



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



LORENA FORNAZIER CAETANO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO OBTIDO DA CASCA
DO IPÊ-ROXO (*Handroanthus heptaphyllus* (Vell) Mattos)
SOBRE MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA EM MODELO DE
PERITONITE INDUZIDA POR ZYMOSAN EM ROEDORES**

Campo Grande – MS

2023

LORENA FORNAZIER CAETANO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO OBTIDO DA CASCA
DO IPÊ-ROXO (*Handroanthus heptaphyllus* (Vell) Mattos)
SOBRE MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA EM MODELO DE
PERITONITE INDUZIDA POR ZYMOSAN EM ROEDORES**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição da
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
como requisito parcial para obtenção do grau
de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr Saulo Euclides Silva Filho

Campo Grande – MS
2023

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO OBTIDO DA CASCA DO IPÊ-ROXO (*Handroanthus heptaphyllus* (Vell) Mattos) SOBRE MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA EM MODELO DE PERITONITE INDUZIDA POR ZYMOSAN EM ROEDORES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em 01 de dezembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Saulo Euclides Silva Filho
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Davi Campos La Gatta
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Éverton do Nascimento Alencar
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, mas principalmente à minha mãe, Eliana Nunes Fornazier Caetano, que sempre me apoiou e incentivou em todos os momentos da minha vida. Dedico ao meu orientador, Prof. Dr. Saulo Euclides Silva Filho, e à Joyce Lencina dos Santos, que me acompanhou e auxiliou durante a realização do projeto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família que me apoiou e deu todo o suporte que precisava para iniciar e concluir essa fase tão importante da minha vida, que possibilitou que toda essa trajetória fosse percorrida sem muitas preocupações ou dificuldades. Amo vocês.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Saulo Euclides Silva Filho, por ter me aceitado como aluna, ter me apoiado e auxiliado durante todo este tempo, e não menos importante, agradeço à Iluska, Paloma, Joyce e Dalila, por terem tornado a experiência ainda mais enriquecedora durante o tempo que passei como aluna do laboratório de Farmacologia e Inflamação.

Agradeço também à Pietra, Rafael, João Victor e Gabrielle, pessoas extremamente importantes na minha jornada que me ampararam quando precisei, me fizeram feliz e tornaram possível que eu vivesse momentos incríveis e memoráveis, tornando estes anos ainda mais especiais. Cada um de vocês ocupa um espaço em meu coração.

Por fim, agradeço ao meu namorado Kevin, por ter estado e vivido de perto comigo os momentos difíceis e me apoiado e incentivado a continuar em momentos que imaginei ser impossível o fazer. Eu te amo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	11
2.1 Resposta Inflamatória.....	11
2.2 Reconhecimento de patógenos, recrutamento celular e ativação leucocitária.....	12
2.3 Mediadores inflamatórios.....	13
2.4 Plantas Medicinais e Handroanthus heptaphyllus.....	14
3 JUSTIFICATIVA.....	17
4 OBJETIVOS.....	18
4.1 Objetivo geral.....	18
4.2 Objetivos específicos.....	18
5 MATERIAL.....	19
6 MÉTODOS.....	20
7 RESULTADOS.....	21
7.1 Extrato hidroetanólico de Handroanthus heptaphyllus reduziu o recrutamento para a cavidade peritoneal.....	21
7.2 Extrato hidroetanólico de Handroanthus heptaphyllus reduziu a migração de células polimorfonucleares para a cavidade peritoneal.....	22
6 DISCUSSÃO.....	23
7 CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS.....	27

RESUMO

É bem conhecido que os fármacos anti-inflamatórios disponíveis no mercado trazem muitos efeitos adversos, como lesão gástrica, complicações renais e riscos cardiovasculares, podendo trazer riscos à saúde do paciente. No entanto, é comum que vários povos façam uso de plantas medicinais facilmente encontradas em mercados ou lojas de produtos naturais para tratamento de enfermidades, porém a grande maioria não têm comprovação científica e embasamento acerca de suas reais atividades e composição química, além de poderem ser identificadas ou cultivadas de forma errônea. A planta *Handroanthus heptaphyllus*, conhecida popularmente como ipê-roxo, é utilizada pela população da região do pantanal sul matogrossense para o tratamento de condições inflamatórias, porém os estudos científicos que avaliaram o efeito desta planta na resposta inflamatória ainda são insuficientes. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do extrato hidroetanólico obtido da casca do ipê-roxo (*Handroanthus heptaphyllus*) (EHH) no recrutamento leucocitário durante a resposta inflamatória *in vivo*. O protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEUA/UFMS), sob registro nº 1.218/2022. Camundongos machos *Swiss* foram tratados com EHH (nas doses de 80, 160 ou 320 mg/kg), indometacina (droga de referência, na dose de 15 mg/kg) ou veículo, por via oral, 60 minutos antes de uma injeção intraperitoneal de zymosan (1mg/animal). Um grupo de animais recebeu injeção apenas de salina ($n = 5-7$ animais/grupo). Após 4 horas foi feita lavagem peritoneal com 1 mL de tampão fosfato-salina contendo EDTA para coleta das células e realização de contagem total e diferencial de leucócitos. Os resultados foram analisados por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, sendo $P < 0,05$ considerado como nível de significância. Os resultados demonstraram que a injeção de zymosan promoveu um aumento no número de leucócitos recrutados para a cavidade peritoneal dos camundongos e o tratamento com EHH e indometacina, em todas as doses testadas, reduziu o número de leucócitos totais na cavidade peritoneal dos animais, em comparação com o grupo tratado com veículo. Na contagem diferencial foi observado que a redução de leucócitos totais se deve, principalmente, à redução de leucócitos polimorfonucleares. Em conclusão, o tratamento com EHH reduz o recrutamento leucocitário na resposta inflamatória aguda.

Palavras-chave: anti-inflamatório, plantas medicinais, *Handroanthus heptaphyllus*.

