos, preparadas na forma de pastas e cataplasmas, chás ou infusões, sua atividade cicatrizante pode ser atribuída aos compostos naturais presente nas partes utilizadas das plantas e que isolados possibilitam o estudo da sua atuação fisiopatológica (PIRIZ, 2014).

Quando um tecido é lesado, inicia-se o processo de reparo tecidual para a sua regeneração ou cicatrização. Na regeneração, a organização tecidual acontece com a substituição das células mortas ou lesadas por novas células, idênticas os originais, promovendo a restituição total e a funcionalidade do tecido. Na cicatrização, o tecido é substituído por tecido conjuntivo vascularizado, quer a lesão tenha sido traumática ou necrótica, através do processo de cicatrização, como finalidade o restabelecimento da homeostasia tecidual, sendo comum em todas as feridas. Os principais mecanismos celulares básicos para a cicatrização da ferida são a migração celular, a organização e modelagem da matriz extracelular (MEC) e o processo de proliferação celular. Esse processo é resultante das interações celulares locais que ocorrem na epiderme, na derme e na matriz extracelular, como também da resposta sistêmica regulada, incluindo a imunidade celular, a imunidade humoral e a cascata de coagulação (GURTNER, et al., 2012; OLIVEIRA, 2012).

No processo básico de cicatrização da ferida, as células chegam ao local para a liberação de mediadores da inflamação, quimiocinas, proteases e citocinas. Os macrófagos são recrutados e ativados no sítio da lesão, direcionando o desenvolvimento de tecido de granulação através dos fatores de crescimento e a citocinas, as quais irão atuar na angiogênese e ativação dos fibroblastos para formação do estroma novo e remoção da matriz provisória (BALBINO et al., 2005).

O processo de cicatrização acontece em fases: a inflamatória (1), a proliferativa (2) e a de maturação (remodelação) (3) (Figura 9). A fase inflamatória é caracterizada pelo combate aos agentes agressores, onde as plaquetas desempenham um papel fundamental estimulando a cascata de coagulação e liberam grânulos com os fatores de crescimento, mediadores de peptídeos envolvidos na proliferação celular, ciclagem celular e apoptose, que podem ter propriedades dos fatores de crescimento, estimulando a ação dos neutrófilos nas primeiras 24

horas e dos macrófagos, 48-96 horas, que migram para a ferida, antes dos fibroblastos migrarem e iniciarem a replicação (CAMPOS, 2007).

Imagem: TAZIMA et al. (2008)

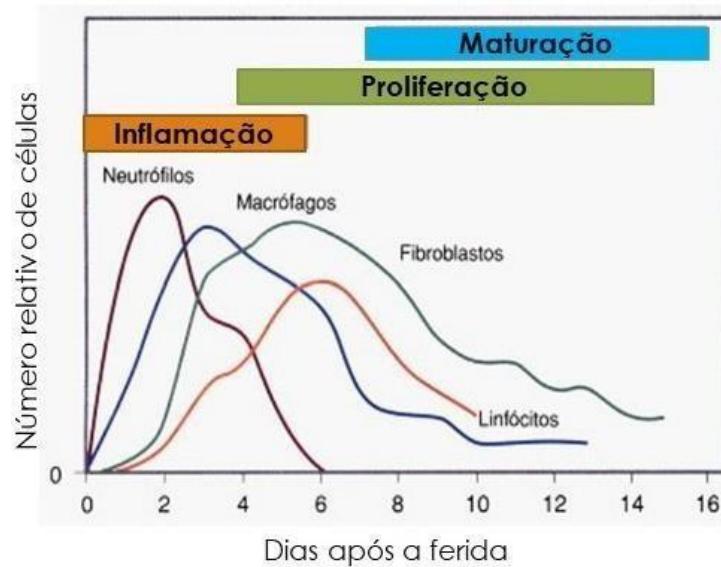


Figura 9 – Células envolvidas nas fases da cicatrização.

Após a fase inicial do processo inflamatório, a sinalização de moléculas do microambiente sobre as células endoteliais faz com que estas mudem a expressão de moléculas da superfície voltada para o leito vascular, de forma a facilitar a adesão de monócitos circulantes ao invés dos neutrófilos. Em processo semelhante, os monócitos, ao transmigrarem pelas fenestrações entre as células endoteliais, são ativados assumindo fenótipo de macrófagos derivados de monócitos e conduzidos pelas quimiocinas ao local da lesão, onde podem sofrer atuação da IL-10, mesma forma que para os neutrófilos, possui efeitos inibitórios sobre a quimiotaxia de macrófagos (RUH et al., 2013).

Na fase proliferativa (2), com a ativação de macrófagos na região lesada e a produção de fatores de crescimento específicos, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástica, ocorrendo a reconstituição dos vasos sanguíneos e linfáticos e constante migração celular, onde os fibroblastos originam tecido de granulação no local da lesão. A proliferação de fibroblastos é modulada pelos macrófagos, num complexo modelo contrarregulatório, com uma fase de retardamento, que precede a estimulação direta pelo fator de crescimento derivado do macrófago e IL-1. Os fibroblastos sintetizam proteínas de colágeno e elastina, bem como proteoglicanos e glicoproteínas que vão constituir a matriz extracelular, auxiliando na produção dos fatores de crescimento, que controlam a proliferação

e a diferenciação celular, respondendo ao estímulo dos fatores de crescimento sintetizados pelos macrófagos (GORDON, 2002; PAGANELA et al., 2009).

Uma vez restabelecidos o fluxo sanguíneo e a oxigenação, o principal fator desencadeador da angiogênese é reduzido, e os vasos neoformados começam a diminuir. A partir disso, inicia-se a fase de contração das paredes marginais da lesão, para o fechamento da ferida, realizada pelos fibroblastos ativados, os quais se diferenciam em miofibroblastos, e confere capacidade contrátil, reduzindo a área de sangramento e facilitando a epitelização (RAMALHO, 2003; PAGANELA et al., 2009).

Por último, na maturação (3), ocorre diminuição da atividade celular e do número de vasos sanguíneos, com a remodelação e reorganização do colágeno e a perda do núcleo dos fibroblastos, levando à maturação da cicatriz, em que a matriz temporária é removida, com a apoptose de fibroblastos e macrófagos e aumento do número de colágeno para a matriz definitiva, rica em colágeno tipo I a ser depositada. O conteúdo aquoso da matriz diminui, aumentando a agregação das fibras de colágeno tornando-se mais espessos e a lesão se torna mais resistente após o colágeno ter sofrido maturação para acontecer a reepitelização da ferida e seu fechamento, formando finalmente o tecido cicatricial (BALBINO et al., 2005; ROBBINS et al., 2005; DIAS e OLIVEIRA, 2012).

Considerando que há uma grande quantidade de mediadores produzidos após o desencadeamento da resposta inflamatória, o parâmetro da inflamação pesquisado neste trabalho foi através da produção de citocinas, com o modelo utilizado de macrófagos com lipopolissacarídeo (LPS) antes e após a incubação das células com compostos isolados floroglucinóis.

As substâncias isoladas das folhas de *H. brasiliiana* são floroglucinóis monoméricos prenilados/geranilados, ou seja, possuem componentes prenila ou geranila ligados diretamente ao anel aromático do THB. O fracionamento cromatográfico realizado com o extrato etanólico das folhas de *H. brasiliiana*, possibilitou o isolamento de 7 derivados monoméricos do floroglucinol, todos inéditos na literatura, isolados por Araújo, 2008. Destes, 6 são os objetos de estudo desse trabalho, os quais suas substâncias não possuem ainda atividade biológica determinada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.2 MATERIAIS

As folhas de *Harpalyce brasiliana* utilizadas no estudo, foram coletadas no município de Barbalha (CE), pelo Prof. Edilberto Rocha Silveira. A identificação botânica foi realizada no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, pelo Prof. Edson de Paula Nunes, botânico do Herbário Prisco Bezerra, onde se encontra depositada a exsicata, sob o número de registro 32525. Após o fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das folhas de *H. brasiliana*, obteve-se o isolamento de seis derivados monoméricos do floroglucinol (HBF-5, -6, -7, -8, -9, -10), inéditos, os quais suas estruturas químicas foram elucidadas por métodos físicos (ponto de fusão ou rotação óptica) e espectrométricos (Espectroscopia na região do Infravermelho, Ressonância Nuclear de H^1 e C^{13} e Espectrometria de Massa). As substâncias foram cedidas pela Prof. Dra. Renata Mendonça Araújo (Universidade Federal do Rio Grande do Norte), para a realização do estudo de suas atividades biológicas de seis delas.

4.3 CULTURA DAS CÉLULAS FIBROBLASTOS 3T3 E MACRÓFAGOS RAW 264.7 MURINOS

As células da linhagem de macrófagos RAW 264.7 (aderente imortalizada por vírus que preserva todas as características de uma célula fagocítica do sistema mononuclear) e as células da linhagem de fibroblastos de camundongos Swiss 3T3, foram utilizadas nesse estudo. Provenientes do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ) e mantidas na sala de cultura do Departamento de Antibióticos/UFPE, as linhagens foram incubadas a 37 °C em uma atmosfera de 95% de ar e 5% de CO_2 em frascos de cultura de tecido de 75 cm^2 , com meio de cultura *Dulbecco Medium Eagle Modified* (DMEM) (*Sigma*), com 10 mM de tampão HEPES, na presença de Soro Fetal Bovino a 10% e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina 1000U/ml) (*Sigma*) de acordo com instruções do BCRJ, trocado a cada três dias. As células foram tripsinizadas (tripsina 0,05% / EDTA 0,02% de Gibco, Grand Island, N.Y., EUA) e cultivadas até aproximadamente 70% de confluência, a cada 3 a 5 passagens, com concentração ajustada para 3×10^5 células/mL de meio, plaqueadas em garrafa de cultura e mantidas para condução de procedimentos experimentais.

Imagem: Autor

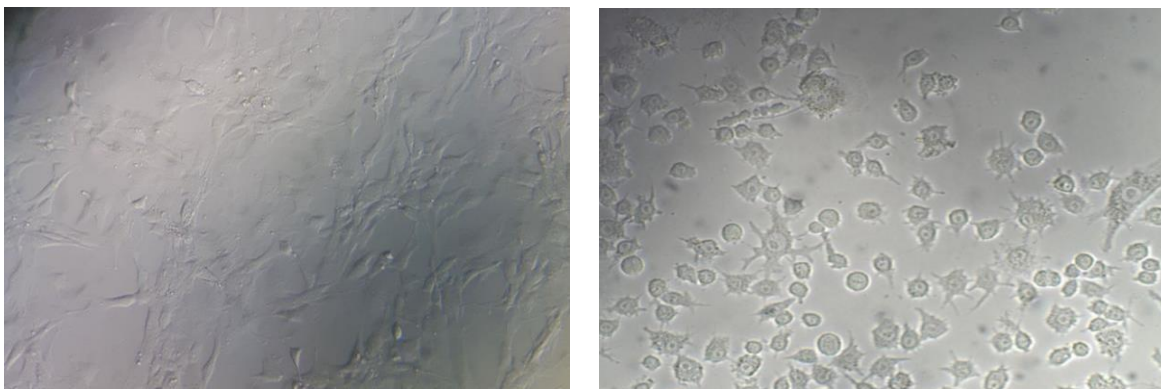


Figura 10 - Linhagem de células 3T3 / RAW 264.7

4.4 ENSAIO COM BROMETO DE 3- (4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL) - 2,5-DIFENILTETRAZÓLIO (MTT) PARA AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE EM LINHAGEM DE FIBROBLASTOS 3T3 EMACRÓFAGOS RAW 264.7

As células de fibroblastos (3T3) foram plaqueadas a uma densidade de 3×10^5 (células/mL) em uma placa de 96 poços em meio de cultura de DMEM suplementado com 10% de FBS 1% de antibiótico, e incubadas a 37°C , numa atmosfera de CO_2 a 5% humidificada. Após a incubação, de 24h para aderência das células, foram colocados 100 μL de meio DMEM, com as concentrações de 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25 e 50 μM de cada uma das 6 substâncias floroglucinóis (HBF-5, -6, -7, -8, -9, -10), realizada em triplicata, exceto no controle, no qual foi acrescentado mais 100 μl de meio DMEM. As células foram incubadas durante 24 h, 48 h e 72h a 37°C , numa atmosfera humidificada a 5% de CO_2 . Em seguida, o meio de cultura foi substituído por 90 μL de PBS juntamente com 10 μL de solução de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltétrazólio (MTT) (5 mg / mL em PBS) e incubado no escuro, durante 3 h, a 37°C , numa atmosfera de CO_2 a 5% humidificada. Posteriormente, removeu-se 100 μL do sobrenadante e adicionou-se 100 μL de DMSO a cada poço e incubou-se durante mais 10 min, a 37°C , numa atmosfera humidificada a 5% de CO_2 . Após a homogeneização dos cristais de formazan, a absorvância a 560 nm foi determinada por um leitor de placas ELISA. A porcentagem de proliferação / viabilidade celular foi calculada e comparada ao controle (100% da viabilidade). A mesma metodologia foi aplicada as células RAW 264.7, segundo Van Meerloo, Kaspers, and Cloos (2011).

4.5 ENSAIO DE MIGRAÇÃO COM FIBROBLASTOS 3T3

Para o ensaio de migração de fibroblastos 3T3, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços, com meio DMEM com soro FBS a 10%, com 1% de antibióticos penicilina/estreptomicina, L-glutamina e tampão HEPES 10 Mm (Sigma) até a aderência por 24h e depois "riscado" com uma ponta de pipeta de 100µl para produzir “feridas” entre 1200 e 1500 µm de largura. Em seguida, foi removida o sobrenadante com células soltas devido ao risco e a monocamada ferida foi lavada uma vez com PBS e logo após incubada com DMEM desprovido de soro fetal (meio incompleto, para que não interferisse na proliferação celular) e contendo os floroglucínóis (HBF-5, -6, -7, -8, -9, -10), nas concentrações de 25, 6, e 1,56 µM (concentrações estabelecidas com o ensaio de citotoxicidade com MTT), nas placas de 24 poços em duplicata, com duas “feridas” por poço e incubadas a estufa para controlar a umidade e o pH e com a temperatura a 37 ° C e durante 24 h ou até fechamento da lesão. O controle positivo utilizado foi a fitohemaglutinina (PHA). A migração de células vivas deve foi observada sob a objetiva de 4x de contraste de fase em um microscópio invertido Nikon XD – 202. As imagens foram adquiridas usando a câmera Option e analisadas no programa TCCapture imagens da câmera, para realização das medições. O controle negativo – as células foram tratadas apenas com meio DMEM incompleto e para o controle positivo + as células foram tratadas com fitohemaglutinina (5 µg/mL).

A velocidade médias de migração, deslocamento celular e taxas de confinamento (distância entre o ponto inicial e o ponto final divididos pelo comprimento total da via) foram calculadas durante o período de tempo a cada 2h. Velocidade instantânea (V_{inst}) é definida como a velocidade de uma célula durante observação a cada período de 2 horas.

$$Taxa\ de\ migração\ (\%) = \frac{\text{distância da ferida (0h)} - \text{distância da ferida (12h)}}{\text{distância da ferida (0h)}} \times 100$$

Segundo (Acharya et al. 2008).

4.6 ESTÍMULO A PRODUÇÃO DE CITOCINAS E NO COM LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) EM MACRÓFAGOS 264.7.

As células RAW 264.7 (3×10^5 /mL) plaqueadas em placas de 96 poços foram estimuladas com LPS (5µg/poço) por um período de 1 h de exposição. Posteriormente,

incubadas com os floroglucínóis (HBF-5, -6, -7, -8, -9, -10), nas concentrações de 1,56, 6,25 e 25 μM (escolhidas a partir do resultado de citotoxicidade) em triplicata, durante 24 h. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -70°C para determinação de citocinas e nitrito residual. Dexametasona (DEX, $10\mu\text{g}/\text{mL}$) e L-NAME ($25\mu\text{g}/\text{mL}$), e o LPS ($5\mu\text{g}/\text{mL}$) foram utilizados como controle positivo e negativos, a fim de inibir e estimular citocinas, respectivamente, segundo Lee (2017).

