



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**CITOTOXICIDADE E AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA *in vitro* DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DA *Libidibia ferrea* L.**

MÁRCIA ARRUDA LINS

MANAUS – AM

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**CITOTOXICIDADE E AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA *in vitro* DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DA *Libidibia ferrea* L.**

MÁRCIA ARRUDA LINS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

ORIENTADORA: Prof^ª Dr^ª. Carina Toda

CO-ORIENTADORA: Prof^ª Dr^ª. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira

MANAUS – AM

2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

L759c Lins, Marcia Arruda
Citotoxicidade e ação anti-inflamatória in vitro do extrato hidroalcoólico da *Libidibia ferrea* L. / Marcia Arruda Lins . 2020
85 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Carina Toda
Coorientadora: Maria Fulgência Costa Lima Bandeira
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Inflamação. 2. Citotoxicidade. 3. Óxido nítrico. 4. Jucá. 5. Ácido gálico. I. Toda, Carina. II. Universidade Federal do Amazonas III.
Título

MÁRCIA ARRUDA LINS

**CITOTOXICIDADE E AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA *in vitro* DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DA *Libidibia ferrea* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Banca examinadora

.....
Prof. Dra. Carina Toda

.....
Prof. Dra. Nikeila Chacon de Oliveira Conde

.....
Prof. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos

Conceito.....

Manaus, de de.....

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Deus, a minha avó paterna, a minha mãe e ao meu irmão que sempre dedicaram, apoiaram e incentivaram os meus estudos. A cada novo passo, a cada nova conquista em minha trajetória profissional, eu dedico inteiramente à vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus. A minha mãe Arlene, ao meu irmão Allan e a minha avó paterna Celina, vocês são e sempre serão os meus heróis. Ao meu namorado Philipe, por todo o companheirismo, apoio e paciência nos momentos incertos.

A minha orientadora Prof. Dra Carina Toda, pela orientação, dedicação e confiança durante todo o mestrado. A Prof. Dra Maria Fulgência Costa Lima Bandeira, pela coorientação, e por sempre se mostrar prestativa em ajudar. A Prof. Dra Nikeila Conde, pela ajuda, disponibilidade e confiança. Vocês são modelos de docentes e pesquisadoras que nos inspiram a ser melhor.

A pós-doutora, Prof. Dra Ana Regina Casaroto, fica o meu muitíssimo obrigada e gratidão por toda paciência, aprendizado, dedicação e por não medir esforços para me ensinar e me apoiar durante a execução de cada etapa deste projeto, ficando sempre ao meu lado. Sem você, com certeza esta caminhada seria muito mais difícil.

Ao meu querido amigo do mestrado Antônio Caetano, pelos conselhos, carinho, e por ser meu grande ombro amigo durante todos os altos e baixos deste percurso.

A mestranda Bárbara Janaína, amiga que o mestrado me concedeu, obrigada por me animar, ajudar, aconselhar e me apoiar em cada experimento realizado.

A doutoranda Márcia de Jesus, por todos os ensinamentos teóricos e práticos sobre cultivo celular.

A Prof. Dra Marne Vasconcellos e ao Prof. Dr Emerson Silva por permitirem a realização do projeto nos Laboratórios de Atividades Biológicas e Cultura de Células.

A todos os mestrandos, doutorandos, acadêmicos e colaboradores do Laboratório de Atividades Biológicas (BIOPHAR) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM que me acolheram, me ensinaram, me ajudaram e me apoiaram na execução da pesquisa, fica aqui a minha eterna gratidão. Vocês foram essenciais nesta caminhada.

Agradeço ao Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do

Amazonas (UFAM) pelo apoio e pela oportunidade. E também à Fundação de Amparo a Pesquisa no Amazonas (FAPEAM) pela concessão da bolsa e financiamento do projeto através do Edital da Universal 002/2018 - 062.01375 / 2018.