ABSTRACT

It is well known that anti-inflammatory drugs available on the market have many adverse effects, such as gastric injury, kidney complications and cardiovascular risks, which can pose risks to the patient's health. However, it is common for several people to use medicinal plants easily found in markets or natural product stores to treat illnesses, but the vast majority do not have scientific proof and basis regarding their real activities and chemical composition, in addition to being able to be incorrectly identified or cultivated. The plant *Handroanthus heptaphyllus*, popularly known as ipê-roxo, is used by the population of the southern Pantanal region of Mato Grosso to treat inflammatory conditions, however scientific studies that evaluated the effect of this plant on the inflammatory response are still insufficient. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of the hydroethanolic extract obtained from the bark of ipê-roxo (*Handroanthus heptaphyllus*) (EHH) on leukocyte recruitment during the inflammatory response in vivo. The experimental protocol was submitted and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Mato Grosso do Sul (CEUA/UFMS), under registration no. 1,218/2022. Male Swiss mice were treated with EHH (at doses of 80, 160 or 320 mg/kg), indomethacin (reference drug, at a dose of 15 mg/kg) or vehicle, orally, 60 minutes before an intraperitoneal injection of zymosan (1mg/animal). One group of animals received an injection of saline only (n = 5-7 animals/group). After 4 hours, peritoneal lavage was performed with 1 mL of phosphate-saline buffer containing EDTA to collect the cells and perform total and differential leukocyte counts. The results were analyzed by ANOVA analysis of variance, followed by the Tukey test, with $P < 0.05$ considered as the level of significance. The results demonstrated that the injection of zymosan promoted an increase in the number of leukocytes recruited to the peritoneal cavity of the mice and treatment with EHH and indomethacin, at all doses tested, reduced the number of total leukocytes in the peritoneal cavity of the animals, in comparison with the vehicle-treated group. In the differential count, it was observed that the reduction in total leukocytes was mainly due to the reduction in polymorphonuclear leukocytes. In conclusion, EHH treatment reduces leukocyte recruitment in the acute inflammatory response.

Keywords: anti-inflammatory, medicinal plants, *Handroanthus heptaphyllus*.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais pela humanidade para o manejo e tratamento das enfermidades tem sido documentada desde os seus primórdios, por diversas civilizações ao redor do mundo (Andrade, *et al*, 2007). Com o passar dos anos, esta prática ainda permanece na cultura da sociedade contemporânea, sendo este conhecimento transmitido ao longo das gerações. Seu uso normalmente se dá através da ingestão de chás medicinais, produzidos por infusão ou decocção, xaropes, soluções para gargarejos, uso de compressas ou aproveitados de outras maneiras (Oliveira, *et al*, 2011).

No contexto de países subdesenvolvidos, especialmente aqueles mais vulneráveis, o uso tradicional de plantas como tratamento torna-se, na maioria das vezes, a única alternativa para obtenção de recursos terapêuticos para as doenças e condições clínicas que acometem a população (Oliveira, *et al*, 2011). Assim, a aceitação e crença nessas práticas pelos seus usuários colaboram para seu uso difundido. Associa-se ainda ao pensamento de que tratamentos à base de plantas naturais causam menos efeitos colaterais e nocivos em relação aos medicamentos sintéticos comumente utilizados na prática clínica diária (Gonçalves, R. N. *et al.*, 2021).

O Brasil é um país de dimensões continentais constituído por diversos ecossistemas/biomas, cada qual com características climáticas, topográficas, vegetais e animais próprias. Os biomas brasileiros apresentam uma vasta diversidade de plantas, muitas das quais são utilizadas popularmente para fins terapêuticos. Um exemplo é a planta *Handroanthus heptaphyllus* da família Bignoniaceae, popularmente conhecida como Ipê-roxo ou lapacho (Carlotto, *et al*, 2019). Comumente encontrada no bioma pantanal, no estado do Mato Grosso do Sul, os moradores locais utilizam-na para o controle de quadros inflamatórios e hiperálgicos e para o manejo de infecções bacterianas, em virtude de sua ação antibiótica bem como para o tratamento de transtornos gastrointestinais (Goel, *et al*, 2011; Guiraud, *et al*, 1994).

O processo inflamatório é derivado da resposta imune do hospedeiro frente a um estímulo, isto é. Na presença de uma injúria tecidual inicia-se a mobilização de células e a produção de mediadores químicos inflamatórios para combater o agente

agressor, iniciar o processo de reparação local e recuperar a homeostase tecidual. Estas respostas do hospedeiro podem ser classificadas em inata ou adaptativa (Vinay Kumar; Abbas, A. K; Aster, J. C, 2015), associado aos processos inflamatórios agudo ou crônico, dependentes da natureza e características da injúria, do estímulo e duração, por exemplo. Na resposta imunológica inata e inflamação aguda associada, em que os neutrófilos migram e, juntamente com os macrófagos, se tornam as principais células existentes no sítio afetado para promoverem a eliminação do estímulo agressor. Neste processo, a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células envolvidas mantém ou potencializam o recrutamento celular, aumentam a permeabilidade celular para auxiliar no processo de diapedese e promovem, conseqüentemente, a instalação do processo inflamatório, tornando-se evidente seus sinais de calor, rubor, dor e edema (Serhan, *et al*, 2007), os quais se dão pelo aumento do volume celular e de mediadores químicos no meio extravascular. Ainda, na persistência do processo inflamatório contra o agente agressor e o grau de lesão tecidual, a perda de função local torna-se um fator preocupante, podendo ser brando ou significativo para o indivíduo (Vinay Kumar; Abbas, A. K; Aster, J. C, 2015).