4.7 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EM MACRÓFAGOS MURINOS

As células RAW 264.7 (3×10^5 células/mL) foram plaqueadas em placa de 96 poços com meio DMEM (Sigma) completo e incubadas até atingir a confluência para a dosagem de produção de NO. Sendo estimuladas com LPS (*Escherichia coli* 055: B5; Sigma, St. Louis, MO, USA) por 1 h ($5\mu\text{g}/\text{mL}$) e depois tratadas com os floroglucínóis (HBF-5, -6, -7, -8, -9, -10) por 24 h nas concentrações de 1,56, 6,25 e 25 μM , em triplicata de poços. Decorrida as 24 horas, recolheu-se 100 μl de sobrenadante celular e foram misturados ao mesmo volume de reagente de Griess (100 μl) (1% sulfanilamida em ácido fosfórico 5% e 0,1 % de diidrocloreto de naftiletilediamina em água; 1:1, Sigma) e incubadas durante 10 min ao escuro. A concentração de nitrito foi calculada com referência a uma curva padrão obtida usando NaNO_2 , utilizando-se uma diluição seriada 100 – 0 μM da solução padrão de nitrito de sódio preparada em DMEM. A absorbância foi medida em 540 nm utilizando um leitor de placas de Elisa Spectra Softmax, segundo CAO et al. (2018)

4.8 DOSAGEM DE CITOCINAS EM CÉLULAS RAW 264.7

A dosagem de citocinas de perfil Th1 e Th2 foi determinada através da técnica de Cytometric Bead Array System – CBA, do kit para dosagem nos sobrenadantes da cultura das células da BD Bioscience. A CBA foi utilizada para a mensuração quantitativa das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-4, IL-10 e IL-17, conforme recomendado pelo fabricante em amostras de sobrenadante de culturas submetidas aos estímulos dos floroglucínóis. A técnica emprega uma mistura de 5 esferas de poliestireno, com diferentes intensidades de fluorescência, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas em camundongos, detectadas no canal FL-2. Desta forma, 50 μl da mistura de esferas de captura (o mixer de citocinas), marcadas com os anticorpos anti-TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-4, IL-10 e IL-17 são adicionadas em cada tubo

de ensaio para citômetro. Em seguida, foram adicionados aos tubos 50 µl do sobrenadante das células 264.7 que estavam armazenadas a - 70 °C, tratadas com os floroglucínóis (HBF-5, -6, -7, -8, -9, -10) e do reagente *Mice Chemokine PE Detection* em todos os tubos. Após essa etapa, as amostras foram incubadas por 3 h à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, 1 ml da solução tampão (*Wash Buffer*) foi adicionado a cada tubo e os tubos centrifugados a 200 G por 5 min. Cuidadosamente, o sobrenadante foi descartado, restando aproximadamente 100 µl em cada tubo, onde foram adicionados 300 µl de solução tampão (*Wash Buffer*) para ressuspender as esferas e realizar as leituras das amostras no Citômetro de fluxo FACSCalibur - E20200030, no software Cell QuestPro (BecktonDickson BD®) e os dados analisados no programa Fcap array 3.0.1

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando o ANOVA, seguido com pós-teste (Bonferroni). Os valores foram expressos como média ± desvio padrão (d.p.) e o nível de significância mínimo foi de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Todos os resultados foram analisados com software GraphPad Prisma (7.0 San Diego, CA, EUA), que considerou o média de dois ensaios realizados em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o perfil anti-inflamatório e cicatrizante promovido pelos floroglucinóis isolados de *H. brasiliiana*, em ensaios pré-clínicos (*in vitro*), utilizando as linhagens de células murinas RAW 264.7 (macrófagos) e 3T3 (fibroblastos).

5.1 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DOS SEIS DERIVADOS MONOMÉRICOS DO FLOROGLUCINOL EM FIBROBLASTOS E MACRÓFAGOS.

Todos os compostos foram avaliados nas concentrações de 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25 e 50 μ M em 3 tempos (24, 48 e 72h), frente as duas linhagens celulares.

5.1.2 Fibroblastos tratados com os floroglucinóis

O efeito do floroglucinol HBF-5 sobre a viabilidade celular foi avaliado na linhagem celular de fibroblastos 3T3, em diferentes concentrações 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25 e 50 μ M após 24h, 48h e 72h através do ensaio com o MTT. Após 24h de tratamento com o HBF-5 a concentração de 50 μ M, reduziu a viabilidade celular a 64%. No tempo de 48h, as concentrações de 6,25, 12,5, 25 e 50 μ M também apresentaram redução da viabilidade a 65%, 63%, 60% e 72%, respectivamente, mas em 72h, as concentrações de 25 e 50 μ M do HBF-5 conseguiram promover a proliferação dos fibroblastos com um aumento de 24%, ambas, em relação ao controle (100%). Em todos os tempos avaliado nenhuma concentração do floroglucinol chegou a reduzir 50% da viabilidade celular, apresentando um efeito proliferativo significativo em 72h (Figura 11).

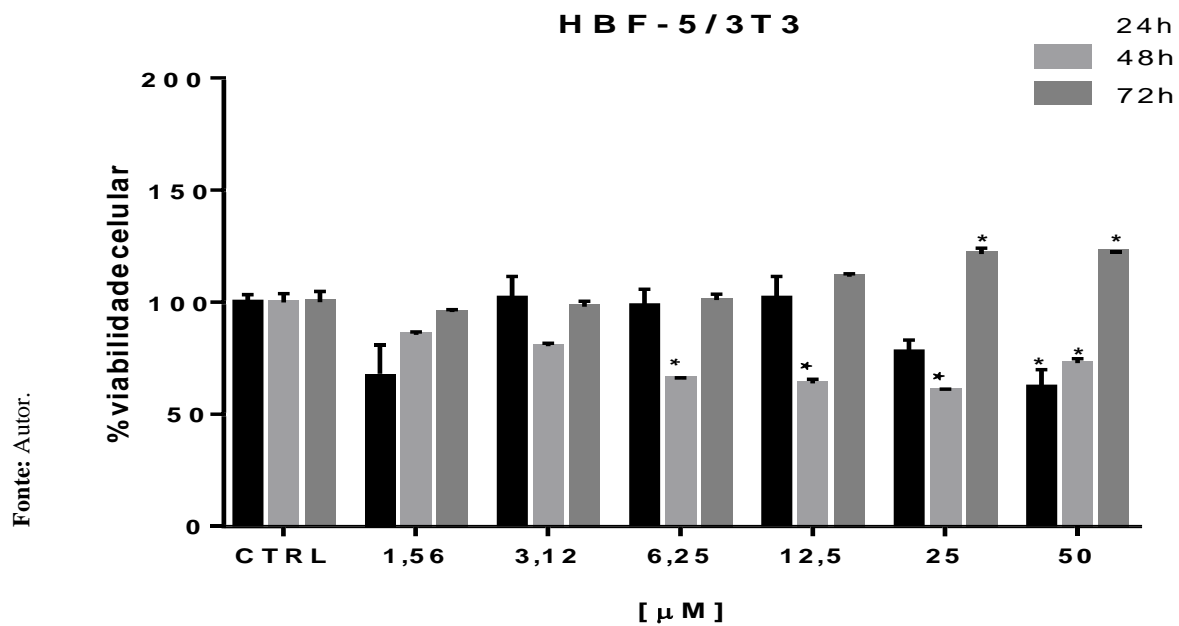


Figura 11 - Porcentagem de viabilidade das células de fibroblastos 3T3 tratadas com o HBF-5 após 24h, 48h e 72h. *indica $p < 0,05$ com relação ao controle (100% de células viáveis).

A avaliação sobre o efeito do floroglucinol HBF-6 promovido sobre as células 3T3, no período de 24h, 48h e 72h se destaca na concentração de 50µM que reduziu a 50% a viabilidade celular (Figura 12).

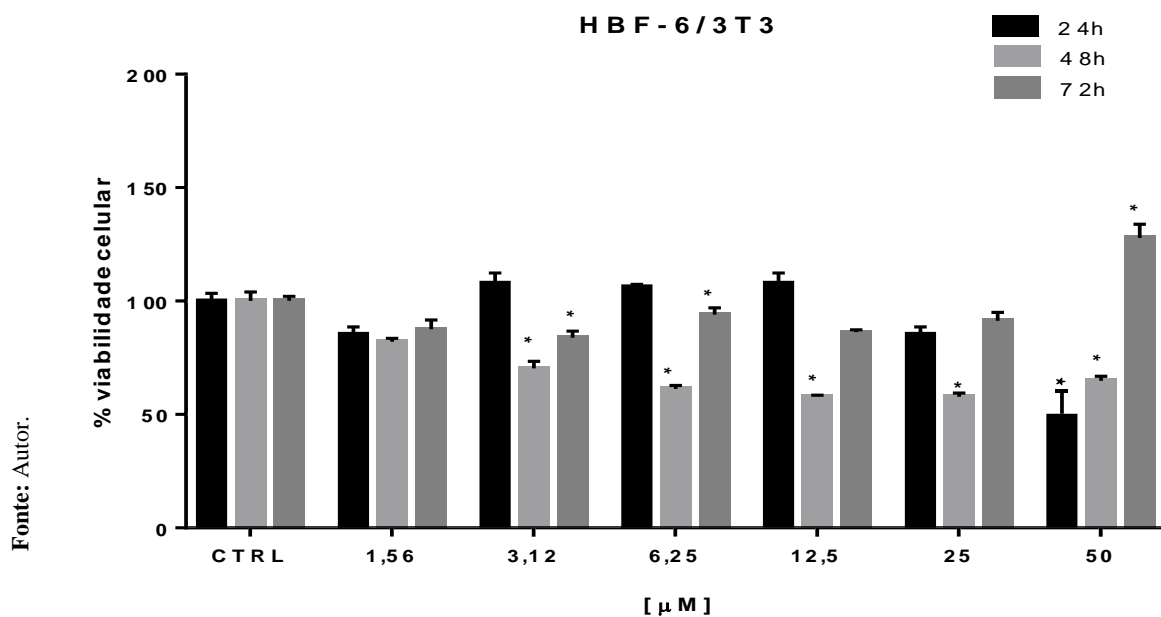
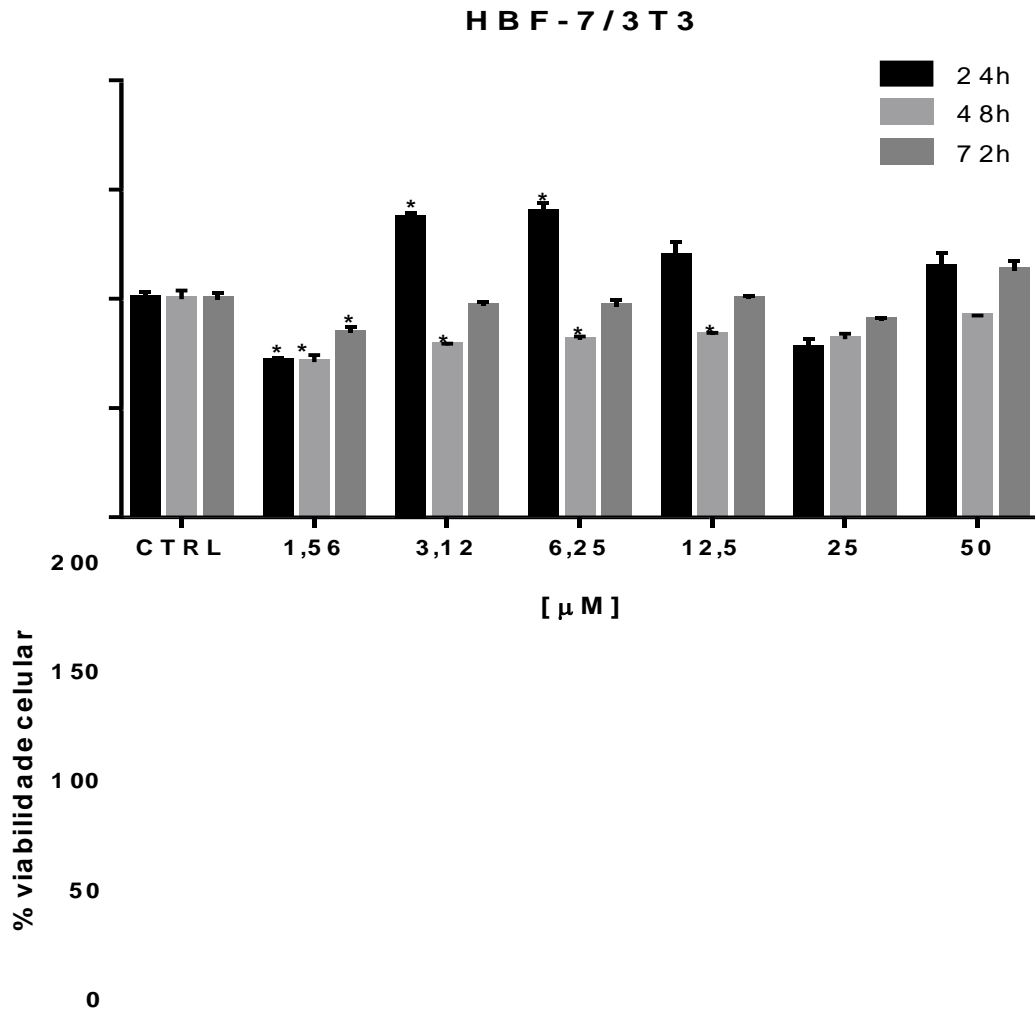


Fig. 12 Porcentagem de viabilidade das células de fibroblastos 3T3 tratadas com o HBF-6 após 24h, 48h e 72h.

*indica $p < 0,05$ com relação ao controle (100% de células viáveis).

Após 24h e 48h de tratamento, a concentração de 1,56 μ M do floroglucinol HBF-7 reduziu a 71% a viabilidade celular, no tempo de 72h 84%. Em 24h, as concentrações de 3,12 e 6,25 μ M se comportou como proliferativa as células, indicando 137% e 139% (Figura 13).



Fonte: Autor.

Figura 13 - Porcentagem de viabilidade das células de fibroblastos 3T3 tratadas com o HBF-7 após 24h, 48h e 72h. *indica $p < 0,05$ com relação ao controle (100% de células viáveis).

Em 48h de tratamento com o HBF-8, todas as concentrações promoveram redução celular de modo significativo, onde a 1,56 μ M reduziu a 65%; 3,12 μ M a 71%; 6,25 μ M a 74%; 12,5 μ M a 63%; 25 μ M a 64% e na concentração de 50 μ M a 68%, indicando que o aumento da concentração do composto não é proporcional a sua taxa de redução de viabilidade (Figura 14).

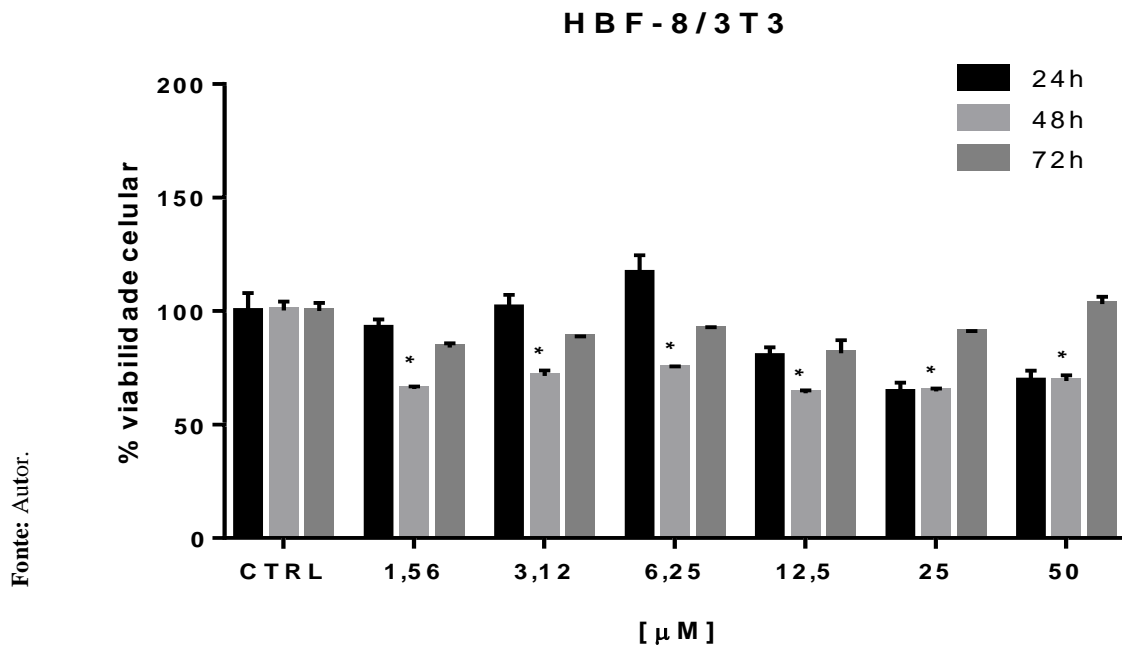


Figura 14 - Porcentagem de viabilidade das células de fibroblastos 3T3 tratadas com o HBF-8 após 24h, 48h e 72h. *indica $p < 0,05$ com relação ao controle (100% de células viáveis).

Após 24h de tratamento com o floroglucinol HBF-9 na concentração de 50µM, a viabilidade celular chegou a 63% em relação ao controle. Em 48h de tratamento com o HBF-9, as concentrações 1,56, 3,12, 6,25 e 12µM apresentaram redução a 69%, 72%, 68% e 73% de viabilidade celular, respectivamente. Dessas concentrações, a de 1,56, 3,12 e 6,25µM continuaram a apresentar redução significativa dos fibroblastos, ao final das 72h, chegando a 86%, 86% e 81%, respectivamente (Figura 15).

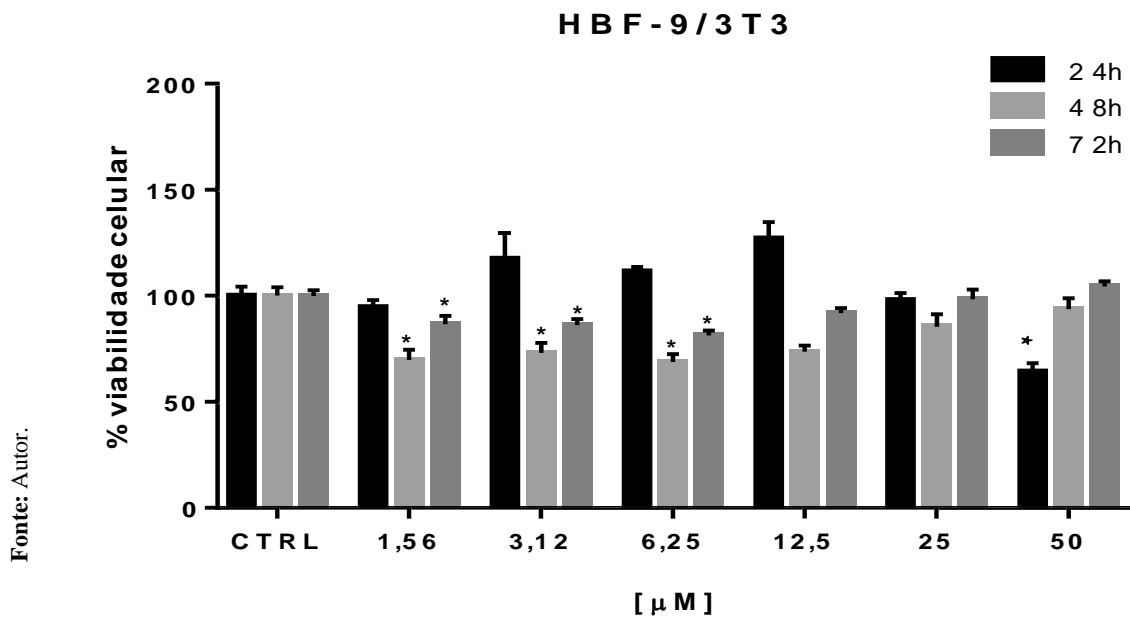


Figura 15 - Porcentagem de viabilidade das células de fibroblastos 3T3 tratadas com o HBF-9 após 24h, 48h e 72h. *indica $p < 0,05$ com relação ao controle (100% de células viáveis).