“Há uma mulher que acredita que tudo o que brilha é ouro. E ela vai comprar uma escadaria para o paraíso. E quando ela chegar lá, ela sabe que, com uma só palavra ela conseguirá o que foi buscar”

(Stairway to heaven – Led Zeppelin)

RESUMO

Popularmente denominada como "jucá" ou "pau-ferro", a *Libidibia ferrea* L. é uma espécie vegetal extensamente utilizada na medicina tradicional para o tratamento de diversas enfermidades, portanto, demonstrando diversas propriedades terapêuticas como: atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória. Estudos fitoquímicos destacam a presença de um dos possíveis responsáveis por algumas destas atividades biológicas, o ácido gálico, polifenol encontrado em diversas plantas, que é utilizado como um dos principais marcadores para estudos controle da *Libidibia ferrea* L. O presente trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* a citotoxicidade e a atividade anti-inflamatória de um extrato de *Libidibia ferrea* L. a 7,5% (m/v) sobre macrófagos RAW 264.7 e monócitos de sangue periférico humano. A avaliação foi realizada através do ensaio colorimétrico de MTT (3-[4,5-dimethylthiazolyl-2]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) e quantificação indireta de óxido nítrico (NO) pelo método de Griess. A cultura de macrófagos RAW 264.7 e a células primárias de monócitos de sangue periférico humano foram manuseadas em meios de cultura, que posteriormente foram desafiadas com LPS (Lipopolissacarídeo) de *Escherichia coli*, e tratadas com o extrato hidroalcoólico de *Libidibia ferrea* L. e ácido gálico por 24h. Os ensaios foram primeiramente realizados em macrófagos RAW 264.7, para obtenção das concentrações não citotóxicas e mínimas capazes de inibir a produção de NO. Foram divididos em seis grupos: extrato do *Libidibia ferrea* L. nas concentrações de 1,56 µg/mL a 100 µg/mL, ácido gálico 3,125 µM a 100 µM, controle positivo (LPS), controle negativo (meio de cultura), e a droga padrão (dexametasona a 20µg/mL). Uma vez obtida as concentrações não citotóxicas e inibitórias mínimas nos macrófagos, os mesmos ensaios foram realizados em monócitos de sangue periférico humano com os mesmos seis grupos, porém com o extrato de *L.ferrea* nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, e o ácido gálico a 6,25 µM. Foi realizada a análise de variância dos dados pelos testes ANOVA, seguido do Teste de Tukey e Dunnett, com diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Nos macrófagos, as concentrações testadas de 1,56 µg/mL a 100 µg/mL do extrato de *L.ferrea*, nenhuma comprometeu a viabilidade celular, enquanto que nas concentrações testadas de ácido gálico de 3,25 µM a 100 µM, apenas as concentrações 3,125 µM e 6,25 µM mantiveram as células viáveis. Na quantificação de NO, o extrato de *L.ferrea* a 50 e 100 µg/mL e o ácido gálico a 6,25 µM, obtiveram os resultados mais satisfatórios na inibição da produção do NO, sendo consideradas concentrações não citotóxicas e anti-inflamatórias mínimas. Nos monócitos de cultura primária, houve a manutenção dos resultados obtidos nos macrófagos RAW 264.7, destacando estas amostras sobre um potencial anti-inflamatório. Pode-se concluir que, o extrato da *Libidibia ferrea* L. e o ácido gálico apresentaram concentrações não citotóxicas e capazes de inibirem a produção de óxido nítrico quando testadas em linhagens diferentes, no qual ressalta-se ainda que em ambas as linhagens celulares, as amostras testadas obtiveram resultados mais satisfatórios quando comparados a droga anti-inflamatória padrão, a dexametasona.

Palavras-chave: Inflamação. Citotoxicidade. Óxido Nítrico. Jucá. Ácido gálico.