Desse modo, a disseminada utilização de plantas como recursos terapêuticos torna visível que essas plantas estão presentes no cotidiano popular, as quais podem ser facilmente encontradas em mercados ou comércios de produtos naturais com nenhuma ou mínima fiscalização e controle dos órgãos regulatórios nacionais (Jamshidi-Kia, Lorigooini, Z.; Amini-Khoei, H., 2018). Dessa forma, torna-se importante que estudos e pesquisas sejam realizados para avaliar suas potenciais atividades terapêuticas, efeitos colaterais e, eventualmente, sua toxicidade ao organismo e garantir que se utilizem doses seguras.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Resposta Inflamatória

A resposta inflamatória se inicia a partir do momento em que há qualquer tipo de injúria tecidual ou processo infeccioso, o objetivo é que as células de defesa que circulam na corrente sanguínea sejam recrutadas para os tecidos injuriados e, após serem ativadas, proporcionar a neutralização e eliminação de patógenos e realizar o reparo tecidual (Kumar, V. 2008). Porém, é importante salientar que existem situações em que a resposta inflamatória não é direcionada a um agente externo e sim ao próprio indivíduo e pode gerar danos consideráveis e seus sintomas são incômodos. Por este motivo existem fármacos anti-inflamatórios que controlam os efeitos nocivos do processo e agem a fim de diminuir e controlar a exacerbação do processo (Vinay Kumar; Abbas, A. K; Aster, J. C, 2015).

O processo inflamatório pode ser local ou sistêmico, podendo existir especificamente no local agredido ou se distribuir sistemicamente, respectivamente. Além dessa classificação, a inflamação pode ser classificada em aguda ou crônica. A aguda se inicia muito rapidamente e seu efeito possui uma duração não muito longa, variando com a dificuldade que o organismo encontra de neutralizar a ameaça, porém pode haver dificuldade de eliminar este agente danoso, fazendo com que o processo inflamatório não cesse e evolua para uma inflamação crônica, que conta com células mais especializadas e consequências mais severas aos tecidos (Kumar, V. 2008).

Além disso, é conhecido que na inflamação aguda os vasos sanguíneos menores se dilatam e tem sua permeabilidade aumentada para facilitar o trânsito celular do meio vascular para o tecido para consequente ativação. Este trânsito pode gerar a formação de um líquido rico em proteínas e células leucocitárias, sobretudo neutrófilos, também chamado de exsudato, que é muito comum no quadro inflamatório, além disso, também há aquecimento, rubor, inchaço, dor e possível perda funcional no local (Andrade, *et al*, 2007). Diferente da aguda, a inflamação crônica possui infiltrados de células mononucleares como, por exemplo, os linfócitos, macrófagos e plasmócitos. Ainda há destruição tecidual devido ao fato de que o estímulo agressor se torna persistente e, por fim, há tentativas de reparação tecidual como a angiogênese e a fibrose (Vinay Kumar; Abbas, A. K;

Aster, J. C, 2015).

2.2 Reconhecimento de patógenos, recrutamento celular e ativação leucocitária

O reconhecimento de patógenos é feito por células variadas do hospedeiro como, por exemplo, células dendríticas, células epiteliais e seus receptores (receptores do tipo *Toll*) e pelas células do sistema fagocítico (Aderem, A.; Uleviyh, R. J. 2000). Inicialmente os macrófagos teciduais têm o primeiro contato com o agente danoso. Durante esse processo, os capilares arteriulares ficam mais permeáveis e, pela diferença de pressão osmótica gerada no processo, as proteínas chegam aos tecidos mais facilmente, etapa necessária para que as outras células essenciais para a atividade cheguem até o local desejado e desencadeiem o eritema em virtude da vasodilatação dos capilares arteriulares que é induzida por mediadores químicos (Wilgus, T. A.; Roy, S.; MCDaniel, L. C. 2000). Conseqüentemente isso leva ao acúmulo de células nestes vasos dilatados que, por fim, sinalizam para que o recrutamento de leucócitos aconteça, dentre eles estão os neutrófilos, principais células recrutadas na existência da inflamação aguda de um tecido, e os mastócitos, que possuem grânulos repletos de histamina, vasodilatadores e moléculas que ajudam na alteração da permeabilidade vascular para que o influxo de células para o tecido aconteça mais facilmente (Abdallah, F.; Mijouin, L.; Pichon, C. 2017; NG, M. F. 2010).

Os leucócitos circulantes, diante do estímulo inflamatório, fazem a marginação, ou seja, se acumulam e ficam mais próximos das paredes vasculares, e rolam ao longo delas, se aderem às células endoteliais, que foram previamente ativadas por mediadores químicos, por meio de moléculas de adesão complementares entre elas, por exemplo, as selectinas (Zarbock, A. *et al.* 2011). Porém a marginação é reversível, possibilitando que a célula leucocitária "role" e se ligue a várias células endoteliais até chegar ao seu local de ação desejado para que possam iniciar a etapa de adesão estável por meio da ligação com as integrinas, também expressas nas células endoteliais (Ley, K. *et al.* 2007; MCEver, R. P.; Zhu, C. 2010). Posterior ao processo de adesão celular há a transmigração, que consiste no movimento migratório dos leucócitos pelas junções intercelulares para cruzarem o endotélio e atravessem a membrana basal dos capilares sanguíneos para chegar ao local da inflamação propriamente dito seguindo o gradiente químico (Kumar, V.

2008).

A ativação dos leucócitos recrutados é necessária, visto que só após serem ativados irão realizar suas funções. Esta ativação se dá por meio do reconhecimento de mediadores, microrganismos ou produtos de células necrosadas que são então reconhecidas pelos receptores existentes na superfície dos leucócitos que darão início à ativação leucocitária, resultando na liberação de mediadores químicos que são amplificadores de sinais para potencializar o recrutamento e ativação celular. Além disso, há o processo de fagocitose de organismos ou partículas desconhecidas e conseqüentemente, sua destruição no meio intracelular, no entanto, também há liberação de substâncias danosas a esses microrganismos que também os levarão à destruição, mas, neste caso, no meio extracelular (Ellis, S.; Lin, E.; Tartar, D. 2018).

Tudo o que foi esclarecido anteriormente é tido como necessário para a defesa do organismo hospedeiro. Entretanto, como consequência da ação dos leucócitos e liberação de substâncias reativas de oxigênio e enzimas, há lesão nos tecidos e células saudáveis devido ao fato de que muitas vezes as células defensoras podem não diferenciar adequadamente o hospedeiro do agente danoso e, por fim, a inflamação pode ser bem sucedida sem que o organismo seja prejudicado demasiadamente, bem como, pode progredir para um quadro crônico ou gerar uma cicatrização caso haja grande dano tecidual (Wynn, T. A.; Vannella, K. M. 2016).