Ao decorrer dos tempos de tratamento de 24h, 48h e 72h, o floroglucinol HBF-10 reduziu significativamente a viabilidade celular dos fibroblastos na concentração de 50µM. Nas 24h de incubação, a viabilidade chegou a 38%. Em 48h chegou a 57% e em 72h a 68%. Essa ação antiproliferativa elimina o uso do HBF-10 a concentração de 50µM nos testes seguintes. O HBF-10 a concentração de 3,12µM proporcionou a proliferação celular a 136%, em relação ao controle, no período de 24h, não apresentando ação significativa nos outros tempos do ensaio (Figura 16).

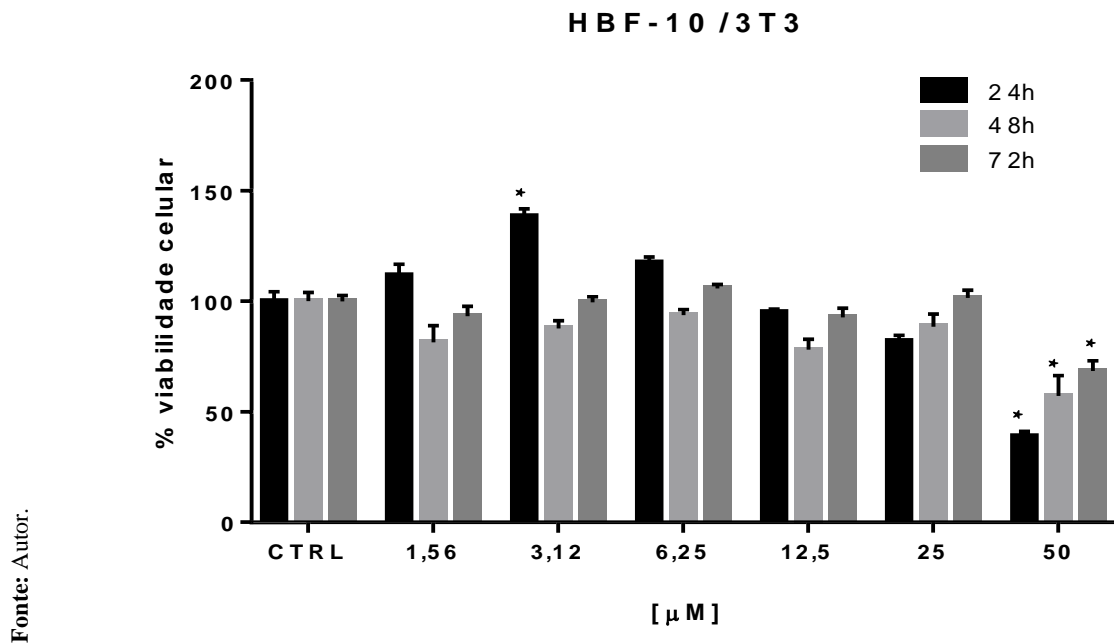


Figura 16 - Porcentagem de viabilidade das células de fibroblastos 3T3 tratadas com o HBF-10 após 24h, 48h e 72h. *indica $p < 0,05$ com relação ao controle (100% de células viáveis).

5.1.3 Células RAW 264.7 tratadas com os floroglucinóis

O efeito do floroglucinol HBF-5 para avaliação da viabilidade celular na linhagem de macrófagos RAW 264.7, foi testado em diferentes concentrações 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25 e 50µM após 24h, 48h e 72h utilizando o ensaio com o MTT. Ao final das 72h de experimentação, apenas a concentração de 50µM apresentou estatística significativa, reduzindo a 63% a viabilidade celular (Figura 17).

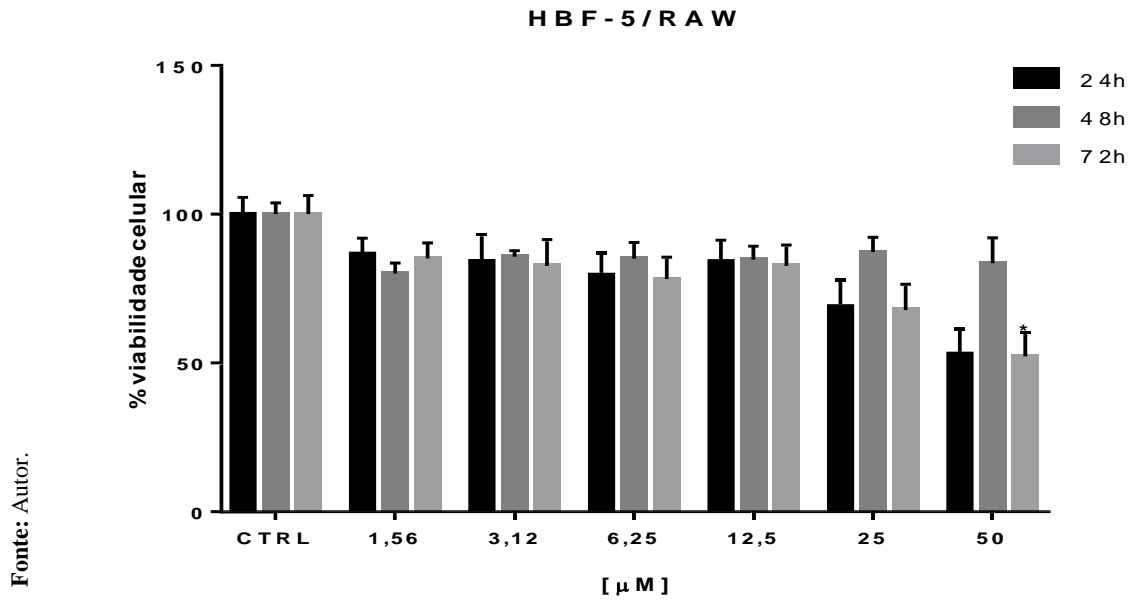


Figura 17 - Porcentagem de viabilidade das células RAW 264.7 tratadas com o HBF-5 após 24h, 48h e 72h. *indica $p < 0,05$ com relação ao controle (100% de células viáveis).

A concentração de $50\mu\text{M}$, ao tempo de 48h com o floroglucinol HBF-6 em tratamento, reduziu a viabilidade celular a 70%. Assim como no composto HBF-5, a maior dose apresentou resultado significativo, as demais não interferiram na viabilidade das células (Figura 18).

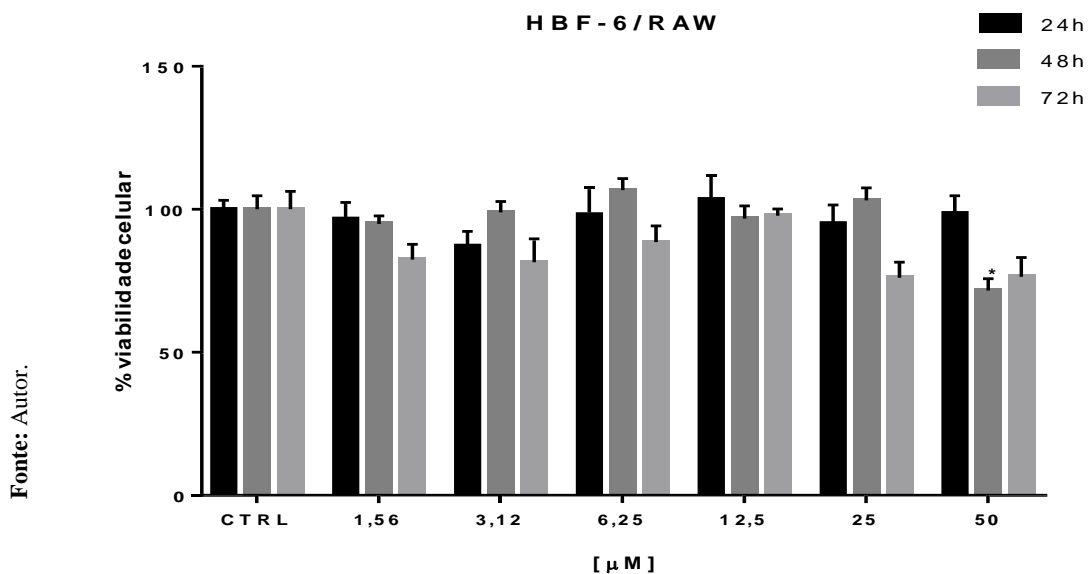


Figura 18 - Porcentagem de viabilidade das células RAW 264.7 tratadas com o HBF-6 após 24h, 48h e 72h. *indica $p < 0,05$ com relação ao controle (100% de células viáveis).

Avaliação da citotoxicidade do floroglucinol HBF-7 em comparação as concentrações usadas e tempos tratados, apresentou significância a partir das 48h, na concentração de 6,25 μM inibiu a 77% e em 50 μM a viabilidade foi reduzida a 80% (Figura 19).

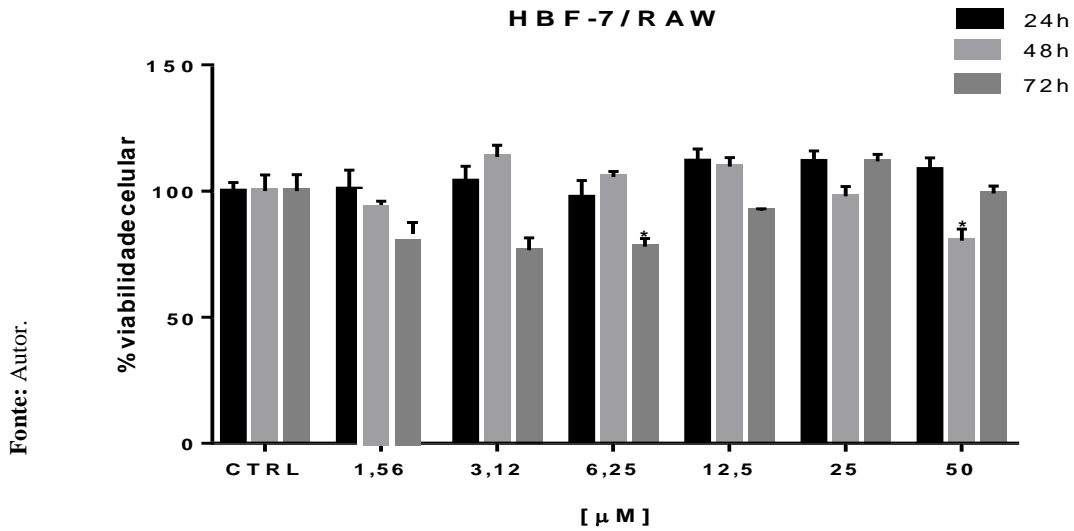


Figura 19 - Porcentagem de viabilidade das células RAW 264.7 tratadas com o HBF-7 após 24h, 48h e 72h. *indica $p < 0,05$ com relação ao controle (100% de células viáveis).

No tratamento com o floroglucinol HBF-8 para avaliação de citotoxicidade, apenas a concentração de 12,5 μM da substância apresentou potencial proliferativo para 120%, comparado ao controle. As demais concentrações não apresentaram resultados significativos para viabilidade ou proliferação (Figura 20).

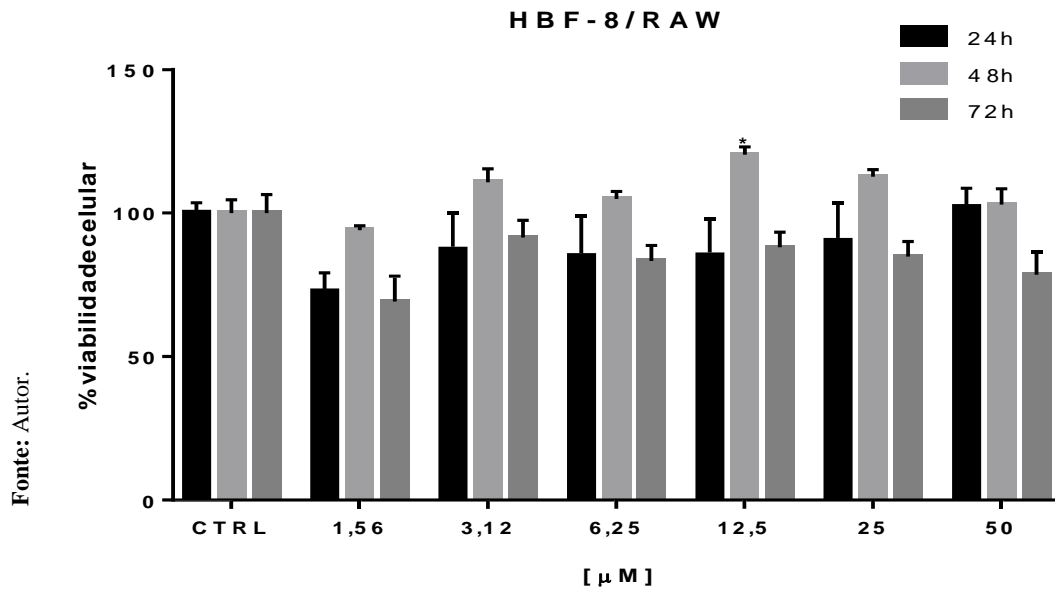


Figura 20 - Porcentagem de viabilidade das células RAW 264.7 tratadas com o HBF-8 após 24h, 48h e 72h. *indica $p < 0,05$ com relação ao controle (100% de células viáveis).

Nos três tempos de tratamento nas células RAW 264.7, nenhuma das concentrações teste do floroglucinol HBF-9 se apresentaram citotóxica ou promoveram a proliferação celular (Figura 21).

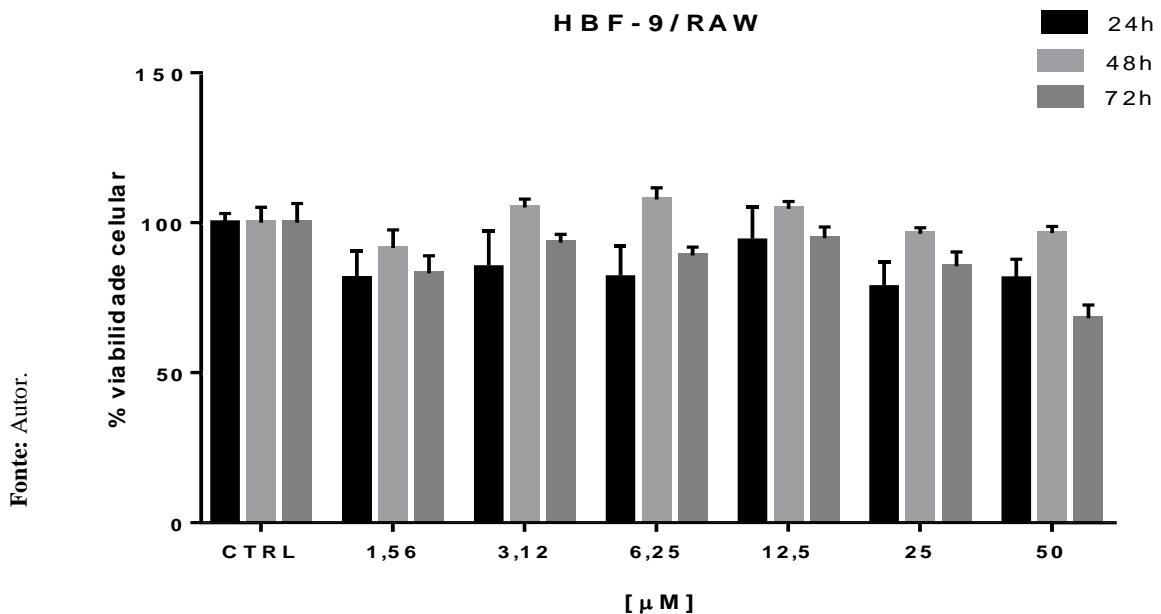


Figura 21 - Porcentagem de viabilidade das células RAW 264.7 tratadas com o HBF-9 após 24h, 48h e 72h. *indica $p < 0,05$ com relação ao controle (100% de células viáveis).

Após 48h de avaliação do efeito do HBF-10 nas células RAW a concentração de 3,12 μ M foi capaz de promover a proliferação celular a 115% e comparação ao controle (100%). O floroglucinol HBF-10 não reduziu a viabilidade celular nas demais concentrações nos tempos de tratamento submetidos ao teste. E os 6 floroglucinóis (HBF-5, -6, -7, -8, -9, -10), em sua maioria, não apresentaram efeitos citotóxicos na linhagem de RAW 264.7 (Figura 22).