ABSTRACT

Popularly known as " jucá " or " pau-ferro ", a *Libidibia ferrea* L. is a plant species widely used in traditional medicine for the treatment of various diseases, therefore, demonstrating several therapeutic properties such as antimicrobial, antioxidant activity and anti-inflammatory. Phytochemical studies highlight the presence of one of the possible responses for some of these biological activities, the gallic acid, polyphenol found in several plants, which is used as one of the main markers for control studies of *Libidibia ferrea* L. objective to evaluate in vitro the cytotoxicity and anti-inflammatory activity of a 7.5% (w / v) extract of *Libidibia ferrea* L. on RAW 264.7 macrophages and human peripheral blood monocytes. The evaluation was carried out through the MTT colorimetric assay (3- [4,5-dimethylthiazolyl-2] - 2,5-diphenyltetrazolium bromide) and indirect quantification of nitric oxide (NO) by the Griess method. The culture of RAW 264.7 macrophages and the primary cells of human peripheral blood monocytes were handled in culture media, which were subsequently challenged with Escherichia coli LPS (Lipopolysaccharide), and treated with the hydroalcoholic extract of *Libidibia ferrea* L. and gallic acid for 24h. The assays were first performed on RAW 264.7 macrophages, to obtain the minimum and non-cytotoxic practices possible to inhibit NO production. They were divided into six groups: extract of *Libidibia ferrea* L. should from 1.56 µg / mL to 100 µg / mL, gallic acid 3.125 µM to 100 µM, positive control (LPS), negative control (culture medium), and the standard drug (20 µg / mL dexamethasone). Once the minimal non-cytotoxic and inhibitory options were obtained in the macrophages, the same assays were performed in human peripheral blood monocytes with the same six groups, but with *L.ferrea* extract in the 50 and 100 µg / mL procedures, and the 6.25 µM gallic acid. An analysis of variance of the data was performed using the ANOVA tests, followed by the Tukey and Dunnett test, with a statistically significant difference when $p < 0.05$. In macrophages, the tested concentrations of 1.56 µg / mL to 100 µg / mL of *L.ferrea* extract, none compromised cell viability, whereas in the tested concentrations of gallic acid from 3.25 µM to 100 µM, only concentrations of 3.125 µM and 6.25 µM kept the cells viable. In the quantification of NO, the extract of *L.ferrea* at 50 and 100 µg / mL and the gallic acid at 6.25 µM, obtained the most satisfactory results in the inhibition of NO production, considering minimum non-cytotoxic and anti-inflammatory concentrations . In the monocytes of primary culture, the results obtained in the macrophages RAW 264.7 were maintained, highlighting these samples on an anti-inflammatory potential. It can be concluded that the extract of *Libidibia ferrea* L. and gallic acid presented non-cytotoxic concentrations and capable of inhibiting the production of nitric oxide when tested in different strains, in which it is noteworthy that in both cell lines, tested samples obtained more satisfactory results when compared to the standard anti-inflammatory drug, dexamethasone.

Keywords: Inflammation. Cytotoxicity. Nitric oxide. Jucá. Gallic acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Ativação dos leucócitos.....	22
FIGURA 2 – Processo de migração dos neutrófilos e sua substituição por macrófagos.....	24
FIGURA 3 – Síntese de óxido nítrico por óxido nítrico sintase (NOS).....	27
FIGURA 4 – Imagens da <i>Libidibia ferrea</i> L. var. <i>ferrea</i>.....	30
FIGURA 5 – Imagem da estrutura química do ácido gálico.....	38
FIGURA 6 – Delineamento experimental do projeto.....	45
FIGURA 7 – Ensaio de citotoxicidade nos macrófagos.....	54
FIGURA 8 – Ensaio de Inibição do óxido nítrico pelos macrófagos RAW 264.7.....	55
FIGURA 9 – Ensaio de citotoxicidade e de Inibição do óxido nítrico pelos monócitos.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Porcentagem