2.3 Mediadores inflamatórios

Entre os principais mediadores químicos no processo inflamatório estão as aminas vasoativas, como a histamina, que tem ação vasodilatadora e estimuladora de plaquetas e integrinas no momento da resposta, porém na fase de resolução de danos ela estimula a atividade de colágeno por favorecer a proliferação de fibroblastos e queratinócitos, e a serotonina que é vasoconstritora. Existem também os metabólitos do ácido araquidônico como as prostaglandinas, produtos das enzimas Cicloxigenases, têm ação vasodilatadora e possuem influência na angiogênese e no reparo tecidual. O tromboxano, também produto das cicloxigenases, ajuda no processo de agregação plaquetária e síntese de outros mediadores e citocinas inflamatórias. Além disso, os leucotrienos, produtos das enzimas Lipoxigenases, tem efeito na permeabilidade vascular, aderência de leucócitos e quimiotaxia (Vinay Kumar; Abbas, A. K; Aster, J. C, 2015; Soliman, A.

M.; Barreda, D. R. 2022).

Além dos citados acima ainda existem as citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas (IL), sendo a IL-1, IL-6, IL-10, interferon gama (IFN- γ) e Fator de necrose tumoral (TNF) as mais comuns no processo inflamatório agudo. Dentre algumas das ações do TNF estão: ação no recrutamento celular no quadro inflamatório, síntese de moléculas de adesão, estimula angiogênese (Nosenko, M. A., Ambaryan, S. G.; Drutskaya, M. S, 2019; Frank, J. *et al.*, 2003). A IL-1 também faz a estimulação da inflamação e recrutamento de células inflamatórias, estimula produção de citocinas pró-inflamatórias (Raziyeva, K. *et al.*, 2021; Singer, A. J. Clark, R. A., 1999; Kawasaki, Y. *et al.*, 2008). A IL-6 também influencia no recrutamento celular, influencia na ativação, migração e proliferação de fibroblastos e participa da angiogênese (Lucketti, L. R., Gallucci, R. M., 2007; Brown, L. F., 1992).

A IL-10 ajuda na indução de resposta mediante estímulo agressor e também na sua resolução, inibe a continuidade da expressão de moléculas inflamatórias em neutrófilos e macrófagos, diminui a formação de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, entre outras ações (King, A. *et al.*, 2014; Saraiva, M., Vieira, P.; O'Garra, A., 2019). E por fim, o IFN- γ que auxilia na ativação de macrófagos para realizar a fagocitose de antígenos e o óxido nítrico, que além de ajudar a manter o tônus vascular e desempenhar um papel de neurotransmissor, também é produzido no momento em que os macrófagos e neutrófilos se tornam ativos na presença de citocinas pró-inflamatórias ou outros agentes agressores. Dessa forma, ele também está envolvido na eliminação de microrganismos, pois produz radicais livres que danificam a estrutura microbiana e celular do hospedeiro (Schoenborn, J. R., Wilson C. B, 2007; Vinay Kumar; Abbas, A. K; Aster, J. C, 2015).

2.4 Plantas Medicinais e *Handroanthus heptaphyllus*

Plantas medicinais são, por definição, “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos”, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (Veiga Junior, V. F.; Pinto, A. C.; Maciel, M. A. M., 2005), e por existirem em abundância desde sempre, as plantas são utilizadas como recurso terapêutico por diversos povos. Até nos tempos atuais disseminam-se conhecimentos acerca desta prática, sobre quais espécies podem ser utilizadas para qual tipo de doença ou condição de saúde, sendo física ou psicológica. Além disso,

para muitas pessoas esse pode ser um dos únicos recursos terapêuticos de fácil acesso disponíveis para que haja expectativa de cura (Oliveira, *et al*, 2011), além disso, muitos desses usos populares e tradicionais das mais diversas espécies de plantas não possuem um embasamento científico adequado para assegurar seu uso, sendo baseadas, então, apenas na prática de sua utilização, sem saberem da sua toxicidade ou se sequer realmente funcionam para a finalidade para a qual estão sendo usadas (Veiga Junior, V. F.; Pinto, A. C.; Maciel, M. A. M., 2005).

Cerca de metade dos medicamentos disponíveis atualmente são oriundos de plantas e, de acordo com a Organização Mundial da Saúde cerca de 80% de toda a população mundial é adepta ao uso de plantas medicinais, muitas vezes grande parte da população pode confiar ainda mais nesses medicamentos naturais por já terem tido experiências positivas com seu uso do que nos medicamentos alopáticos pelo fato de não saberem a ciência por trás deles (Gurib-Fakim, A. 2006). Além disso, há a crença de que medicamentos produzidos à base de plantas trazem menos riscos à saúde e não causam nenhum mal a quem os utiliza (Veiga Junior, V. F.; Pinto, A. C.; Maciel, M. A. M., 2005).

Além dos remédios naturais feitos pelo próprio usuário, sendo eles em formas de chás, xaropes, emplastos e outros, manipulados com raízes, folhas, flores, e outras partes de uma planta, existem também aqueles industrializados. Chamados de Medicamentos Fitoterápicos ou Produtos Tradicionais Fitoterápicos, que possuem legislação específica e boas práticas de fabricação que garantem a qualidade no seu cultivo, reprodução, fabricação e comercialização até que cheguem no consumidor final como um produto acabado, embalado e devidamente rotulado. Dessa forma, um dos pontos em que o uso de plantas medicinais pode se tornar perigoso é quando há uma identificação errônea da planta, o que é muito comum em locais de venda de produtos naturais, onde uma espécie de planta é vendida como se fosse outra. Além disso, existe a possibilidade de adulteração, toxicidade e contaminação, visto que a maioria dos produtos comercializados desta maneira não possuem um controle de qualidade adequado, podendo gerar danos graves à saúde do paciente e também causar interações perigosas com medicamentos alopáticos já em uso pelo indivíduo (Veiga Junior, V. F.; Pinto, A. C.; Maciel, M. A. M., 2005).