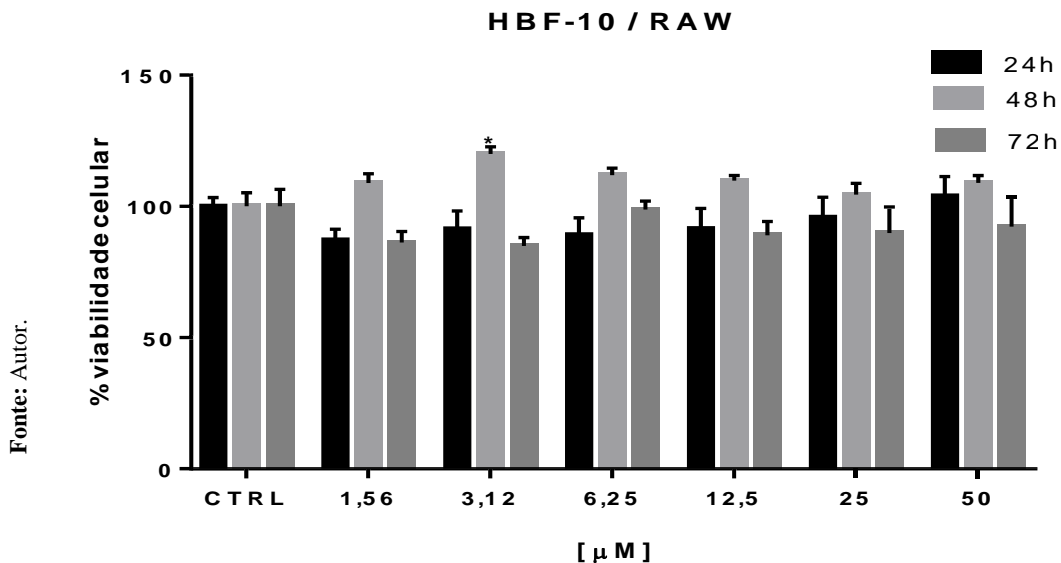


Figura 22 - Porcentagem de viabilidade das células RAW 264.7 tratadas com o HBF-10 após 24h, 48h e 72h. *indica $p < 0,05$ com relação ao controle (100% de células viáveis).

Os ensaios com o MTT realizados na linhagem 3T3 apresentou resultados mais significativos, quando comparado aos resultados da linhagem RAW 264.7. O floroglucinol HBF-10 apresentou citotoxicidade na maior concentração, 50 μ M, que se manteve nos outros tempos de avaliação e permitem descartar essa dose nos próximos testes com as células 3T3. Esses resultados do tempo de 24h são os que mais colaboram ao estudo com as células 3T3, pois para realização do ensaio de migração celular acompanha o fechamento da lesão em 24h, no processo de cicatrização *in vitro* com os fibroblastos. No estudo realizado por Bridi et al. (2016), quatro acilfloroglucinóis diméricos e três floroglucinóis benzopiranos isolados de cinco espécies de *Hypericum*, tiveram sua viabilidade celular também avaliada pelo ensaio com o MTT em linhagem de células HaCaT e de fibroblastos 3T3 tratadas com cinco diferentes concentrações 1, 5, 10, 15 e 20 μ g / mL, também em um período de 24h. Onde os floroglucinóis

apresentaram sinais citotóxicos nas concentrações acima 15 µg/mL apenas nas células de HaCaT e não nos fibroblastos 3T3. Bem como os 6 floroglucinóis desse estudo.

O ensaio de viabilidade celular foi realizado para analisar o tratamento com as substâncias floroglucinóis frente as linhagens celulares e determinar os valores de viabilidade/citotoxicidade com o MTT dessas células em diferentes concentrações do mesmo, possibilitando a escolha das melhores concentrações para o prosseguir com os demais estudos *in vitro*. Apresentando margem significativa para escolha de qualquer uma das concentrações entre 1-50µM de uso dos floroglucinóis HBF-5, -6, -7, -8, -9, -10 em fibroblastos 3T3 e RAW 264.7.

No teste de metabolização do MTT com o floroglucinol 2,7"-floroglucinol-6,6'-bieckol, um florotanino isolado da alga marrom *Ecklonia cava*, em linhagem celular de INS-1 (pâncreas) a viabilidade dessas células sob condições de glicose, com e sem a adição posterior de 2,7 " - floroglucinol-6,6'-bieckol foram a validadas e os resultados obtidos por Lee et al. (2018), a viabilidade dessas células se recuperou após o tratamento com 2,7 " -floroglucinol-6,6'-bieckol. O autor atribuiu a esses resultados que o 2,7 " -floroglucinol-6,6'-bieckol aumentou viabilidade em células INS-1 danificadas pelo tratamento com altos níveis de glicose, não sendo citotóxico, bem como os floroglucinóis HBF-5, -6, -7, -8, -9, -10 testados.

Estudo realizado com o derivado de floroglucinol, o hiperfoliatina do tipo florotanino foi isolado de algas marrom por Kumar et al. (2014) e associado a um encapsulamento de biopolímeros de amido, para ação contra a linhagem de células de câncer de mama (MDA-MB-231). A citotoxicidade, foi avaliada através do ensaio de MTT e confirmou que as células MDA-MB-231 são altamente suscetíveis ao tratamento com biopolímero. O autor realizou o ensaio com o MTT também para o floroglucinol livre, sem estar associado ao encapsulado do biopolímero e o mesmo não apresentou nenhuma citotoxicidade com as linhagens de células de câncer de mama de estudo em contato com o floroglucinol isolado.

A partir dos resultados obtidos com o ensaio citotoxicidade celular das linhagens de fibroblastos 3T3 e RAW 264.7 nesse estudo, os resultados contribuiram aos estudos anteriores em que floroglucinóis não foram citotóxicos frente a linhagens de fibroblastos. Para dar continuidade as metodologias *in vitro*, foram escolhidas as concentrações de 1,56, 6,25 e 25 µM dos compostos floroglucinóis HBF-5, -6, -7, -8, -9, -10 pois apresentam um valor intermediário entre as concentrações testadas com viabilidade celular para serem trabalhadas.

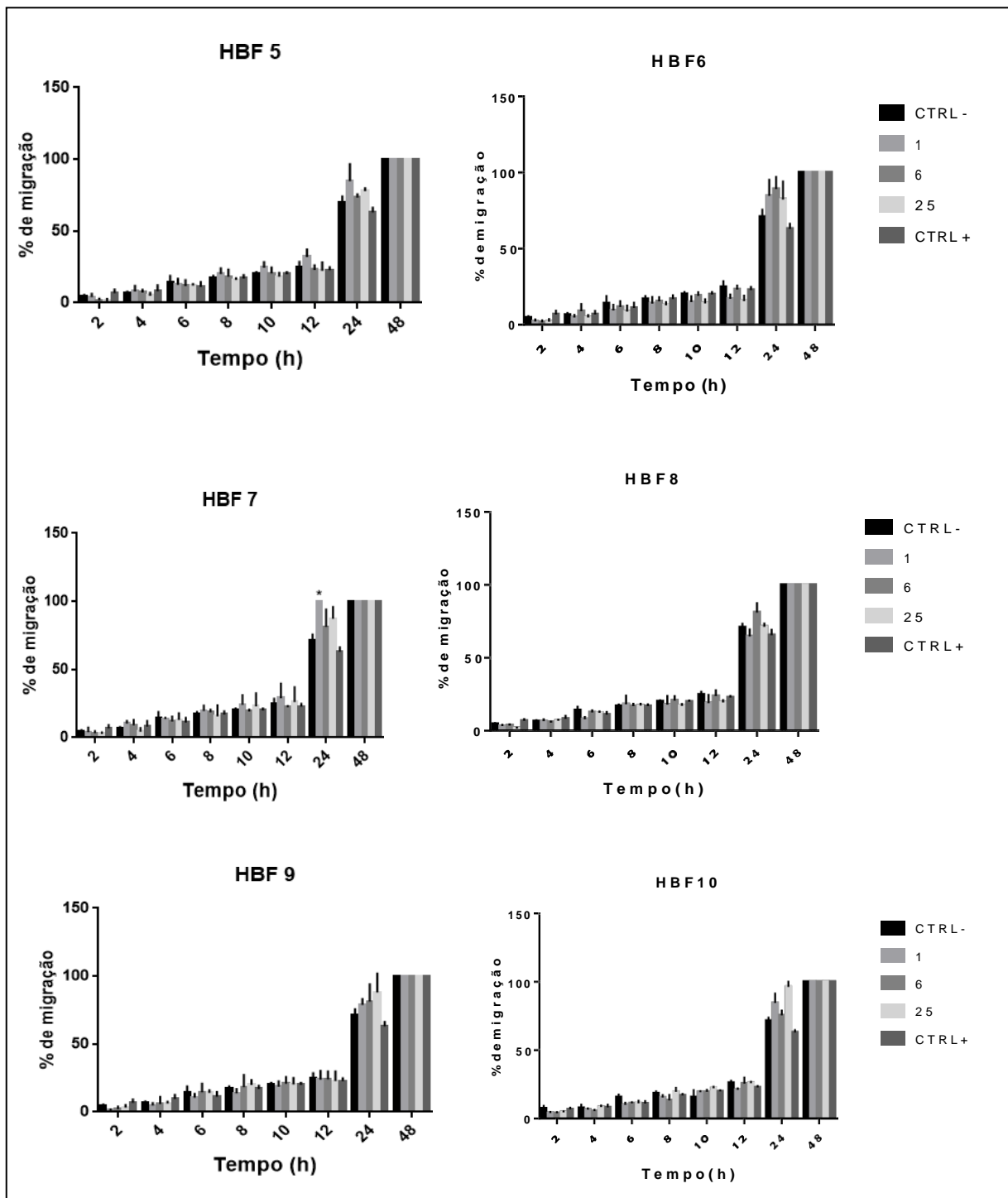
5.2 ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO *IN VITRO* EM FIBROBLASTOS 3T3

Nesse estudo, os floroglucinois HBF-5, -6, -7, -8, -9, -10 foram avaliados para a proliferação de fibroblastos 3T3 no ensaio de cicatrização *in vitro*. Tratados com três diferentes concentrações (1,56, 6,25 e 25 μ M) para elucidar o tempo de fechamento da lesão a proliferação celular e migração de fibroblastos foi fotografada de 2 em 2h, até o fechamento da ferida.

As células 3T3 têm uma taxa de migração rápida, às 24h os riscos estavam quase que totalmente fechados dificultando analisar as imagens. A concentração de 1,56 μ M do HBF-7 contribuiu para o fechamento da lesão, em comparação ao controle negativo, tratado apenas com meio DMEM incompleto (sem soro fetal) (Figura 23). Os fibroblastos 3T3 tratados com os demais floroglucinóis HBF- 5, -6, -8, -9 e -10 não apresentaram a medida de fechamento total da lesão ao final das 24h, em comparação ao controle negativo. O controle positivo foi tratado com a fitohemaglutina (5 μ g/mL), isolada de uma variedade do *Phaseolus vulgaris*, que apresenta uma excelente atividade mitogênica na diferenciação básica e consequente mitose celular, empregada nas técnicas *in vitro* para avaliação da proliferação celular.

Derivados de floroglucinol são prevalentes nas famílias *Myrtaceae*, *Guttiferae*, *Euphorbiaceae* têm mostraram vários efeitos biológicos atraentes, como as atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antiproliferativas e antiviral (RIVIERE et al., 2010; LI et al., 2016; HU et al., 2016) e relatados por Araújo (2008) pela primeira vez na família *Fabaceae*.

Quando “feridas”, as monocamadas de células 3T3 respondem a perda do contato célula-célula, aumentando a concentração de fatores de crescimento e citocinas na ferida, iniciando assim a proliferação e migração de diferentes tipos de células, como queratinócitos e fibroblastos (JANIS; HARISON, 2014). Nesse estudo, a fitohemaglutina empregada como agente estimulante *in vitro* ao final das 24h havia fechado 70% da “ferida”, frente à concentração de 1,56 μ M do floroglucinol HBF-7, que fechou 100% dos riscos (Figura 24).



Fonte: Autor.

Figura 23 – Taxa de migração de células (%) fibroblastos 3T3 murinos tratados com os compostos florglucínóis HBF-5, HBF-6, HBF-7, HBF-8, HBF-9 e HBF- 10, determinado pela velocidade de fechamento da ferida. O controle negativo os fibroblastos foram tratados com o meio DMEM incompleto e o controle positivo com fitohemaglutinina (5 µg/mL).

A cicatrização de feridas envolve processo de inflamação e a formação e remodelação de novo tecido, secretando um número de fatores de crescimento e citocinas para migração de queratinócitos da epiderme lesada e folículos pilosos, seguidos de proliferação de células na borda da ferida para formação do tecido novo. A rediferenciação de queratinócitos ocorre para

restaurar a barreira função. Além disso, os fibroblastos são importantes no reparo da derme lesionada e migração para a região da ferida, sintetizando uma nova matriz extracelular (MEC). (FRONZA, et al., 2009).

Frações enriquecidas com 7 floroglucínóis (PFE) de cinco espécies de *Hypericum carinatum* foram estudadas por Bridi et al. (2016) no ensaio *in vitro* de migração celular com fibroblastos 3T3. Nas quais, na ausência de mitomicina C, houve um aumento no fechamento da ferida quando tratado com *H. carinatum* PFE nas concentrações de 10 e 15 µg/ml. Entretanto, esse efeito não foi observado na presença de mitomicina C, indicando que a estimulação do fechamento da ferida mediada por *H. carinatum*, PEF ocorreu apenas sob a influência de um aumento na proliferação celular, sem afetar a migração celular.

Nos estudos de Dikmen et al., (2011), os resultados indicaram que duas subspécies de *Hypericum perforatum* (HPP e HPV) têm diferentes perfis de cicatrização de feridas como resultado da migração de fibroblastos e estimulação de síntese de colágeno. A atividade de cicatrização de feridas causou um aumento na porcentagem de fibroblastos poligonais e no número de grânulos de colágeno em fibroblastos. As porcentagens de células poligonais foram encontradas aumentadas significativamente com ambos extratos em concentrações de 1, 10 e 50 µg/mL. Além disso, os números de fibras de colágeno exibiram aumentos significativos nas mesmas concentrações de HPV, atividade relacionada pelo autor ao teor de floroglucínóis encontrados nas espécies estudadas.

A cicatrização de feridas pode ser prejudicada por respostas inflamatórias e imunes descontroladas, infecção microbiana e produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) (GURTNER et al., 2008). O estudo com os seis floroglucínóis monoméricos (HBF-5, -6, -7, -8, -9, -10) também mostram que os floroglucínóis não atuam acelerando a taxa de migração, mas podem ser capazes de atuar no aumento da proliferação celular, como o HBF-7 em sua concentração de 1,56 µM.

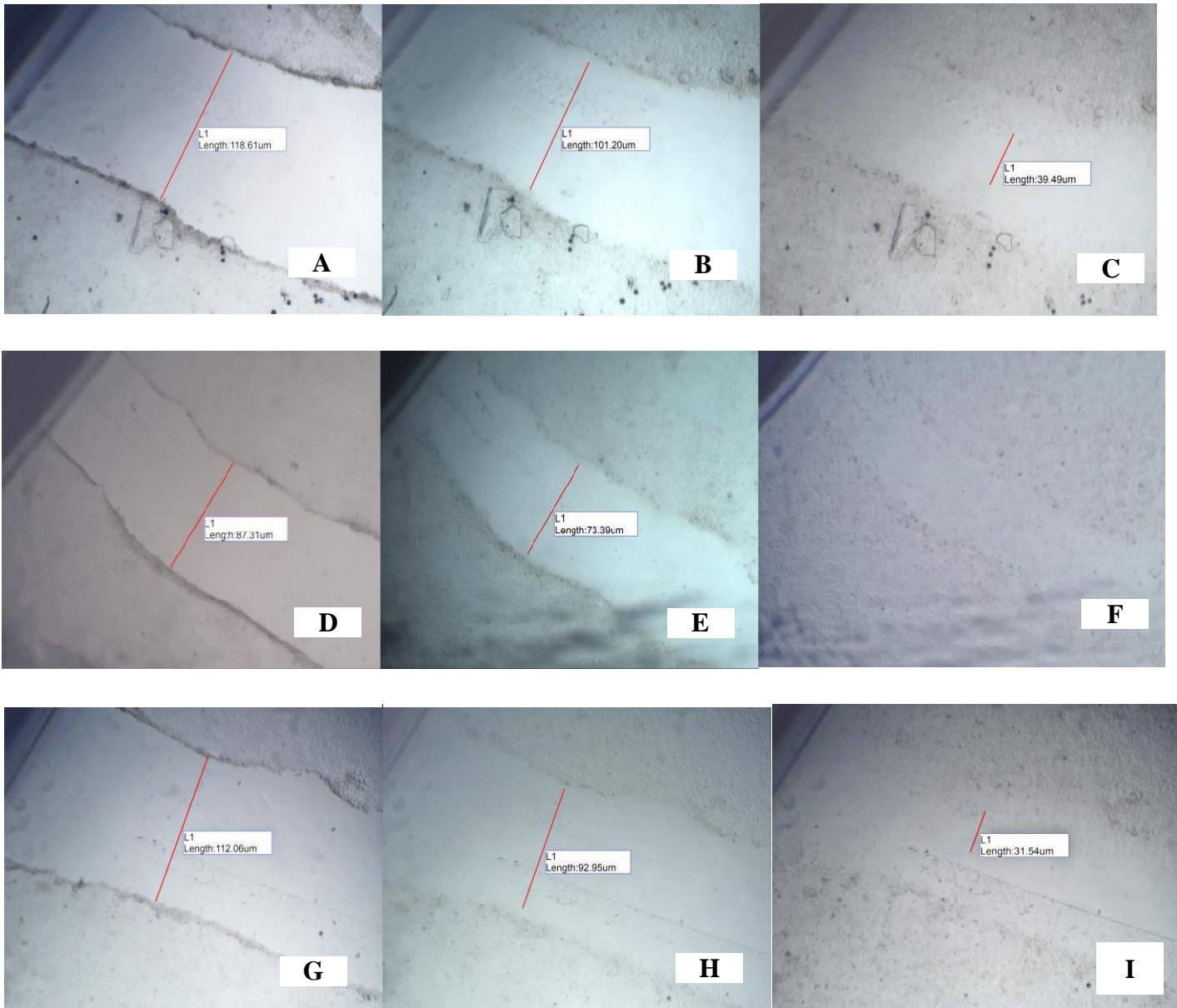


Figura 24 - Fotos microscópicas dos fibroblastos 3T3 no controle – tratados com meio, no tempo de 0h (A), 12h (B) e 24h (C). Tratados com o HBF-7 na concentração de 1,56 µM no tempo de 0h (D), 12h (E) e 24h (F) para o fechamento da “ferida”. Controle + tratado com fitohemaglutinina (5 µg/mL) no tempo de 0h (G), 12h (H) e 24h (I).