® - Marca registrada

α - Alfa

B – Beta

γ - Gama

μ L – Microlitro

μ M – Micromolar

μ g - Micrograma

μ L/mL – Microlitro por mililitro

μ g/mL - Micrograma por mililitro

μ g/poço – Micrograma por poço

°C - Grau Celsius

ANOVA – Análise de Variância

AqF – Fração aquosa

BHI – *Brain Heart Infusion*

C7H2O5 – Fórmula do ácido gálico

CAF – Fração de acetato de etila

Cél/cm² – Células por centímetro quadrado

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CIM – Concentração inibitória mínima

CIMA – Concentração inibitória mínima de aderência

Cm² – Centímetros quadrados

CO₂ – Dióxido de carbono

COX-2 – Ciclo-oxigenase-2

DEX – Dexametasona

DMEM – *Dulbocco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetil sulfóxido

EA – Extrato aquoso

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA – Ensaio de imun absorção enzimática
EROS – Espécies reativas de oxigênio
FAO – Faculdade de Odontologia
FAPEAM – Fundação de Amparo a Pesquisa
FCF – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
g – Gramas
G – Grupo
g/L – gramas por litro
h - Horas
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
H₃PO₄ – Ácido fosfórico
HE – Hematoxilina-eosina
HIS – Histamina
H₂SO₄ – Ácido sulfúrico
IC₅₀ – Metade da concentração inibitória máxima
IFN – Interferon
IL - interleucina
INOS – Enzima indutiva de óxido nítrico
Kg – Quilogramas
KH₂PO₄ – Fosfato monopotássico
LPS – Lipopolissacarídeo
M – Metanólico
mg/kg – Miligramas por quilo
mg/L – Miligramas por litro
mg/mL – Miligramas por mililitro
min - Minutos
mL – Mililitro
mm² – Milímetros quadrado
MMPs – Metaloproteinases

MPO – Mieloperoxidase
MTT – [(Brometo de 3 (4,5 – dimetiltiazol -2-yl) 2,5 – difeniltetrazólio)]
n° - Número
NaCl – Cloreto de sódio
NE – Neutrófilos
Ng/mL – Nanograma por mililitro
Nm - Nanometro
NO – Óxido nítrico
NOS – Óxido nítrico sintase
PBS – *Phosphate buffered saline* (Tampão fosfato-salino)
PGE2 –Prostaglandina E2
pH – Potencial de hidrogênio
PMN – Polimorfonucleares
RAW 264.7 – Linha celular de macrófagos
RFU – *Relative Fluorescence Unit*
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
ROS – Espécies reativas de oxigênio
RPM – Rotação por minuto
RPMI – *Roswell Park Memorial Institute Medium*
SBF – Soro bovino fetal
TNF – Fator de necrose tumoral
U / mL – Unidade por mililitro
UFAM – Universidade Federal do Amazonas
UI – Unidade Internacional
xg – Força centrífuga aplicada 'x' vezes maior que a força gravitacional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1. Inflamação	20
2.1.1. Aspectos gerais	20
2.2. Monócitos e Macrófagos	24
2.3. Óxido Nítrico.....	27
2.4. <i>Libidibia ferrea</i> L, ex <i>Caesalpinia ferrea</i>	28
2.4.1. Aspectos geográficos, botânicos e etnofarmacológicos	28
2.4.2. Aspectos fitoquímicos	30
2.4.3. Aspectos farmacológicos	31
2.4.3.1. Frutos (Vagem)	31
2.4.3.2. Sementes.....	35
2.4.3.3. Folhas	36
2.4.3.4. Casca do Caule.....	36
2.5. Ácido Gálico	38
2.5.1. Aspectos farmacológicos do ácido gálico	39
3. OBJETIVOS	43
3.1. OBJETIVO GERAL:	43
3.2. OBJETIVOS PRIMÁRIOS:	43
3.3. OBJETIVOS SECUNÁRIOS:.....	43
4. METODOLOGIA.....	44
4.1. Tipo de Estudo:	44
4.2. Local do estudo:.....	44
4.3. Aspectos éticos.....	44
4.4. Fluxograma do experimento	45
4.5. Obtenção do extrato de <i>L. ferrea</i> (228022-INPA) e do ácido gálico	45