Visto que o Brasil é um país com uma vasta biodiversidade que se encontra distribuída pelos seus biomas e ecossistemas, sabe-se que a planta utilizada no presente estudo é nativa do bioma pantanal, uma planície alagável de extensão

úmida distribuída pelos estados de Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, encontrada frequentemente no estado de Mato Grosso do Sul (Brasil, 2009), a espécie *Handroanthus heptaphyllus* é pertencente à família Bignoniaceae e é utilizada popularmente pela população da região pantaneira para tratar doenças inflamatórias, doenças do sistema digestivo como úlceras pépticas e também infecções bacterianas. Porém os estudos acerca da comprovação das atividades descritas cientificamente e popularmente ainda são escassos, principalmente aqueles acerca da atividade desta planta em reações inflamatórias, tornando necessária a existência de cada vez mais pesquisas em torno do assunto, para que estas informações possam ser validadas com embasamento científico por meio de estudos *in vivo*, a fim de trazer mais segurança em sua utilização como fonte terapêutica.

3 JUSTIFICATIVA

O uso de plantas medicinais para tratamento de enfermidades é comum, principalmente em regiões com menos acesso a medicamentos comumente utilizados na terapêutica. O uso de fármacos anti-inflamatórios pode acarretar diversos efeitos nocivos, como problemas gástricos, renais e cardiovasculares, sendo assim, a pesquisa de produtos naturais com atividade anti-inflamatória e menor incidência de efeitos colaterais se torna relevante. Levando em consideração que a população pantaneira utiliza a casca do ipê-roxo (*Handroanthus heptaphyllus*) para o tratamento de condições inflamatórias, e há poucos estudos científicos que comprovem tal atividade, esta pesquisa propõe avaliar o efeito do extrato hidroetanólico obtido da casca do ipê-roxo na ativação leucocitária durante a resposta inflamatória aguda *in vivo*, a fim de encontrar um produto derivado da planta que possa ser desenvolvido, isolado e melhorado para então, ser comercializado como medicamento.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito do extrato hidroetanólico da casca do ipê roxo (*Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos) (EHH) sobre o recrutamento leucocitário durante a resposta inflamatória aguda *in vivo*.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do EHH sobre:
 - a migração leucocitária em modelo de peritonite induzida por zymosan em camundongos.
 - a determinação da contagem diferencial de leucócitos recrutados em modelo de peritonite induzida por zymosan em camundongos.

5 MATERIAL

5.1 Coleta do material vegetal e extração

A coleta do material vegetal foi realizada pelo LAPNEM/UFMS. O material vegetal foi devidamente identificado e depositado no herbário da UFMS. Após coleta, o material passou pelo processo de secagem em estufa de ar circulante, foi triturado e extraído utilizando um extrator acelerado por solvente ASE 150 da Dionex com etanol:água (7:3), sendo previamente extraído com hexano:acetona (8:2) para a remoção de substâncias apolares.

5.2 Determinação da composição fitoquímica do extrato

As análises fitoquímicas foram realizadas em cromatografia UFLC Shimadzu acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massa de alta resolução MicrOTOF-Q III (Bruker Daltonics) (LC-DAD-MS). A anotação dos constituintes do EMM e EHH foi baseada nos dados espectrais comparados com os dados relatados na literatura, bem como na injeção de padrões autênticos e pela Pesquisa em Biblioteca em Global Natural Products Social Molecular Networking (Wang et al., 2016).

6 MÉTODOS

6.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss, pesando entre 20 - 25g. Os animais foram mantidos em condições padrão de biotério, com temperatura de 22 ± 2 °C e ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e ração ad libitum. O protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEUA/UFMS) (registro nº 1.218/2022).

6.2 Peritonite induzida por zymosan

A peritonite foi induzida pela injeção intraperitoneal (i.p.) de zymosan (1 mg/cavidade) em todos os grupos, exceto no grupo controle negativo que recebeu i.p de salina. Camundongos machos foram tratados por gavagem (v.o) com EHH (sendo divididos em 3 grupos: nas doses de 80, 160 e 320 mg/kg), veículo (água) ou indometacina (1 mg/kg, droga de referência) ($n=5-7$ animais/grupo), 1 hora antes da indução da peritonite. Após 6 horas, os animais foram eutanasiados e a cavidade peritoneal foi lavada com 1 mL PBS/EDTA. Em seguida, o exsudato peritoneal foi coletado, centrifugado e o sedimento utilizado para a realização da contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer e contagem diferencial de leucócitos.

6.3 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Será realizada a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. $P < 0,05$ será considerado como nível de significância. A análise foi realizada em GraphPad Prism 5.

7 RESULTADOS

7.1 Extrato hidroetanólico de *Handroanthus heptaphyllus* reduziu o recrutamento para a cavidade peritoneal

Todas as doses testadas do extrato promoveram diminuição no número de leucócitos totais nos animais, sendo a dose de 320mg/Kg a com maior redução, seguida da de 160 mg/Kg e 80 mg/Kg, como observado na Figura 1.

Quando comparado com o grupo salina (grupo controle negativo que não recebeu i.p de zymosan), o grupo controle positivo (que recebeu injeção i.p. de zymosan) apresentou aumento de leucócitos totais/mm³ em 53,3%, enquanto o grupo Indometacina teve redução de 41%. Portanto, em comparação com o grupo controle, nossos resultados demonstraram que as doses de 80 mg/Kg, 160 mg/Kg e 320 mg/Kg reduziram a quantidade de leucócitos totais em 46%, 48% e 53%, respectivamente.