5.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

O óxido nítrico (NO) produzido por óxido nítrico sintase induzida (iNOS), em células imunes inatas e adaptativas é um dos mediadores inflamatórios. No presente estudo, a produção de óxido nítrico (NO) por células macrófagos RAW 264.7 foi mensurado no controle negativo quando estimuladas com LPS, apresentando um aumento significativo nos níveis de nitrito (13 μM de NO). Por outro lado, dos seis derivados monoméricos do floroglucinol testados, apenas o HBF-5 não reduziu os níveis de NO nas concentrações de 1,56, 6,25 e 25 μM testadas (Figura 25), enquanto os resultados apontaram que o HBF-6 reduziu significativamente a concentração de NO (11 μM) nas concentrações de 1,56 e 6,25 μM , e para 10 μM de NO na concentração 25 μM . O HBF -7 e HBF-9 também apresentaram redução a partir da concentração de 6,25 μM dos compostos. Os floroglucinóis HBF-8 e HBF-10 no tratamento a 1,56 μM apresentaram significância, sendo o composto HBF-8 com maior redução do nível de NO, comparado aos outros, para 9 μM na menor dose de tratamento (Figura 25).

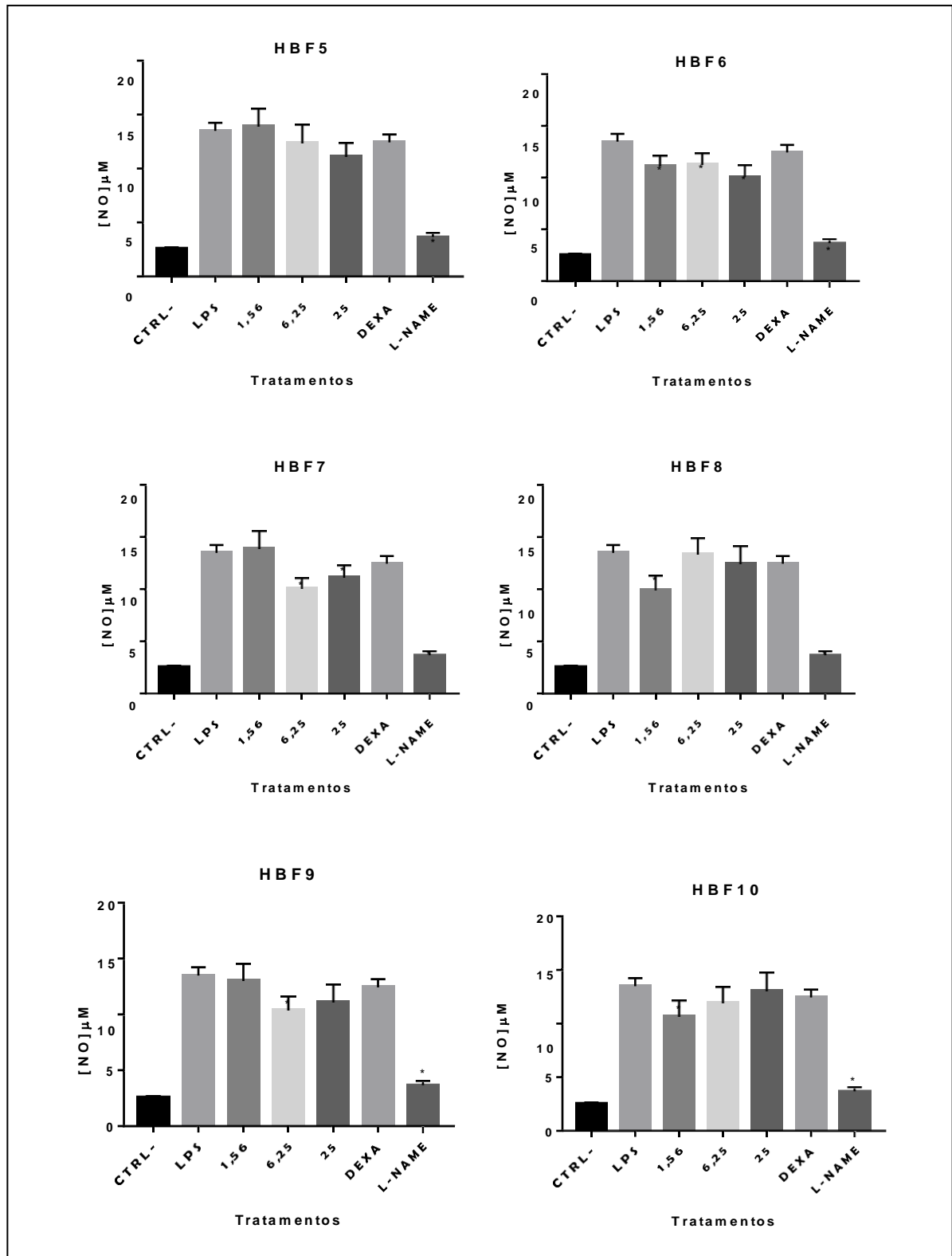


Figura 25 - Concentração de NO (μM) em macrófagos murinos RAW 264.7 tratados por 24h com os compostos florglucínóis HBF-5, HBF-6, HBF-7, HBF-8, HBF-9 e HBF- 10 nas concentrações de 1,56, 6,25 e 25 μM . *indica $p < 0,05$ com relação ao estimulado com LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e tratado apenas com meio DMEM (13 μM de NO). O controle negativo (-) são as células sem estímulo e sem tratamento. Os controles positivo (+) foram realizados com os fármacos padrões Dexametasona (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e o L-Name (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

O estudo realizado por CAO et al. (2018), também testou atividade inibitória de NO de 9 floroglucínóis isolados das folhas de *Callistemon rigidus* (Myrtaceae) em macrófagos RAW 264.7. Os resultados mostraram que os floroglucínóis monoterpénóides adutos 1 e 2 (Callisretones A e B), suprimiram a produção de NO com valores de IC50 de $15,3 \pm 1,0$ e $17,7 \pm 1,1$ μM , respectivamente. Em contraste, os compostos 3-9 (floroglucínóis terpénicos rearranjados) não exibiram atividade inibitória. Os resultados sugeriram que as porções de terpeno rearranjado desempenham papéis importantes na atividade inibitória, do que nos de floroglucínol-monoterpénóide adutos. Indicando que a conformação química pode estar associada a atividade biológicas dos floroglucínóis para a inibição de NO, por isso um floroglucínol como o HBF-5, isolado da *H. brasiliiana* igualmente aos outros estudados, pode apresentar atividade diferente.

Em outro estudo, células INS-1 β (pâncreas) foram tratadas com 30 mM de glicose, respondendo com um aumento dos níveis de NO. Essas mesmas células tratadas com 30 mM glicose e, em seguida, administrado o 2,7''-floroglucínol-6,6'-bieckol, resonderam com uma diminuição de NO. Onde o nível de NO foi de 221,52% nas células INS-1 β pré-tratadas com 30 mM de glicose e nas tratadas com o 2,7''-floroglucínol-6,6'-bieckol na concentração de 50 μM , com alta concentração de glicose, resultou em um nível significativamente reduzido de NO (102,1%), semelhante aos das células controle (100%), onde LEE et al.(2018), comprovou mais um floroglucínol, o 2,7''-floroglucínol-6,6'-bieckol, que atua inibindo a produção de NO.

No processo inflamatório o NO é produzido principalmente pela iNOS, que é induzida por vários mecanismos relacionados com as citocinas pró inflamatórias (IFN- γ , IL-1 e TNF- α), e está relacionado com a vasodilatação que ocorre nas fases iniciais do processo, produzido uma quantidade micromolar de NO por um longo período quando induzida (BOGDAN, 2015). A inibição de citocinas pró-inflamatórias ou da expressão de iNOS em células inflamatórias oferece uma estratégia terapêutica para o tratamento de doenças inflamatórias.

5.4 DOSAGEM DE CITOCINAS EM CÉLULAS RAW 264.7

Os macrófagos são conhecidos como células de grande importância na secreção de citocinas, as quais desempenham importante função induzindo e mediando respostas inflamatórias e imunológicas. Foram escolhidas as concentrações de 1,56, 6,25 e 25 μM para os testes imunológicos com os seis derivados monoméricos do floroglucínol (HBF-5, -6, -7, -

8, -9, -10) devido à ausência de citotoxicidade e resultados no ensaio com o MTT. Realizado então a quantificação de citocinas através da técnica de Cytometric Bead Array System (CBA).

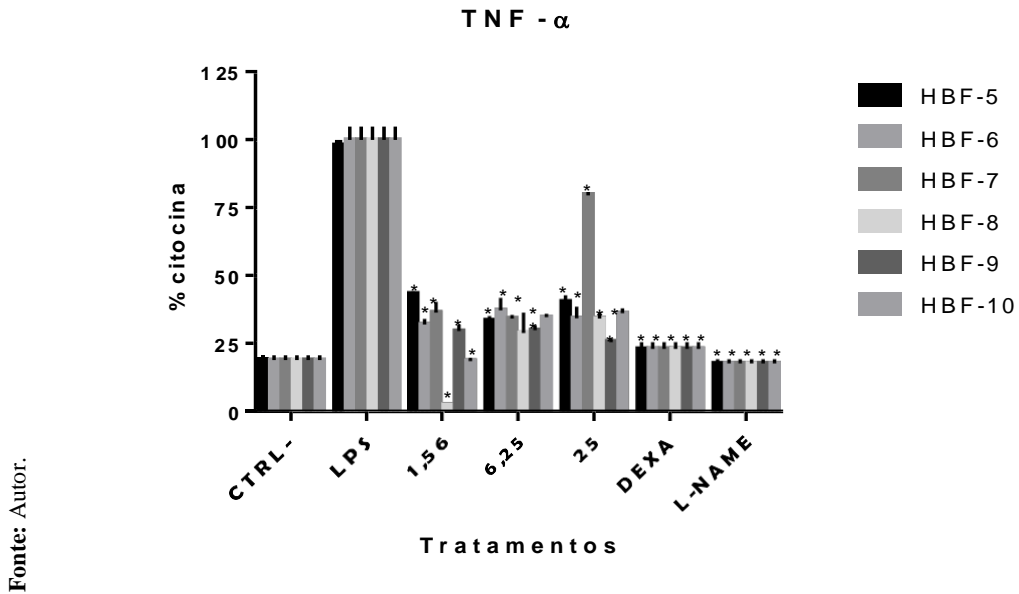


Figura 26 - Influência dos floroglucínóis na secreção de TNF- α (% de citocina) determinada pelo ensaio de CBA. Controle negativo células RAW 264.7 estimuladas e não estimuladas com LPS (5 μ g/mL) e controles positivo Dexametasona (10 μ g/mL) e L-NAME (25 μ g/mL).

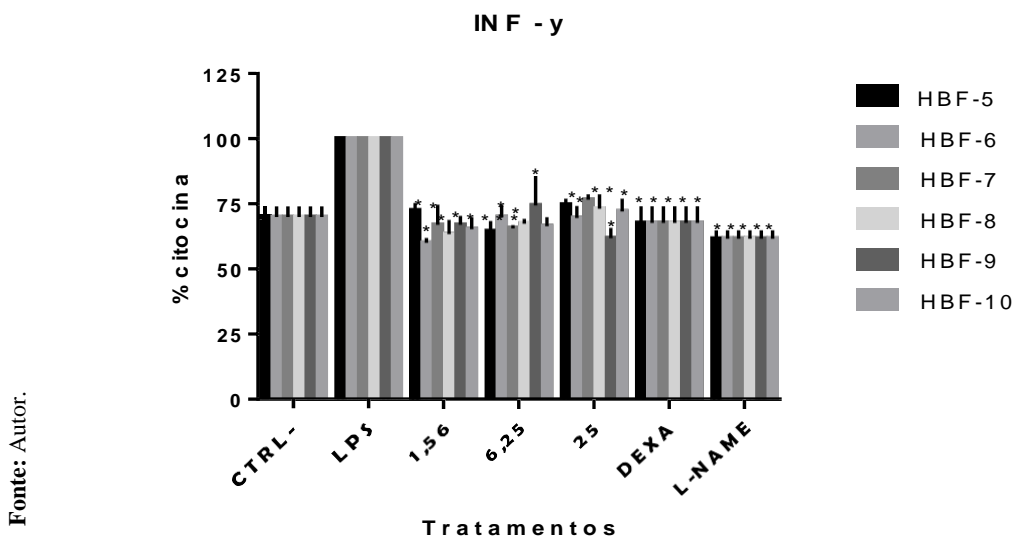


Figura 27- Influência dos floroglucínóis na secreção de INF- γ (% de citocina) determinada pelo ensaio de CBA. Controle negativo células RAW 264.7 estimuladas e não estimuladas com LPS (5 μ g/mL) e controles positivo Dexametasona (10 μ g/mL) e L-NAME (25 μ g/mL).

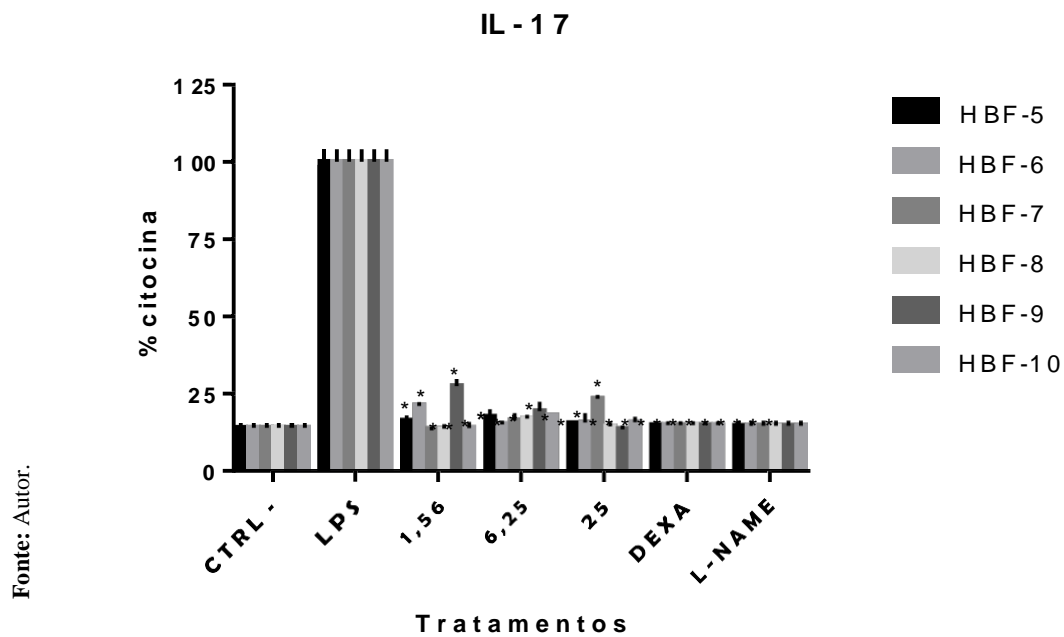


Figura 28 - Influência dos floroglucinóis na secreção de IL-17 (% de citocina) determinada pelo ensaio de CBA. Controle negativo células RAW 264.7 estimuladas e não estimuladas com LPS (5µg/mL) e controles positivo Dexametasona (10 µg/mL) e L-NAME (25 µg/mL).

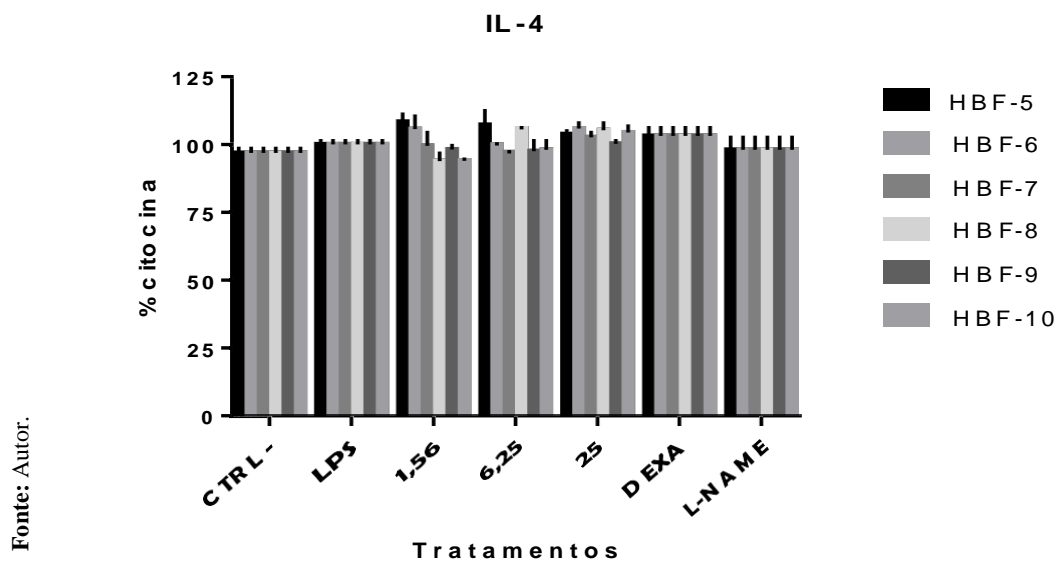


Figura 29 - Influência dos floroglucinóis na secreção de IL-4 (% de citocina) determinada pelo ensaio de CBA. Controle negativo células RAW 264.7 estimuladas e não estimuladas com LPS (5µg/mL) e controles positivo Dexametasona (10 µg/mL) e L-NAME (25 µg/mL).