4.6.	Cultura de células.....	46
4.7.	Obtenção e cultura de células dos macrófagos RAW 264.7.....	47
4.8.	Desafios celulares - macrófagos RAW 264.7	48
4.9.	Ensaio de viabilidade celular pelo método MTT	49
4.10.	Quantificação de Nitrito (NO ⁻) – Método de Griess.....	49
4.11.	Seleção dos doadores do estudo:	50
4.11.1.	CrITÉRIOS de Inclusão:.....	50
4.11.2.	CrITÉRIOS de Exclusão:.....	50
4.12.	Obtenção e cultura de monócitos de sangue periférico humano.....	51
4.13.	Análises dos resultados.....	51
5.	RESULTADOS	54
5.1.	Avaliação da viabilidade celular e a obtenção da concentração mínima na inibição do óxido nítrico (NO) da <i>L.ferrea</i> e do ácido gálico em macrófagos RAW 264.7	54
5.2.	Avaliação da viabilidade celular e o efeito da <i>L.ferrea</i> e do ácido gálico na inibição de óxido nítrico (NO) em monócitos humanos.....	55
6.	DISCUSSÃO	58
6.1.	Avaliação do extrato de <i>L.ferrea</i> e ácido gálico sobre a viabilidade celular	58
6.2.	Efeito sobre a inibição do óxido nítrico (NO) do extrato de <i>L.ferrea</i> e ácido gálico	60
7.	CONCLUSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS.....	67
	APÊNDICES	78

1. INTRODUÇÃO

A reação inflamatória é uma das principais respostas de defesa do hospedeiro contra agressões teciduais, desencadeada por uma série de estímulos, como agentes infecciosos, trauma físico e produtos químicos (MONTHANA, 2011; DONG *et al.*, 2016). Quando adequadamente regulada, a resposta inflamatória auxilia no processo de reparo, bem como no restabelecimento da função tecidual (HEADLAND; NORLING, 2015; JIA *et al.*, 2017). No entanto, processos exacerbados e persistentes resultam em sinais e sintomas como dor, calor, rubor, edema e perda da função, caracterizando o estado de doença, como as lesões bucais de origem inflamatória (GILROY; MAEYER, 2015; PARK *et al.*, 2016).

Dentre as patologias bucais, as doenças inflamatórias da mucosa bucal, associadas ou não a presença de micro-organismos, fazem parte dos problemas de saúde em Odontologia, com destaque para as doenças periodontais. As doenças periodontais, decorrentes da presença de biofilmes microbianos dentários, afetam a mucosa gengival, bem como o tecido ósseo adjacente que, no seu estado mais grave, pode resultar na perda dentária (ARA *et al.*, 2009; SOARES *et al.*, 2014). Estas doenças estão intimamente associadas com respostas inflamatórias excessivas, resultando na degradação de matriz extracelular e perda da integridade do tecido (PIWOWARSKI; KISS, 2015).

O epitélio bucal é a principal barreira física da mucosa que, uma vez agredido, ocorre o desencadeamento da resposta imune inata pelo hospedeiro, onde alterações do tecido epitelial e ativação de mecanismos de defesa do hospedeiro são esperadas (CASAROTO, 2013; BEDRAN; SPOLIDORIO; GRENIER, 2015). As células epiteliais, logo após a agressão, liberam mediadores inflamatórios, quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias que auxiliam na regulação da resposta inflamatória de defesa, recrutando células inflamatórias, como os neutrófilos, monócitos e macrófagos, para a região lesionada (CASAROTO, 2013; BOZKURT *et al.*, 2017; NARUISHI; NAGATA, 2018).