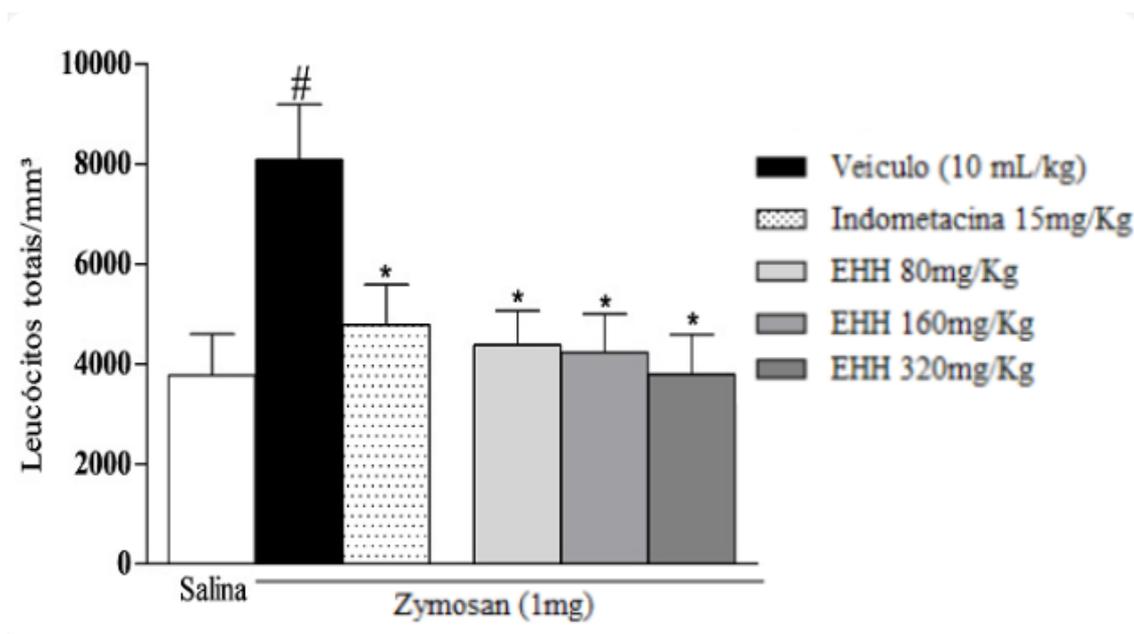


Figura 1: Efeito do extrato hidroetanólico da casca da planta *Handroanthus heptaphyllus* (EHH) nas doses de 80, 160 e 320 mg/Kg sobre a migração de leucócitos totais/mm³ comparados aos grupos controle. #P<0,05 em comparação com o grupo salina, *P < 0,05 comparados ao grupo controle (análise de variância ANOVA, teste de Tukey).

7.2 Extrato hidroetanólico de *Handroanthus heptaphyllus* reduziu a migração de células polimorfonucleares para a cavidade peritoneal

Todas as doses testadas do extrato promoveram diminuição no número de leucócitos polimorfonucleares nos animais, sendo a dose de 320mg/Kg a com maior redução, seguida da de 160 mg/Kg e 80 mg/Kg, como observado na Figura 2.

Quando comparado com o grupo salina (grupo controle negativo que não recebeu i.p de zymosan), o grupo controle (que recebeu injeção i.p. de zymosan) apresentou aumento de células polimorfonucleares de 83%, enquanto o grupo Indometacina reduziu a quantidade destas células em 48%. Desta forma, quando comparados ao grupo controle, o tratamento com EHH na dose de 80 mg/Kg, 160 mg/kg e 320 mg/kg, reduziu o número de PMNs em 62, 55 e 68%, respectivamente.

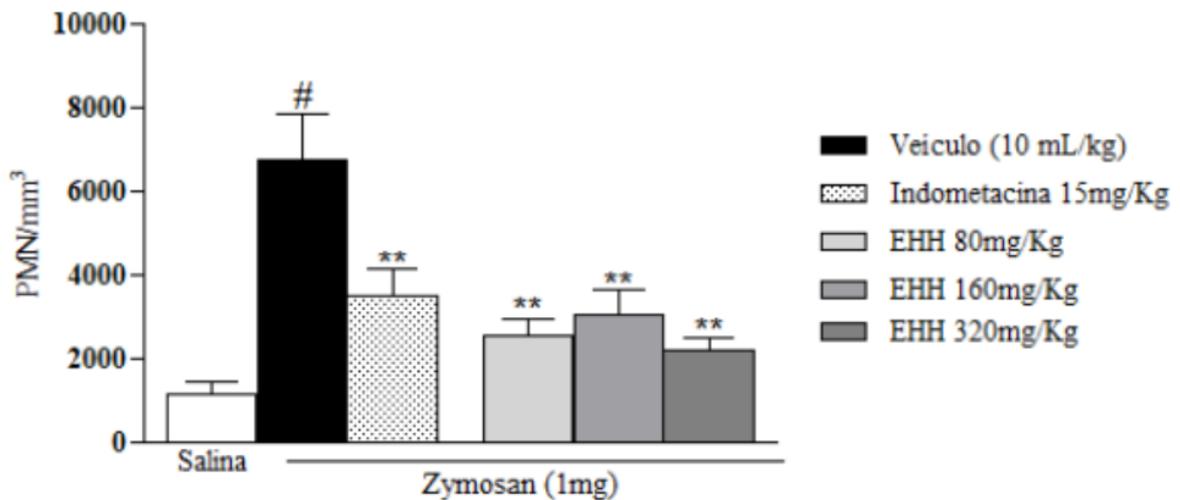


Figura 2: Efeito do extrato hidroetanólico da casca da planta *Handroanthus heptaphyllus* (EHH) nas doses de 80, 160 e 320 mg/Kg sobre a migração de leucócitos polimorfonucleares (PMN) comparados aos grupos controle. #P<0,05 em comparação com o grupo salina, *P < 0,05 comparados ao grupo controle (análise de variância ANOVA, teste de Tukey).

6 DISCUSSÃO

O processo inflamatório é benéfico para o organismo, visto que se trata de uma resposta de reparação tecidual na presença de algum agente nocivo, seja ele um microrganismo invasor ou uma situação de injúria tecidual. Porém, em alguns casos ocorre uma reação exacerbada, podendo ocasionar dano tecidual. Além disso, podem ser gerados distúrbios inflamatórios que se devem ao fato de que em algumas situações, o organismo pode não conseguir controlar a inflamação de forma eficaz e o processo se torna exacerbado devido à quantidade de citocinas e mediadores pró-inflamatórios produzidos, células de defesa que se deslocam para o sítio da inflamação, e outros fatores que podem causar um quadro mais grave, como o prejuízo funcional do local afetado, além dos sintomas clássicos como dor, febre, rubor e calor (Vishal V, Sharma G. N., Mukesh G., Ranjan B., 2014; Adegbola, P. I., *et al.*, 2017; Medzhitov, R., 2010).