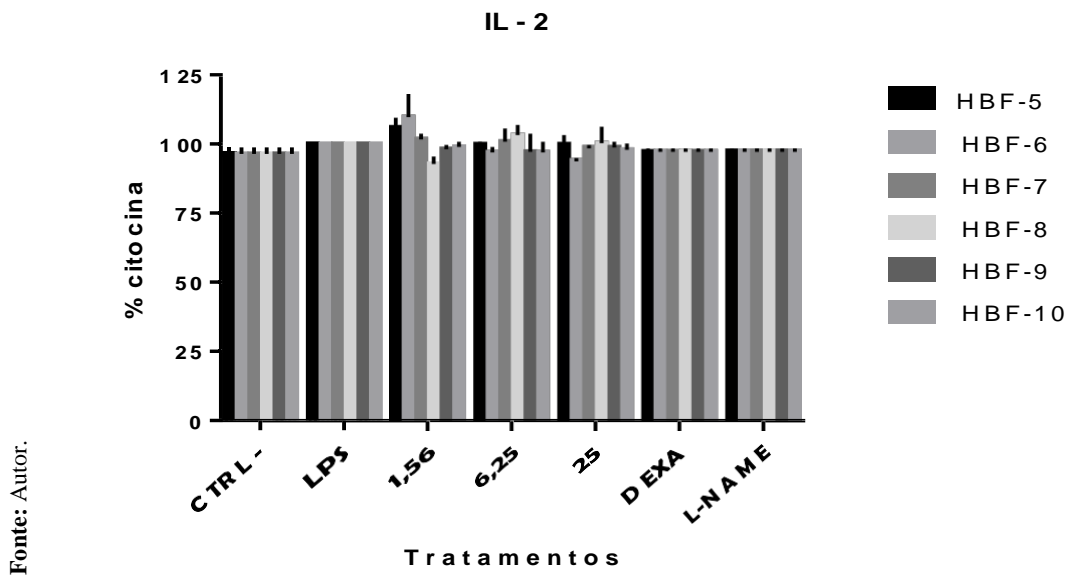


Figura 30 - Influência dos floroglucinóis na secreção de IL-2 (% de citocina) determinada pelo ensaio de CBA. Controle negativo células RAW 264.7 estimuladas e não estimuladas com LPS (5µg/mL) e controles positivo Dexametasona (10 µg/mL) e L-NAME (25 µg/mL).

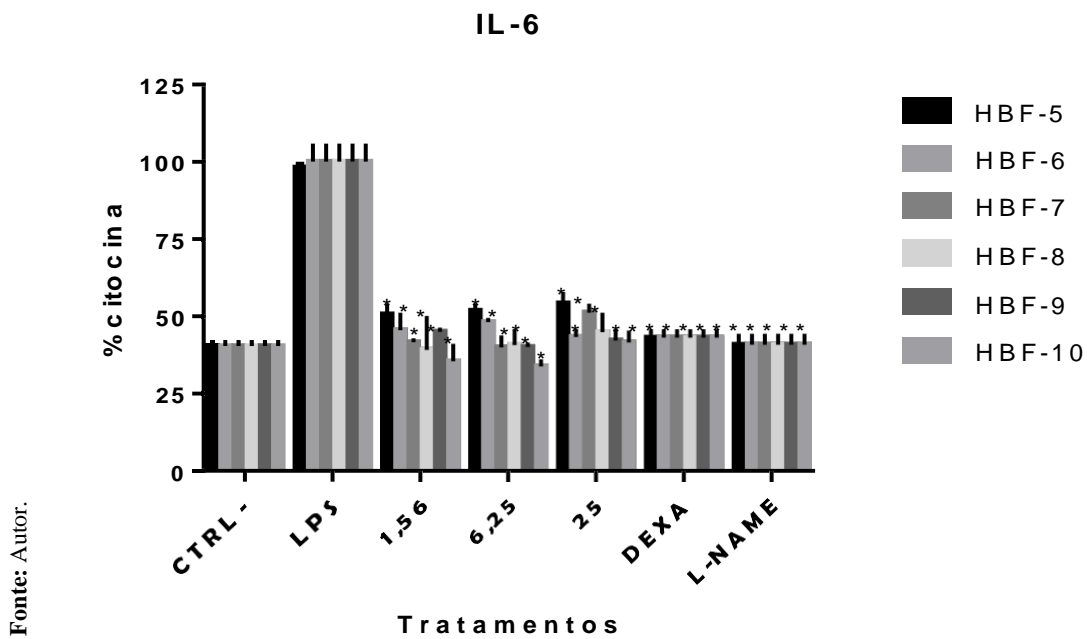


Figura 31 - Influência dos floroglucinóis na secreção de IL-6 (% de citocina) determinada pelo ensaio de CBA. Controle negativo células RAW 264.7 estimuladas e não estimuladas com LPS (5µg/mL) e controles positivo Dexametasona (10 µg/mL) e L-NAME (25 µg/mL).

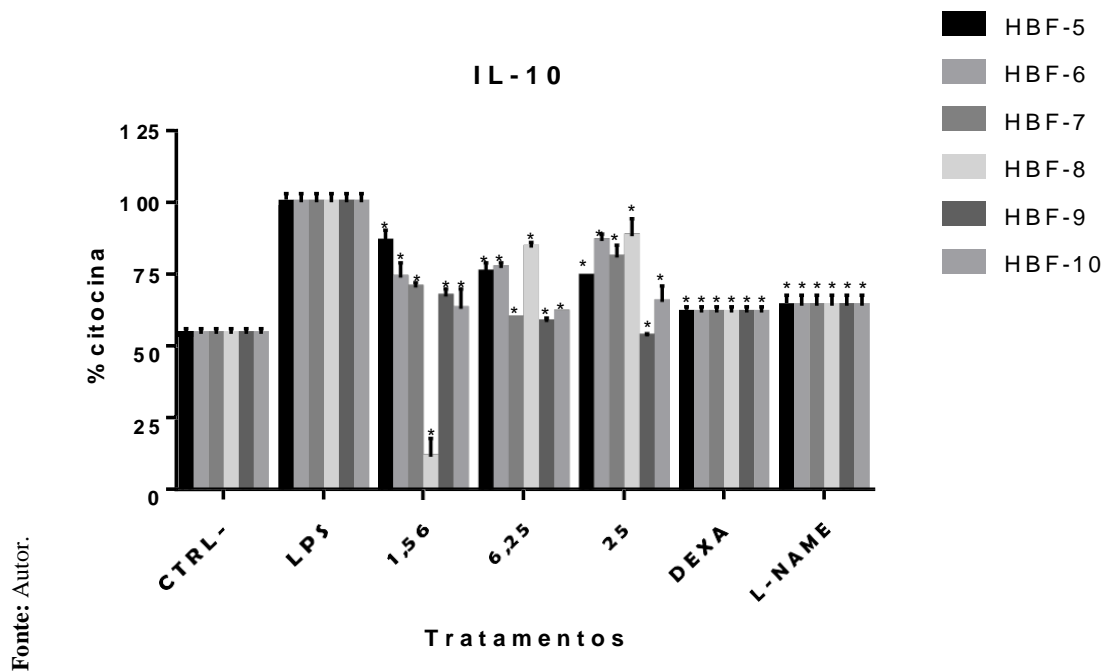


Figura 32 - Influência dos floroglucínóis na secreção de IL-10 (% de citocina) determinada pelo ensaio de CBA. Controle negativo células RAW 264.7 estimuladas e não estimuladas com LPS (5µg/mL) e controles positivo Dexametasona (10 µg/mL) e L-NAME (25 µg/mL).

Os seis derivados monoméricos do floroglucinol foram avaliados quanto à indução da resposta Th1 (pró-inflamatória) pela liberação de citocinas específicas. De acordo com os nossos resultados, todos os HBFs foram capazes de reduzir significativamente a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e INF- γ , em todas as três concentrações teste (Figuras 26 e 27), quando comparados ao controle estimulado com LPS e tratado com meio. O HBF- 8 apresentou a maior porcentagem de redução, 97% o nível de TNF- α no meio, quando tratado na concentração de 1,56 μ M. Além disso, a citocina pró-inflamatória IL-6 apresentou redução estimulada pelos seis HBFs (Figura 31). TNF- α e IL-6 são conhecidas biologicamente por promoverem inflamação sistêmica por indução de febre, resposta de fase aguda e ativação de macrófagos e neutrófilos (CROFT et al., 2013). O estudo da regulação da expressão dessas citocinas pode levar a entender alvos terapêuticos eficazes na doença inflamatória.

Em relação às citocinas liberadas durante a resposta Th2 (anti-inflamatória), um dos primeiros sinais lançados durante uma injúria tecidual é a secreção de IL-4; a mesma no presente trabalho não apresentou redução significativa por nenhum dos HBFs frente aos macrófagos estimulados com LPS, simulando assim uma inflamação *in vitro* (Figura 29). A IL-

IL-10 é uma citocina conhecida por sua ação biológica imunossupressora, com 89% de redução pela HBF-9 na concentração de 1,56 μM , que afeta a regulação e inflamação como também a produção de citocinas pró-inflamatórias incluindo a IL-2 que não apresentou redução estimulada pelos HBFs estudados em nenhuma das concentrações, citocina responsável por induzir a expansão clonal de células T, importante para a diferenciação de células T CD4⁺ em Th1 e Th2 (Figura 30) (MISIÁK et al., 2017). Os resultados mostraram uma resposta interessante, uma vez que não observamos uma indução do status anti e pró-inflamatórios associados.

A IL-17 pode induzir a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias sozinhas ou em cooperação com outras citocinas, como o TNF- α (SHAO et al, 2017; CORNETH, 2013). Os 6 HBFs (HBF- 5, -6, -7, -8, -9 e -10) do estudo reduziram significativamente os níveis da IL-17 secretados no meio, em todas as concentrações (Figura 28). Os resultados mais baixos entre todas as citocinas reduzidas. Sabe-se que a sinalização da IL-6 no meio pode ser crítica para o desenvolvimento de Th17, com papel importante na resposta imune frente a certos patógenos (SHAO et al., 2017), porém os níveis dessa citocina também tiveram percentagem de inibição significativa nos macrófagos tratados com os HBFs, como descrito anteriormente.

O extrato da erva de São João (SJW) e seu componente floroglucinol prenilado hyperforina (HPF), foram avaliados quanto a sereção de citocinas pró-inflamatórias. O HPF inibiu a ativação das vias de sinalização STAT-1 e NF- κB induzido por citocinas TNF- α e interferon, nas concentrações de 1-5 μM (NOVELLI, et al., 2016).

Um outro estudo mostrou os resultados de dois derivados de floroglucinol, o dioxinodehydroeckol e o 1-(3',5'-di-hidroxifenoxi)-7-(2'',4'',6-tri-hidroxifenoxi)-2,4,9-tri-hidroxidibenzo-1,4-dioxina), isolados da *Ecklonia cava*, que foram avaliados quanto a secreção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α em células THP-1 humano. Ambos os compostos reduziram os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α em concentração de 50 μM , quando comparado ao controle estimulado com LPS, verificado pelo teste de ELISA. O nosso estudo corrobora com esses resultados, pois os floroglucinóis da *H. brasiliiana* também reduziram os níveis das principais citocinas pró-inflamatórias no meio (KONG et al., 2011).

Além deles, outros dois floroglucinóis isolados do extrato aquoso de *Mallotus japonicus*, o isomallotochromanol e o isomallotochromene, também foram capazes de inibir as citocinas pró inflamatórias IL-6 e TNF- α , em células RAW 264.7 comparados ao controle

estimulado com LPS. Com IC50: 0.7 μ M, os dois floroglucínóis estudados também reduziram os níveis de IL-6 e TNF- α (ISHII et al., 2003).

6. CONCLUSÃO

Nos resultados obtidos a partir do ensaio de viabilidade celular com o MTT, nenhum dos 6 floroglucínóis isolados da *H. brasiliiana* apresentou resultados significativos de citotoxicidade frente as linhagens de macrófagos RAW 264.7 e fibroblastos 3T3 murinos, garantindo assim a seguridade experimental das concentrações escolhidas para os testes *in vitro* que deram prosseguimento ao do presente estudo.

A concentração de 1,56 μM do HBF-7 contribuiu para o fechamento das feridas *in vitro*, em comparação ao controle negativo. Os fibroblastos 3T3 tratados com os demais floroglucínóis (HBF- 5, -6, -8, -9 e -10), não apresentaram resultados significativos para a cicatrização para o fechamento total da lesão ao final das 24h.

Dos seis derivados monoméricos do floroglucinol testados, o HBF-5 não reduziu os níveis de NO nas concentrações de 1,56, 6,25 e 25 μM nas células RWA 264.7 induzidas por LPS, quando comparadas ao controle negativo. Os HBFs -6, -7, -9 e -10 expressaram redução de NO no meio, destacando o HBF-8 com a redução mais significativa dos índices de NO.

Os floroglucínóis reduziram da secreção das principais citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e INF- γ e inibição dos níveis das interleucinas IL-6 e IL-17, atuando com uma resposta anti-inflamatória frente a inflamação induzida por LPS. Com redução dos níveis de IL-10, que apresenta atuação sobre as citocinas inflamatórias.

Em conclusão, os floroglucínóis isolados (HBF- 5, -6, -7, -8, -9 e -10), do extrato etanólico das folhas de *H. brasiliiana* não apresentaram atividade citotóxica e cicatrizante. Entretanto, atividade frente a redução dos níveis de NO e redução das principais citocinas pró-inflamatórias foi comprovada.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Basic Immunology**. 5^a ed., Elsevier, 2015.
- ACHARYA, P. S., MAJUMDAR, S., JACOB, M., HAYDEN, J., MRASS, P., WENINGER, W., ASSOIAN, R. K., PURÉ, E. Fibroblast migration is mediated by CD44-dependent TGF β activation. **Journal of Cell Science** 121, 1393-1402 Published by The Company of Biologists 2008.
- ALONSO, J. R., 1998: Tratado de Fitomedicina: Bases clínicas y Farmacológicas. Buenos Aires, Isis Ediciones, pp. 327-331.
- ALVIM, N. A. T.; FERREIRA, M. A.; CABRAL, I. E.; FILHA, A. J. A. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. **Revista Latino-Americana**, Enfermagem 2006, maio-junho; 14(3).
- AMMON, H.P.T. Modulation of the immune system by *Boswellia serrata* extracts and boswellic acids. **Phytomedicine** 17 862–867, 2010.
- APG II (Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. **Botanical Journal Of the Linnean Societ**. v. 141. p. 399-436, 2003.
- ARAÚJO, R. M.; LIMA, M. A. S. L.; SILVEIRA, E. R. Pterocarpan and a Novel Flavanone from *Harpalyce brasiliiana* Roots. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. Vol. 20, No. 5, 935-938, 2009.
- ARAÚJO, R. M.; PINHEIRO, S. M.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Complete NMR data assignments for novel pterocarps form *Harpalyce brasiliiana*. **Magnetic Resonance in Chemistry**. 46, 890–893, 2008.
- ARISAWA, M.; KOZUKI, Y.; YAMAGUCHI, M. **Journal Organic Chemical**, 2003.
- ARO, A.A. et al. Effect of the *Arrabidaea chica* extract on collagen fiber organization during healing of partially transected tendon. **Life Science**, v.92, n.13, p.799-807, 2013.
- BASSET, C.; HOLTON, J.; O'MAHONY, R.; ROITT, I. Innate immunity and pathogen-host interaction. **Vaccine** (Suppl. 2):S12-S23., 2003.
- BECKER K., GEISLER, S, UEBERALL, F., FUCHS, D., GOSTNER, J. M. Immunomodulatory properties of cacao extracts – potential consequences for medical applications. **Frontiers in pharmacology**. Volume 4, Article 154. December, 2013.
- BEHM, B. et al. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v.26, p.812-20, 2011.
- BLOOR, S. J. Antiviral phloroglucinols from new zealand *Kunzea* species. **Journal of Natural Products**, 55, 1, 43-47, 1992.

BOGDAN, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. **Trends in Immunology** xx (2015) 1–18. **Nature reviews, Immunology**, vol. 3, 2003.

BORCHARDT, J. K. The beginnings of drug therapy: Ancient mesopotamian medicine. **Drug News Perspect.** 2002 Apr;15(3):187-192.

BOSCÁ, L.; ZEINIA, M.; TRAVESA, P. G.; HORTELANO, S. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. **Toxicology** 208 (2005) 249–258.

BORTOLUZZI, R. L. C.; MIOTTO, S. T. S. & REIS, 2006. Leguminosas caesalpinioídeas. *In*: Reis, A. **Flora Ilustrada Catarinense**, I parte, fascículo LEGU 2: 1-96.

BRANDÃO, M. G. L.; GRANDI, T. S. M.; ROCHA, E. M. M.; SAWYER, D. R.; KRETTLI, A. U. **Journal Ethnopharmacology**, 36: 175-82, 1992.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: **Anvisa**, 2011. 126p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 156 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos), **Cadernos de Atenção Básica; n. 31.**

BRIDI, H.; BECKENKAMP, A.; CCANA-CCAPATINTA, G. D.; BORDIGNON, S. A. L.; BUFFON, A.; VON POSER, G. L. Characterization of Phloroglucinol-enriched Fractions of Brazilian Hypericum Species and Evaluation of Their Effect on Human Keratinocytes Proliferation. **Phytotherapy research** (2016).

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plastic Reconstructive Surgery**, 2006; 117 (7 Suppl):12S-34S.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. M. V. The use of phytotherapy and medicinal plants in primary healthcare units in the cities of Cascavel and Foz do Iguaçu – Paraná: the viewpoint of health professionals. **Revista Ciência e Saúde Coletiva**, 17 (10): 2675-2685, 2012.