Por serem os mais abundantes no sangue, os neutrófilos são os primeiros levados para o local da lesão ou infecção (MANTOVANI *et al.*, 2011; KRUGER *et al.*, 2015; PAZ *et al.*, 2016). Os neutrófilos desempenham um papel essencial na

inflamação, pois uma vez ativados, também liberam citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β), proteases (elastase, metaloproteinases MMPs), óxido nítrico e quimiocinas, bem como fagocitam agentes infecciosos, como bactérias e fungos, além da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (MANTOVANI *et al.*, 2011; KRUGER *et al.*, 2015; PAZ *et al.*, 2016; CZERWIŃSKA *et al.*, 2018).

Durante este processo há também a presença de monócitos, que são células mononucleares não diferenciadas cuja principal função é o reabastecimento da população de fagócitos em tecidos, além disso, monócitos presentes na corrente sanguínea atuam nos vasos sanguíneos detectando e eliminando patógenos, auxiliando desta forma na manutenção da imunidade inata (SHI; PAMER, 2011).

Para o seu recrutamento, células teciduais residentes expressam e secretam principalmente CCR2 – além de outros receptores como CCL2, CCL7, CX3CR1 - que irão orquestrar a migração dessas células para o local da inflamação a partir da medula óssea, que ao penetrarem os locais da inflamação, irão se diferenciar em macrófagos. Durante este processo, os monócitos também irão produzir quantidades significativas de mediadores inflamatórios para o local lesionado potencializando a resposta inflamatória (KUMMAR; ABBAS; ASTER, 2013; SHI; PAMER, 2011).

Dentre os produtos liberados no processo inflamatório pelos neutrófilos, monócitos e macrófagos, há também a produção o óxido nítrico (NO), que é um radical livre, inorgânico e gasoso de vida extremamente curta, e no organismo é produzido enzimaticamente pela oxidação da L-arginina em L-citrulina, catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), que atua auxiliando na regulação e intensificação da resposta inflamatória (SPROSTON *et al.*, 2018). Entretanto, a liberação intensificada de óxido nítrico, bem como citocinas pró-inflamatória pode resultar em danos aos tecidos do hospedeiro, cooperando para o desenvolvimento destrutivo de doenças que possuem caráter inflamatório (KUMMAR; ABBAS; ASTER, 2013; FERREIRA *et al.*, 2013; PIWOWARSKI; KISS, 2015; SPROSTON *et al.*, 2018).

Doenças da mucosa bucal como as doenças periodontais, são comumente tratadas através da prescrição de anti-sépticos orais, como o gluconato de clorexidina (BUGNO *et al.*, 2006). Entretanto, pesquisas na área odontológica tem sido desenvolvidas com o intuito de formular medicamentos com aplicabilidades

tanto curativas quanto preventivas para as patologias bucais. Assim, os fitoterápicos, medicamentos obtidos através de plantas medicinais e ausentes de substâncias de outra origem na sua composição, têm sido uma alternativa a ser considerada (FARMACOPEIA, 2010; EVANGELISTA *et al.*, 2013).

Além disso, diversos estudos envolvendo, principalmente, produtos derivados a partir dos extratos, raízes, vagem, caule e casca de *Libidibia ferrea* vêm ganhando destaque por apresentarem as propriedades antimicrobiana, analgésica e anti-inflamatória (SAMPAIO *et al.*, 2009; FREITAS *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013; MARREIRO *et al.*, 2014; VENÂNCIO *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2016).

Libidibia ferrea L. var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz (Leguminosae), cujo basiônimo é *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. (Caesalpiniaceae) é uma árvore que se desenvolve em todo o Brasil, de preferência nas regiões norte e nordeste (FREITAS *et al.*, 2012). Conhecida, geralmente, como pau-ferro ou Jucá, a *L. ferrea* tem sido estudada em decorrência das suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e analgésicas (CAVALHEIRO *et al.*, 2009; FREITAS *et al.*, 2012; MARREIRO *et al.*, 2014). O preparo da *L. ferrea* nas formas aquosas e alcoólicas é largamente usado para tratar uma série de doenças como diabetes, reumatismo, câncer, diarreia, inflamações entre outras (FREITAS *et al.*, 2012).