De forma geral, a inflamação se inicia pela ativação da enzima Fosfolipase A2 (PLA2), presente na membrana das células, essa ativação se deve à liberação de fosfolipídios de membrana, que são transformados em ácido aracdônico, molécula que é metabolizada pela via das cicloxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX), enzimas que produzem prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, respectivamente. As enzimas cicloxigenases possuem duas isoformas, sendo elas COX-1, que pode ser encontrada em quase todos os tecidos do organismo e também é denominada como “constitutiva”, ou seja, está envolvida em vários processos fisiológicos, e a COX-2 que é chamada de “induzível”, pois sua produção normalmente é induzida em situações de inflamação na presença de citocinas e mediadores químicos, como IL-1, IL-2, TNF, fatores de crescimento e endotoxinas, porém também pode ser encontrada fisiologicamente nos rins, cérebro, útero e outros tecidos e órgãos (Yatoo, M. I., 2018)

É durante o processo inflamatório descontrolado ou autoimune que, na prática clínica, os medicamentos anti-inflamatórios sintéticos geralmente são utilizados, podendo ser medicamentos esteróides (AIEs), que, por via de regra, possuem um início de ação mais rápida e tempo de meia vida maior, porém também possuem efeitos colaterais mais graves se usados à longo prazo devido ao fato de que não são apenas anti-inflamatórios, ou seja, também são utilizados como

imunossupressores, e também necessitam de uma estratégia de retirada não abrupta para que o indivíduo não se prejudique ainda mais durante sua utilização. Já os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) possuem efeitos colaterais mais brandos quando comparados aos AIEs, porém ainda podem trazer desconforto ao indivíduo, pois muitos deles atuam inibindo as cicloxigenases que produzem as prostaglandinas que possuem alguns efeitos, dentre eles, a amplificação dos sintomas da inflamação. Porém as COXs não são responsáveis apenas pela produção destes fatores envolvidos com o processo inflamatório, elas também são enzimas constituintes de outros sítios do organismo, dentre eles o estômago, intestino, plaquetas, rins e outros órgãos, por isso, os AINEs não seletivos possuem inúmeros efeitos colaterais, pois interferem de forma geral em todas as variações de COX, principalmente COX-1 no organismo (Yatoo, M. I., 2018; Shaikh, S., *et al*, 2012).

O zymosan é um polissacarídeo extraído da parede celular de uma levedura chamada *Saccharomyces cerevisiae*, é conhecido por sua forte capacidade de induzir a produção de mediadores inflamatórios e atuar como um agonista para os receptores Toll-like, incluindo TLR-1, TLR-2 e TLR-6. A ativação desses receptores desencadeia a ativação do fator de transcrição NF- κ B, que eleva os níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF, IL-6 e IL-1 β , que ajudam no recrutamento de células para o local da inflamação e por fim, alteram a permeabilidade vascular, causam edema e formação de exsudato, se tornando um modelo experimental ideal para análise da atividade anti-inflamatória de vários compostos e extratos pesquisados (Falcão, T. R., *et al*. 2019).

A fitoterapia tem avançado muito nos últimos anos, e sabe-se que plantas medicinais não possuem apenas um constituinte específico responsável pela sua atividade farmacológica, elas têm muitos metabólitos que podem exercer os mais abundantes efeitos, podendo desempenhar efeitos diretos ou sinérgicos sobre os alvos terapêuticos, o que pode explicar a redução de efeitos colaterais e adversos destas plantas quando comparados com os medicamentos sintéticos existentes no mercado atualmente (Yatoo, M. I., 2018).

Nossos resultados não são conclusivos quanto à qual constituinte do extrato utilizado é o responsável pela redução da migração de leucócitos totais e polimorfonucleares durante o processo inflamatório agudo, pois para que isso seja definido é necessário que sejam realizados estudos fitoquímicos e farmacológicos,

porém de acordo com os resultados obtidos na experimentação do uso do extrato hidroetanólico de *Handroanthus heptaphyllus* em comparação com os grupos controles, é visível que houve redução dos parâmetros analisados e boa absorção e biodisponibilidade por via oral. Levando em consideração o mecanismo pró-inflamatório do zymosan (utilizado como agente flogístico), podemos sugerir que o EHH possa estar atuando na redução da produção de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores envolvidos. Além disso, devido à redução na quantidade de células polimorfonucleares obtida experimentalmente, é possível que este extrato esteja agindo em alguma enzima citada anteriormente, como a lipoxigenase, pois seus produtos ajudam na quimiotaxia. Porém, mais estudos são necessários para comprovar este mecanismo.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, os dados obtidos demonstram que o extrato hidroetanólico da casca de *Handroanthus heptaphyllus* possui uma potencial atividade anti-inflamatória em modelo de peritonite induzida por zymosan em camundongos, pois reduziu o recrutamento de leucócitos totais e diferenciais neste modelo experimental.

Dessa forma, o presente estudo contribuiu para a confirmação da potencial atividade anti-inflamatória do Ipê-roxo (*Handroanthus heptaphyllus*), no entanto, ainda são necessários que mais estudos sejam realizados para avaliar a toxicidade, mecanismo de ação e para confirmar qual é o constituinte ativo da planta responsável pela sua atividade.