BURKART, A. Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. **Acme**, Buenos Aires, p. 341-2, 1943.

CALIXTO, J. B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Naturally Occurring Antinociceptive Substances from Plants. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 401-418, 2000.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTHS, A. K. Cicatrização de feridas. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (ABCD)** Artigo de revisão 2007;20(1):51-8.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v.131, p. 326-342, 2010.

CARVALHO, H. F. **Ciência e Cultura**. 42: 884-93, 1990.

CATÃO, R. M. R.; ANTUNES, R. M. P.; ARRUDA, T. A.; PEREIRA, M. S. V.; HIGINO, J. S.; ALVES, J. A.; PASSOS, M. G. V. M.; SANTOS, V. L. Atividade antimicrobiana “in vitro” do extrato etanólico de *Punica granatum* linn. (romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 38(2): 111-114, 2006.

CAVALCANTE, L. C.; MOREIRA, M. C.; MOTA, O. M. L.; TURATTI, E.; VIANA F. A. C. & PEREIRA S. L. S. Efeito da pedra umes no processo de cicatrização tecidual. Estudo histológico e o dorso de ratos. **Brazilian Journal Periodontology**. 22(1):69-73, 2012.

CAO, JIA-QING.; TIAN, HAI-YAN.; LI, MAN-MEI.; ZHANG, WEI.; WANG, YING.; WANG AND WEN-CAI YE J. Rearranged Phloroglucinol-Monoterpenoid Adducts from *Callistemon rigidus*. **Natural Products**, 81, 57–62, 2018.

CORNETH, O. B. Lack of IL-17 receptor A signaling prevents autoimmune inflammation of the joint and gives rise to a Th2-like phenotype in collagen-induced arthritis. **Arthritis and rheumatism**, 2013.

CHEN, C. C.; MO, F. E.; LAU, L. F. The angiogenic factor Cyr61 activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 47329- 46337, 2001.

CHEN, Z.; SOO, M. Y.; SRINIVASAN, N.; TAN, B. K.; CHAN, S. H. Activation of macrophages by polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* L. **Phytotherapy Research**;23(8):1116-22, 2009.

CHIPUK, J. E., MAURER, U., GREEN, D. R., SCHULER, M. Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. **Cancer Cell**. Nov; 4(5):371-81, 2003.

CORRÊA, A. D.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; QUINTAS, L. E. Plantas medicinais – do cultivo à terapêutica. **Editores Vozes**, Petrópolis. 1998.

COWAN, R.S. Caesalpinioideae. Pp. 57-64. In: R.M. Polhill & P.H. Raven (eds.). Advances in Legume Systematics part I. Kew, **Royal Botanic Gardens**, 1981.

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

CROFT, M.; BENEDICT, C.A.; WARE, C.F. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. **Nature Reviews Drug Discovery**. 12, 147–168. 2013.

CRUZ, G. L. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil. Editora Bertrand, Rio de Janeiro, 1995.

CSEKE, L. J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B.; WARBER, S. L.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. **Natural Products from Plants**, 2 ed, Taylor e Francis Group, 2006.

DASH, G.K.; MURTHY, P.N. Studies on Wound Healing Activity of *Heliotropium indicum* Linn. Leaves on Rats. **International Scholarly Research Network Pharmacology**, Article ID 847980, p.1-8, 2011.

DEL SOL, F. G.; NAGANO, C. S.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. **Investigación y Ciencia**, 361: 58-67, 2006.

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The immune system. First of two parts. **The New England Journal of Medicine** 6; 343(1):37-49, 2000.

DEWICK, P.M. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 515 p., 2002. **Drug News Perspect.** 15 (2002) 187–192.

DUQUE, G.A., DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 7, artigo 491, 2014.

EDWARDS, J. P.; ZHANG, X.; FRAUWIRTH, K. A.; MOSSER, D. M. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. **Journal Leukocyte Biology**, v. 80, n. 6, p. 1298-307, 2006.

EFRON, P. A. & MOLDAWER, L. L. Cytokines and Wound Healing: The Role of Cytokine and Anticytokine Therapy in the Repair Response. **Journal of Burn Care & Rehabilitation**, 2004.

ESIPOV, S. E.; KOLOSOV, M. N.; SABUROVA, L. A. **Journal Antibiotic**, 26, 537 [CA 80, 24018], 1975. extraneous to the lignocellulosic cell wall. Springer Verlag, EUA. 369, 1989.

ESQUIVEL-VELÁZQUEZ, M.; OSTOA-SALOMA, P.; PALACIOS-ARREOLA, M.I.; NAVA-CASTRO, K.E.; CASTRO, J.I.; MORALES-MONTOR J. The Role of Cytokines in Breast Cancer Development and Progression. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 35, p. 1-16, 2015.

FERRERO-MILIANI, L.; NIELSEN, O. H.; ANDERSEN, P. S.; GIRARDIN, S. E. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. **Clinical and Experimental Immunology**, 147 (2), 227–35, 2007.

FOSTER, M.W.; MCMAHON, T.J.; STAMLER, J. S. S-nitrosylation in health and disease. **Trends in Molecular Medicine**, 9, 160–168, 2003.

FRANÇA, H. S.; KUSTER, R. M. Atividade antibacteriana de floroglucínóis e do extrato hexânico de *Hypericum brasiliense* Choisy. **Química Nova**, Vol. 32, No. 5, 1103-1106, 2009.

FRONZAA, B.; HEINZMANN, M.; HAMBURGER, S.; LAUFERD, I.; MERFORTE, M. Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, 126, 463–467, 2009.

GAFFEN, S.L.; JAIN, R.; GARG, A.V.; CUA, D.J. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, p. 585–600, 2014.

GARCIA-LAFUENTE, A.; GUILLAMON, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M. A.; MARTYNEZ, J. A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Journal of Inflammation Research**, v. 58, p. 537-552, 2009.

GERTSCH J, VIVEROS-PAREDES JM, TAYLOR PJ Plant immunostimulants-Scientific paradigm or myth. **Journal Ethnopharmacology**, 2010.

GINNAE AHN A, EUNJIN PARK B, HYUN JEONG PARK B, YOU-JIN JEON A, JEHEE LEE A, JAE WOO PARK C, YOUNGHEUN JEE The classical NF κ B pathway is required for phloroglucinol-induced activation of murine lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1800, 639–645, 2010.

GHISALBERTI, E. L. Bioactive acylphloroglucinol derivatives from *Eucalyptus* species. **Phytochemistry**, 41, 7-22, 1996.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature**, 2002.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R. M. B. Biodiversidade: um enfoque químico-biológico. **Editora Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro. 1996.

GURTNER, G. C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M. T. Wound repair and regeneration. **Nature**. v. 453, 2008.

GURTNER, G.C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M.T. Wound repair and absence of transcription. **Cancer Cell** 4, 371–381, 2008.

H.; BROWN, G. D.; GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. **Annual Review Immunology**, v. 23901-44, 2005.

HALLIDAY, M.J.; PADMANABHA, J.; MCSWEENEY, C.; KERVEN, G.; SHELTON, H.M. Leucena toxicity: a new perspective on the most widely used forage tree legume. **Tropical Grasslands-Forrajes**. 1:1- 11, 2013.

HARSCH, I. A.; BRZOZOWSKI, T.; BAZELA, K.; HEGGERS, J.P. et al. Effect of the combination of Aloe vera, nitroglycerin, and L-NAME on wound healing in the rat excisional model. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.2, n.2, p.149-153, 1997.

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Anti-inflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Jornal de Pediatria**. v. 82, n. 5 (supl), p. 206-212, 2006.

HOMAR, J. C. Medicinas complementarias e alternativas: Um dilema para el sistema público. **Atención Primaria** 35: 389-391, 2005.

HU, L. Z.; ZHANG, Y.; ZHU, H. C.; LIU, J. J.; LI, H.; LI, X. N.; SUN, W. G.; ZENG, J. F.; XUE, Y. B.; ZHANG, Y. H. **Organic Letters**, 18, 2272– 2275, 2016.

HYUN-AH LEEA, JI-HYEOK LEEB, JI-SOOK HAN. 2,7"-Phloroglucinol-6,6'-bieckol protects INS-1 cells against high glucoseinduced apoptosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 103, 1473–1481, 2018.

HYUN AH JUNG A, SEONG EUN JIN B, BO RA AHN B, CHAN MI LEE B, JAE SUE CHOI. Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Eisenia bicyclis* and its constituents fucosterol and phlorotannins in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. **Food and Chemical Toxicology** 59, 199–206, 2013.

IM, A.R.; NAM, K.W.; HYUN, J.W.; CHAE, S. Phloroglucinol Reduces Photodamage in Hairless Mice via Matrix Metalloproteinase Activity Through MAPK Pathway. **Photochemistry Photobiology**. 92, 173–179. 2016.

JANIS, J.; HARRISON, B. Wound Healing: Part II. Clinical Applications. **Plastic and Reconstructive Surgery**. March 2014.

JONES, O. P. Effect of phloridzin and phloroglucinol on apples shoots. **Nature**, London, v. 262, n. 5567, p. 392-393, 1976.

JORGE, M.P. et al. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.118, n.3, p.361-363, 2008.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa, 1920-2006. **Histologia básica** / L. C. Junqueira, José Carneiro. 11. Ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KANG, K.A.; ZHANG, R.; CHAE, S.; LEE, S.J.; KIM, J.; KIM, J.; JEONG, J.; LEE, J.; SHIN, T.; LEE, N.H.; HYUN, J.W. Phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene) protects against ionizing radiation-induced cell damage through inhibition of oxidative stress in vitro and in vivo. **Chemico-Biological Interactions**. 185, 215–226. 2010.

KANG, H.S.; CHUNG, H.Y.; KIM, J.Y.; SON, B.W.; JUNG, H.A.; CHOI, J.S.; Inhibitory phlorotannins from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on total reactive oxygen species (ROS) generation, **Archives Pharmacal Research**. 27, 194–198, 2004.

KENDALL, H. K.; MARSHALL, R. I.; BARTOLD, P. M. Nitric oxide and tissue destruction. **Oral Diseases**; 7(1):2-10, 2001.

KIM, H. K.; CHEON, B. S.; KIM, Y. H.; KIM, S. Y.; KIM, H. P. Effects of Naturally Occurring Flavonoids on Nitric Oxide Production in the Macrophage Cell Line RAW 264.7 and Their Structure–Activity Relationships. **Biochemical Pharmacology**, Vol. 58, pp. 759–765, 1999.

KITE, G. C.; VEITCH, N. C.; GRAYER, R. J.; SIMMONDS, M. S. J. **Biochemical Systematics Ecology**, 31: 813-43, 2003.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature reviews**. Drug discovery, volume 4, march 2005.

KONTUREK, S. J.; KUKHARSKY, V.; PAWLIK, T.; PAWLOWSKI, E.; HAHN, E. G.; KONTUREK, P. C. Impaired gastric ulcer healing in diabetic rats: role of heat shock protein, growth factors, prostaglandins and proinflammatory cytokines. **European Journal of Pharmacology** 481, 249– 260, 2003.

KONG, C. S.; KIM, J. AE.; AHN, B. N.; KIM, S. K. Potential effect of phloroglucinol derivatives from *Ecklonia cava* on matrix metalloproteinase expression and the inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 macrophages. **Chemistry and Biochemistry**, Fish Sci, 77:867–873, 2011.

KRÖNCKE, K. D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric Oxide: cytotoxicity versus cytoprotection – how, why, when and where? Nitric Oxide: **Biology and Chemistry** 1997; 1(2):107-20.

KUMAR-ROINÉ, S.; MATSUI, M., REYBIER, K., DARIUS, H. T.; CHINAIN, M.; PAUILLAC, S.; LAURENT, D. Ability of certain plant extracts traditionally used to treat

ciguatera fish poisoning to inhibit nitric oxide production in RAW 2677 macrophage. **Journal of Ethopharmacology**, 2009.

LEE, S. B.; LEE, W. S.; SHIN, J. S.; JANG, D. S.; LEE, K. T. Xanthotoxin suppresses LPS-induced expression of iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-6 via AP-1, NF- κ B, and JAK-STAT inactivation in RAW 264.7 Macrophages. **International Immunopharmacology** 49, 21–29, 2017.

LEWIS, G. P.; SCHIRERE, B.; MANCHINDER, B. & LOCK, M. Legumes of the World. **Royal Botanic Gardens, Kew**. 2005.

LEWIS, G.P. 1987. Legumes of Bahia. **Royal Botanic Gardens, Kew**. 1987.

LI, C. S.; REN, G.; YANG, B. J.; MIKLOSSY, G.; TURKSON, J.; FEI, P. W.; DING, Y. Q.; WALKER, L. A.; CAO, S. G. **Organic Letters**. 18, 2335– 2338, 2016.

LI, J.; KUANG, D.; FENG, Y.; LIU, M.; ZHANG, F.; DENG, P. An Enhanced Electrochemical Sensing Platform Integrated with Graphene Oxide and Iron Hydroxide Colloid for Sensitive Determination of Phloroglucinol. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. Vol. 24, No. 4, 621-630, 2013.

LIMA, L. C. P.; GARCIA, F. C. P.; SARTORI, A. L. B. As Leguminosae arbóreas das florestas estacionais do Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia** 61(3): 441-466, 2010.

LIN, W.; WU, R. T.; WU, T.; KHOR, T-O.; WANG, H.; KONG, N. A. Sulforaphane suppressed LPS-induced inflammation in mouse peritoneal macrophages through Nrf2 dependent pathway. **Biochemical Pharmacology**. v. 76, p. 967-973, 2008.

Lista de plantas (2010). Versão 1. Publicado na Internet; <http://www.theplantlist.org/>
<http://www.theplantlist.org/tpl/search?q=Harpalyce> **especies de Harpalyce.**

LUCKOW, L. A phylogenetic analysis of the Mimosoideae (Leguminosae) based on chloroplast DNA sequence data. In: Klitgaard BB, Bruneau A (eds) *Advances in Legume Systematics 10, High Level Systematics*. **Royal Botanic Gardens, UK**, pp 197- 220, 2003.

MACHADO, S. S. C. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NF κ B. **Revista da biologia** – www.ib.usp.br/revista – volume 4 – junho de 2010.

MALTA, JR. A.; DINIZ, M. F. F. M.; OLIVEIRA, R. A. G. **Das plantas medicinais aos fitoterápicos: abordagem multidisciplinar**. João Pessoa: PET-FARMÁCIA/CAPES/UFPB, 1999.

MANJULA, B.; GAYATHRI, K.S.; VINAYKUMAR, N.P.; SHANKERNARAYANAN, R.A.; VISHWAKARMA, A.; BALAKRISHNAN. Inhibition of MAP kinases by crude extract and pure compound isolated from *Commiphora mukul* leads to down regulation of TNF- α , IL-1 β and IL-2. **International Immunopharmacology** 6 122– 132, 2006.

MATOS, F. J. A. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 3. ed. Fortaleza: **Imprensa Universitaria**, 2007.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**. 454: 428-35, 2008.

MEDZHITOV, R., AND C. JANEWAY, JR. 2000. Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* 343:338-344.

MELO, C. M. L.; CASTRO, M. C. A. B.; OLIVEIRA, A. P.; GOMES, F. O. S.; PEREIRA, V. R. A. CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Immunomodulatory Response of Cramoll 1,4 Lectin on Experimental Lymphocytes. **Phytotherapy research** *Phyther. Res.* 24: 1631–1636, 2010.

MELO, C. M. L.; PAIM, B. A.; ZECCHIN, K. G.; MORARI, J.; CHIARATTI, M. R.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Cramoll 1,4 lectin increases ROS production, calcium levels, and cytokine expression in treated spleen cells of rats. **Molecular and Cellular Biochemistry** 342:163–169, 2010.

MESQUITA JR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S. de.; SILVA, N. P. da.; ANDRADE, L. E. C.; CRUVIEL, W de M. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Sinopse de Reumatologia**, São Paulo, p. 66 - 81, 20 ago. 2008.

MINATEL, D.G. Estudo clínico para validação da eficácia de pomada contendo barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) na cicatrização de úlceras de decúbito. **Revista Brasileira de Medicina**, v.67, n.7, p.250-256, 2010.

MIRIS, D.; YUSUF, Ö.; GIANNI, S.; MASSIMO, R.; SAURO, V.; FILIPPO, M.; ANADOLU, m. Evaluation of the Wound Healing Potentials of Two Subspecies of *Hypericum perforatum* on Cultured NIH3T3 Fibroblastspr_3243 208..214. **Phytotherapy research Phyther.** *Res.* 25: 208–214, 2011.

MISIAK, A.; WILK, M.M.; RAVERDEAU, M.; MILLS, K.H.G. IL-17–producing innate and pathogen-specific tissue resident memory gd T cells expand in the lungs of Bordetella pertussis–infected mice. **Journal of Immunology**, v. 198, p. 363–374, 2017.

MONIKA MUELLER, STEFANIE HOBIGER, ALOIS JUNGBAUER Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. **Food Chemistry** 122, 987–996, 2010.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958-69, 2008.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, 420:846-852, 2002.

NAIR, M.P.; MAHAJAN, S.; REYNOLDS, J.L.; AALINKEEL, R.; NAIR, H.; SCHWARTZ, S.A.; KANDASWAMI, C. The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF-kappa beta system, *Clin. Vaccine Immunol.* 13 (3) 319–328., 2006.

NAGAYAMA, K.; IWAMURA, K.; T. SHIBATA, I.; HIRAYAMA, T.; NAKAMURA, B.; Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. **Journal Antimicrobial.** *Chemother.* 50-889–893, 2002.

NOR, C.; BERNARDI, A. P. M.; HAAS, JULIANA, S.; SCHRIPSEMA, J.; RECH, S. B.; VON POSER, G. L. Phenolic constituents of Hypericum flowers. **Natural Products Communications**, 3, 237-240, 2008.

NOVELLI, M., MENEGAZZI, M., BEFFY, P., POROZOVA, S., GREGORELLI B, A., GIACOPELLI C, D., DE TATAA, V., MASIELLO, P. St. John's wort extract and hyperforin inhibit multiple phosphorylation steps of cytokine signaling and prevent inflammatory and apoptotic gene induction in pancreatic cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 81, 92–104, 2016.

NUNES, C. R.; FREITAS, W. R.; VENTURA, T. L. B.; KANASHIRO, M. M.; MUZITANO, M. F.; OLIVEIRA, D. B. Inibição da produção de óxido nítrico e efeito citotóxico de extrato aquoso de *Annona muricata* l. **Perspectivas**. Ciências biológicas e da saúde, volume 1, número 2, 2011.

Occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Critical Reviews in Immunology**, v. 19, n. 1, p. 65-96, 1999.

OLIVEIRA, I. V. P. M.; DIAS, R. V. C. cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.4, p.267-271, 2012.

OKAMURA H, TSUTSUI H, KASHIWAMURA S, et al. Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. **Advances Immunology**. 70: 281–312, 1998.

ONWUKAEME, N. D. Anti-inflammatory activities of flavonoids of *Baphia nitida* Lodd. (Leguminosae) on mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology** v. 46, p. 121-124, 1995.

PAGANELA J.C., RIBAS L.M., SANTOS C.A., FEIJÓ L.S., NOGUEIRA C.E.W. & FERNANDES C.G. Abordagem clínica de feridas cutâneas em equinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. 104(569-572):13-18, 2009.

PANOBIANCO, M. S.; SAMPAIO, B. A. L.; CAETANO, E. A.; INOCENTI, A. & GOZZO, T. O. Comparação da cicatrização pós-mastectomia entre mulheres portadoras e não-portadoras de diabetes mellitus. **Revista Rede Enfermagem do Nordeste**. 11:15-22, 2012.

PAULUS M., HAJIME T., LAI GUAN N. G., SACHIN D., MARCIO O. L., AMAYA I., LOIS L. C., ULRICH H. VON A., HILDEGUND C.J. E., PHILIP G. H., WOLFGANG W. Random migration precedes stable target cell interactions of tumor-infiltrating T cells. **JEM** © The Rockefeller University Press. Vol. 203, No. 12, November 27, 2749–276, 2006.

PONNUCHAMY KUMAR, SINGARAVELU SENTHAMILSELVI, MUNISAMY GOVINDARAJUA AND RENU SANKARC. Unraveling the caspase-mediated mechanism for phloroglucinol-encapsulated starch biopolymer against the breast cancer cell line MDA-MB-231. **RSC Adv.**, 2014, 4, 46157. This journal is © **The Royal Society of Chemistry** 2014.

PONTES, M. C. N. D.; ARAÚJO, R. M. Contribution to the chemical knowledge of the species *Harpalyce brasiliiana* Benth. **Planta Medical**, v. 76, p. 1023-1064, 2015.
PRASAD, S.; PHOROMNOI, K.; YADAV, V. R.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Targeting Inflammatory Pathways by Flavonoides for Prevention and Treatment of Cancer. **Planta Medical**, v. 76, p. 1044-1063, 2010.

RADULOVIĆ, N. S. A.; RANDJELOVIĆ, P. J. B.; STOJANOVIĆ, N. M. C.; CAKIĆ, N. D. A.; BOGDANOVIĆ, G. A. D.; ŽIVANOVIĆA, N. A. V. N.S. Aboriginal bush foods: A major phloroglucinol from Crimson Bottlebrush flowers (*Callistemon citrinus*, Myrtaceae) displays strong antinociceptive and anti-inflammatory activity. **Food Research International**, 2015.

RAETZ, C.R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual Revist Biochemical**. 71: 635-700, 2002.

RAMALHO L.N.Z., SÉRGIO Z., RAMALHO, F.S., CASTRO-E-SILVA JR. O. & CORRÊA F.M.A. Efeito de agentes anti-hipertensivos sobre as células estreladas durante a regeneração hepática em ratos. **Arquivo Gastroenterologia** 40(1). 2003.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, 39: 603-613, 2001.

REFLORA, Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/PrincipalUC/PrincipalUC.do> > Acesso em: 24 de março de 2017.

RIBEIRO, D. A.; MACÊDO, D. G.; OLIVEIRA, L. G. S.; SARAIVA, M. E.; OLIVEIRA, S. F.; SOUZA, M. M. A.; MENEZES, I. R. A. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Campinas, v.16, n.4, p.912-930, 2014.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. **Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA, 816, 1999.

RIE ISHII A, MASAKAZU HORIE A, KOICHI SAITO A, MUNEHISA ARISAWA B, SUSUMU KITANAKA. Inhibitory effects of phloroglucinol derivatives from *Mallotus japonicus* on nitric oxide production by a murine macrophage-like cell line, RAW 264.7, activated by lipopolysaccharide and interferon- γ . **Biochimica et Biophysica Acta** 1568 (2001) 74-82.

RIVEST, S. Molecular insights on the cerebral innate immune system. **Brain, Behavior and Immunity**, 17, 13- 19, 2003.

RIVIERE, C.; NGUYEN THI HONG, V.; TRAN HONG, Q.; CHATAIGNE, G.; NGUYEN HOAI, N.; DEJAEGHER, B.; TISTAERT, C.; NGUYE THI KIM, T.; VANDER HEYDEN, Y.; CHAU VAN, M.; QUETIN-LECLERCQ, **Journal Phytochemistry**. 9, 217–253, 2010.

ROBBINS, S. L.; KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Patologia: Bases Patológicas das doenças**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ROWE, J. Benzenoids Extractives. **Natural products of wood plants I – Chemical**, 1989.

RUFATO, L.; MEYER, G. A.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C. Enraizamento de estacas lenhosas de cultivares de marmeleiro (*cydonia oblonga*) tratadas com floroglucinol. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 23, n. 3, p. 742-744, dezembro 2001.

RUFATO, L.; ROSSI, A.; LOMBARDI, S.R.; RIBEIRO, E.; KERTEN, E. Efeito de diferentes concentrações de floroglucinol no enraizamento de estacas lenhosas de duas cultivares de pessegueiro (*Prunus persica* L. Batsch) tratadas com AIB. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 21, n. 3, p. 297-300, 1999.

RUKACHAISIRIKUL, V.; NAKLUE, W.; PHONGPAICHIT, S.; HUTADILOK, N. T.; MANEENOON, K. Phloroglucinols, depsidones and xanthenes from the twigs of *Garcinia parvifolia*, **Tetrahedron**, V. 62, 8578-8585, 2006.

SANTOS, Manoel Francisco da Silva, et al. Avaliação do uso do extrato bruto de *Jatropha gossypifolia* L. na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira** - Vol 21 (Suplemento 3), 2006.

SIEWEKE, M. H.; ALLEN, J. E. Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. **Science**. 342(6161):1242974, 2013.

SHAO, X.; CHEN, S.; YANG, D.; CAO, M.; YAO, Y.; WU, Z.; LIN, N.; SHE, N.; LI, X.; XINYANG SONG & YOU CUN QIAN. FGF2 cooperates with IL-17 to promote autoimmune Inflammation. **Scientific Reports** | 7: 7024 |, 2017.

SHIBATA, T.; NAGAYAMA, K.; TANAKA, R.; YAMAGUCHI, K.; NAKAMURA, T.; Inhibitory effects of brown algal phlorotannins on secretory phospholipase A2s, lipoxygenases and cyclooxygenases. **Journal of Applied Phycology**. 15, 61-66, 2003.

SHIGURO, K.; YAMAKI, M.; KASHIHARA, M.; TAKAGI, S. Sarospidin A, B and C: additional antibiotic compounds from *Hypericum japonicum*. **Planta Medica**, 53, 415, 1987.

SILVA, D.M.; MOCELIN, K.R. O cuidado de enfermagem ao cliente portador de feridas sob a ótica do cuidado transcultural. **Nursing (São Paulo)**, v. 9, n. 105, p. 8188, 2007.

SILVA, E. D.; MARTINS, A. B. **Leguminosae-Papilionoideae na Serra do Cabral, MG, Brasil**. *Hoehnea* 40(2): 293-314, 1 tab., 2 fig., 2013.

SILVA, G. L.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A.; BRAZ-FILHO, R. A New Isoflavone Isolated from *Harpalyce brasiliensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Vol. 10, No. 6, 438-442, 1999.

SILVA, V.A. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. **Revista brasileira de plantas medicinais**. 2010, vol.12, n.4, pp. 452-455.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18(4): 618-626, Out./Dez. 2008.

SINGH, I. P.; BHARATE, S. P.; Phloroglucinol compounds of natural origin. **Natural Products Report**, V. 23, 558-591, 2006.

SOCOLSKY, C.; DOMINGUEZ, L.; ASAKAWA, Y.; BARDON, A.; Unusual terpenylated acylphloroglucinols from *Dryopteris wallichiana*, **Phytochemistry**, 80, 115-122, 2012.

STEIN, A. C.; VIANA, A. F.; MULLER, L. G.; NUNES, J. M.; STOLZ, E. D.; REGO, J. C.; COSTENTIN, J.; GILSANE, L. P.; RATES, S. M. K. Uliginosin, a phloroglucinol derivative from *Hypericum polyanthemum*: A promising new molecular pattern for the development of antidepressant drugs. **Behavioural Brain Research**, 228 (66–73), 2012.

STENKEN, J.A.; POSCHENRIEDER, A.J. Bioanalytical Chemistry of Cytokines-A Review, **Analytica Chimica Acta**, v. 853, p.95-115, 2015.

STOUT, R. D.; SUTTLES, J. Immunosenescence and macrophage functional plasticity: dysregulation of macrophage function by age-associated microenvironmental changes. **Immunology**, 205, 60-71, 2005.

SOUZA, J. R. M.; OLIVEIRA, R. T.; BLOTTA, M. H. S. L.; COELHO, O. R. Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18) e proteína C reativa (PCR) na síndrome coronariana aguda sem supradesnivelamento do ST em pacientes com diabetes tipo 2. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. vol. 90 no.2 São Paulo Feb. 2008.

SUGIURA, Y.; MATSUDA, K.; YAMADA, Y.; NISHIKAWA, M.; SHIOYA, K.; KATSUZAKI, H.; IMAI, K.; AMANO, H. Isolation of a new antiallergic phlorotannin, phlorofucofuroeckol-B, from an edible brown alga, *Eisenia arborea*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. 70, 2807–2811. 2006.

SUMANTA KUMAR GOSWAMI, SUMA KALLAHALLI GANGADARAPPA, MPHARM, MANIKANTA VISHWANATH, MPHARM, REMA RAZDAN, ROHITASH JAMWAL, MTECH, NAINI BHADRI, MPHARM, AND MOHAMMED NASEERUDDIN INAMDAR. Antioxidant Potential and Ability of Phloroglucinol to Decrease Formation of Advanced Glycation End Products Increase Efficacy of Sildenafil in Diabetes-Induced Sexual Dysfunction of Rats. **Sexual Medicine** -:1e9. 2015;

TAYLOR, P. R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H. Macrophage receptors and immune recognition. **Annual Review of Immunology**. ;23:901-44, 2005.

TOMAS-LORENTE, F.; INIESTA-SANMARTIN, E.; TOMAS-BARBERAN, F.A.; TROWITZSCH-KIENAST, W.; WRAY, V. Antifungal phloroglucinol derivatives and lipophilic flavonoids from *Helichrysum decumbens*. **Phytochemistry**, 28, 1613, 1989.

THOMPSON, A. W.; LOTZE, M. T. The Cytokine Handbook. 4th ed. Amsterdam: **Academic Press**; 2003.

TRINE H. MOGENSEN **Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses**. **Clinical Microbiology Reviews**. Apr; 22(2): 240–273, 2009.

VAN KLINK, J. W.; LARSEN, L.; PERRY, N. P.; WEAVERS, R. T.; COOK, G. M.; BREMER, P. J.; MACKENZIE, A. D.; KIRIKAE, T.; BIOORG. **Medical Chemistry**. 2005, 13, 6651.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J. L.; CLOOS, J. Ian A. Cree (ed.), *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, Second Edition, **Methods in Molecular Biology**, vol. 731, DOI 10.1007/978-1-61779-080-5_20, © Springer Science+Business Media, LLC 2011.

VILLA-NOVA, N. S.; MORAIS, S. M.; FALCÃO, M. J. C.; BEVILAQUA, C. M. L.; RONDON, F. C. M.; WILSON, M. E.; VIEIRA, I. G. P.; ANDRADE, H. F. Leishmanicidal

and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds of *Dimorphandra gardneriana* and *Platymiscium loribundum*, native plants from Caatinga biome. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 32(11):1164-1168, novembro 2012.

VOLTARELLI, J. C. Febre e inflamação. **Medicina**, Ribeirão Preto. v. 27, n. 1/2, p. 7-48, 1994.

VUUREN, S.F.; VILJOEN, A. M.; ZYL, R. L.; HEERDEN, F.R.; HUSNU, K.; BASER, C. The antimicrobial, antimalarial and toxicity profiles of helihumulone, leaf essential oil and extracts of *Helichrysum cymosum* (L)d. Don subsp. Cymosum. **South African Journal of Botany**, 72, 287, 2006.

YOON, S. B.; LEE, Y. J.; PARK, S. K.; KIM, H. C.; BAE, H.; KIM, H. M.; KO, S. G.; CHOI, H. Y.; OH, M. S.; PARK, W. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. **Journal Ethnopharmacology**. Sep 7;125(2):286-90, 2009.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Therapeutic effects of substances absence of transcription. **Cancer Cell** 4, 371–381, 2011.

WHO. **The world medicines situation 2011**: traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva:12p., 2011.

WILSON, H. M.; WALBAUM, D.; REES, A. J. Macrophages and the kidney. **Curr Opin Nephrology Hypertens**, v. 13, n. 3, p. 285-90, 2004.

WINK, D.A. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. **Journal Leukocyte Biology**. 89, 873–891, 2011.

WOJCIECHOWSKI, M. F.; LAVIN, M.; SANDERSON, M. J. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the Family. **American Journal of Botany** 91(11): 1846-1862, 2004.

WYNN, T.A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J.W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, v. 496, p. 445-455, 2013.

XIAO, Z-Y.; QING, M. U. Advances on chemical investion of Hypericum. **Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa**, 19, 344-355, 2007.

XIMENES, R. M.; ALVES, R. S. PEREIRA, T. P. ARAÚJO, R. M. SILVEIRA, E. R.; RABELLO, M. M.; HERNANDES, M. Z.; SOARES, V. C. G.; BRISTOT, D.; PIRES, C. L.; TOYAMA, D. O.; GAETA, H. H.; MONTEIRO, H. S. A.; TOYAMA, M. H. Harpalycin 2 inhibits the enzymatic and platelet aggregation activities of PrTX-III, a D49 phospholipase A2 from *Bothrops pirajai* venom. Ximenes et al. **BMC Complementary and Alternative Medicine** 12:139 < <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/12/139>>, 2012.

ZHAO, L.; ZHANG, S-L.; TAO, J-Y.; PANG, R.; JIN, F.; GUO, Y-J.; DONG, J-H.; YE, P.; ZHAO, H-Y.; ZHENG, G-H. Preliminary exploration on anti-inflammatory mechanism of corilagin (beta-1-O-galloyl-3-O-bexahydroxydiphenol-d-glucose) *in vitro*. **Internacional Immunopharmacology**, v. 8, p. 1059-1064, 2008.

[Dissertação] LUNARDELLI, S. **Investigação dos efeitos do floroglucinol e derivados sintéticos em zebrafish visando à atividade anticonvulsivante**. 2012. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

[Dissertação] OLIVEIRA, M. C. **O Nordeste de Amaralina na visão de seus jovens moradores**. 2006. 77p. Universidade do Estado da Bahia, Salvador, 2006.

[Dissertação] PONTES, M. C. N. D. **Contribuição ao conhecimento químico da espécie *Harpalyce brasiliiana* Benth**. 2014. Pós - Graduação em Química -Centro de ciências exatas e da terra - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2014.

[Dissertação] RAUH, L.K. **Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica da *Vernonia scorpioides* (Lan) Persons em modelos de inflamação cutânea em camundongos**. 2008. 118f. Pós- Graduação em Farmacologia– Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

[Dissertação] ROYER, L. A. J. **Morfoanatomia, atividade anti-inflamatória e parâmetros bioquímicos de *Poiretia tetraphylia* (POIRET) Burkart (Leguminosae)**. Pós – Graduação em Ciências Farmacêuticas – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Santa Maria, 2011.

[Dissertação] XIMENES, R. M. **Avaliação da atividade cabenegrina A-II frente às alterações bioquímicas e hematológicas e aos efeitos pressóricos induzidos pelo veneno de *Bothotops jararacuçu* em ratos**. Pós – Graduação em Farmacologia – Departamento de Fisiologia e Farmacologia – Universidade Federal do Ceará, 2009.

[Tese] ARAÚJO, R. M. **“Flavonóides e Floroglucinóis de *Harpalyce brasiliiana* Benth: Aspectos Químicos, Biológicos e Espectroscópicos”**. Pós-Graduação em Química Orgânica, Centro de Ciências - Departamento de Química Orgânica e Inorgânica - Universidade Federal do Ceará, 2008.

[Tese] CARTAGENES, M. S. S. **Investigação dos efeitos tóxicos e anti-hipertensivo de *Arrabidea chica* Verlot (Bignoniaceae)**. Pós – Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2009.

[Tese] XIMENES, R. M. **Atividade antifosfolipásica A₂ Harpalicina 2, uma isoflavona isolada de *Harpalyce brasiliiana* Benth**. Pós – Graduação em Farmacologia – Departamento de Fisiologia e Farmacologia – Universidade Federal do Ceará, 2012.

© 1999 Elsevier Science Inc. All rights reserved.