REFERÊNCIAS

- 1: ANDRADE, S. F. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 464–471, fev. 2007.
- 2: OLIVEIRA, AKM. et al. Ethnobotany and traditional medicine of the inhabitants of the Pantanal Negro sub-region and the raizeiros of Miranda and Aquidauna, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v. 71, n. 1 suppl 1, p. 283–289, abr. 2011.
- 3: GONÇALVES, R. N. et al. Os marcos legais das políticas públicas de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. *Revista de APS*, v. 23, n. 3, 23 jun. 2021.
- 4: CARLOTTO, J. et al. A polysaccharide fraction from “ipê-roxo” (*Handroanthus heptaphyllus*) leaves with gastroprotective activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 226, p. 115239, dez. 2019.
- 5: GOEL, R. K. et al. Effect of lapachol, a naphthaquinone isolated from *Tectona grandis*, on experimental peptic ulcer and gastric secretion. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 138–140, 12 abr. 2011.
- 6: GUIRAUD, P. et al. Comparison of Antibacterial and Antifungal Activities of Lapachol and β -Lapachone. **Planta Medica**, v. 60, n. 04, p. 373–374, ago. 1994.
- 7: VINAY KUMAR; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease**. 9. ed. London: Elsevier Health Sciences, 2015.
- 8: SERHAN, C. N. et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 2, p. 325–332, fev. 2007.
- 9: JAMSHIDI-KIA, F.; LORIGOOINI, Z.; AMINI-KHOEI, H. Medicinal plants: Past history and future perspective. **Journal of Herbmед Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 1 jan. 2018.
- 10: KUMAR, V. **Robbins Patologia Básica** 9. 9. ed. [s.l.] Elsevier Health Sciences, 2008. p. 29–52
- 11: ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 782–787, ago. 2000.
- 12: WILGUS, T. A.; ROY, S.; MCDANIEL, J. C. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. **Advances in Wound Care**, v. 2, n. 7, p. 379–388, set. 2013.
- 13: ABDALLAH, F.; MIJOUIN, L.; PICHON, C. Skin Immune Landscape: Inside and Outside the Organism. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, 2017.
- 14: NG, M. F. The role of mast cells in wound healing. **International Wound Journal**, v. 7, n. 1, p. 55–61, fev. 2010.

- 15: ZARBOCK, A. et al. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. **Blood**, v. 118, n. 26, p. 6743–51, 2011.
- 16: LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 9, p. 678–689, set. 2007.
- 17: MCEVER, R. P.; ZHU, C. Rolling Cell Adhesion. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 26, n. 1, p. 363–396, 10 nov. 2010.
- 18: ELLIS, S.; LIN, E. J.; TARTAR, D. Immunology of Wound Healing. **Current Dermatology Reports**, v. 7, n. 4, p. 350–358, 28 set. 2018.
- 19: WYNN, T. A.; VANNELLA, K. M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 450–462, mar. 2016.
- 20: SOLIMAN, A. M.; BARREDA, D. R. Acute Inflammation in Tissue Healing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 641, 30 dez. 2022.
- 21: NOSENKO, M. A.; AMBARYAN, S. G.; DRUTSKAYA, M. S. Proinflammatory Cytokines and Skin Wound Healing in Mice. **Molecular Biology**, v. 53, n. 5, p. 653–664, set. 2019.
- 22: FRANK, J. et al. In Vivo Effect of Tumor Necrosis Factor Alpha on Wound Angiogenesis and Epithelialization. **European Journal of Trauma**, v. 29, n. 4, p. 208–219, 1 ago. 2003.
- 23: RAZIYEVA, K. et al. Immunology of Acute and Chronic Wound Healing. **Biomolecules**, v. 11, n. 5, p. 700, 8 maio 2021.
- 24: SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous Wound Healing. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 10, p. 738–746, 2 set. 1999.
- 25: KAWASAKI, Y. et al. Cytokine Mechanisms of Central Sensitization: Distinct and Overlapping Role of Interleukin-1 , Interleukin-6, and Tumor Necrosis Factor- in Regulating Synaptic and Neuronal Activity in the Superficial Spinal Cord. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 20, p. 5189–5194, 14 maio 2008.
- 26: LUCKETT, L. R.; GALLUCCI, R. M. Interleukin-6 (IL-6) modulates migration and matrix metalloproteinase function in dermal fibroblasts from IL-6KO mice. **British Journal of Dermatology**, v. 156, n. 6, p. 1163–1171, jun. 2007.
- 27: BROWN, L. F. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. **Journal of Experimental Medicine**, v. 176, n. 5, p. 1375–1379, 1 nov. 1992.
- 28: KING, A. et al. Regenerative Wound Healing: The Role of Interleukin-10. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 4, p. 315–323, 1 abr. 2014.
- 29: SARAIVA, M.; VIEIRA, P.; O’GARRA, A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 1, p. e20190418, 14 out. 2019.

- 30: SCHOENBORN, J. R.; WILSON, C. B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. **Advances in immunology**, v. 96, p. 41–101, 2007.
- 31: VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, jun. 2005.
- 32: GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1–93, fev. 2006.
- 33: BRASIL, 2009. Ministério do Meio Ambiente. Biodiversidade Brasileira. Disponível em: <<https://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira.html>>. Acesso em: 17 de mai de 2023.
- 34: OLIVEIRA, M.; ELOIR PAULO SCHENKEL; PALAZZO, C. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**. [s.l.] Porto Alegre, Rs Artmed, 2017. p. 498–499
- 35: VISHAL V, SHARMA GN, MUKESH G, RANJAN B. A review on some plants having anti-inflammatory activity. *Journal of Phytopharmacol* 2014; 3(3): 214-21.
- 36: PETER IFEOLUWA ADEGBOLA, et al. “Antioxidant and Anti-Inflammatory Medicinal Plants Have Potential Role in the Treatment of Cardiovascular Disease: A Review.” *PubMed*, vol. 7, no. 2, 1 Jan. 2017, pp. 19–32.
- 37: MEDZHITOV, RUSLAN. “Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame.” *Cell*, vol. 140, no. 6, Mar. 2010, pp. 771–776, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>.
- 38: YATOO, MOHD. I., et al. “Anti-Inflammatory Drugs and Herbs with Special Emphasis on Herbal Medicines for Countering Inflammatory Diseases and Disorders - a Review.” *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, vol. 12, no. 1, 21 Aug. 2018, pp. 39–58, <https://doi.org/10.2174/1872213x12666180115153635>.
- 39: SHAIKH, SAFIYA, et al. “Applications of Steroid in Clinical Practice: A Review.” *ISRN Anesthesiology*, vol. 2012, no. 985495, 2012, pp. 1–11, <https://doi.org/10.5402/2012/985495>.
- 40: FALCÃO, T. R. et al. Crude extract from *Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.) LP Queiroz leaves decreased intra articular inflammation induced by zymosan in rats. *BMC complementary and alternative medicine*, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2019.