Diversos estudos na literatura já investigaram algumas das propriedades farmacológicas da *L. ferrea*, ressaltando a sua capacidade de atuar como anti-coagulante, sua atividade antimicrobiana diante de patógenos bucais, sua atuação como cicatrizante em feridas cutâneas abertas, bem como sua significativa atividade anti-inflamatória através da modulação negativa de mediadores da inflamação (CAVALHEIRO *et al.*, 2009; SAMPAIO *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2012).

Nesses estudos, ao realizarem a análise fitoquímica para averiguar quais são os componentes presentes na sua composição, são comumente identificados os triterpenos, polifenóis, sesquiterpenos, saponinas, taninos, alcaloides, flavonoides, esteroides, cumarinas, ácidos gálico, caféico, elágico, catequina, epicatequina, quercetina, ácido clorogênico, rutina, taxifolina, miricetina e quercetina (GONZALEZ *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2013; ARAUJO *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2016; MACÊDO *et al.*, 2020).

Entre os componentes mais presentes na *Libidibia ferrea* L., o ácido gálico (ácido 3,4,5 trihidroxibenzóico), que é um metabólito secundário presente na maioria das plantas e considerado um dos principais ácidos fenólicos, é utilizado principalmente como um dos principais marcadores nos estudos realizados na *Libidibia ferrea* L., isto é, destaca-se como um constituinte que encontra-se quimicamente definido presente na matéria-prima vegetal, sendo assim destinado para a realização de controle de qualidade (FERREIRA *et al.*, 2016; SANTOS;ALMEIDA, 2016). Além disso, ressalta-se ainda a presença de estudos na literatura que destacam os resultados satisfatórios do ácido gálico quanto suas atividades anti-tumorais, anti-inflamatórias e antioxidantes (VERMA; SINGH; MISHRA, 2013; BENSAD *et al.*, 2017; DLUDLA *et al.*, 2019; FARHOOSHA, NYSTRÖM, 2018)

Há ainda, estudos na Odontologia sobre o ácido gálico, acerca da sua atividade anti-inflamatória em doenças periodontais (KARATAS; GEVREK, 2020), anti-neoplásica diante do carcinoma oral de células escamosas (SANTOS *et al.*, 2018), e inclusive estudos sobre o seu efeito no crescimento de cristais de hidroxiapatita (TANG *et al.*, 2014).

Diante da necessidade pela busca por novas alternativas de tratamento para doenças de caráter inflamatório que afetam a cavidade oral, e tendo em vista o potencial terapêutico da planta da *Libibida ferrea* L. já apresentado em diversos estudos na literatura, bem como em estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa. Este projeto justifica-se pela necessidade de ampliar o conhecimento acerca deste potencial, logo, se propôs a avaliar a citotoxicidade e a atividade anti-inflamatória de um extrato hidroalcolólico da *Libidibia ferrea* L. e do ácido gálico, diante de células inflamatórias de macrófagos RAW 267.4 e de monócitos obtidos de sangue periférico humano.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Inflamação

2.1.1. Aspectos gerais

A inflamação (do latim, *inflammare* e do grego *phlogos*, que significam ‘pegar fogo’) é um mecanismo de defesa imediato dos tecidos vascularizados do hospedeiro frente a um agente agressor que é determinado por uma série de estímulos não específicos como traumas físicos, químicos e agentes infecciosos (MONTHANA, 2011; DONG *et al.*, 2016). Apesar de possuir causas variadas, a resposta inflamatória possui um mecanismo de resposta habitual que resulta no reconhecimento e ativação de vias de sinalização junto aos mediadores inflamatórios que auxiliam no recrutamento das células inflamatórias para a lesão (GILROY; MAEYER, 2015; PARK *et al.*, 2016).

Durante o processo de agressão ao tecido, as células existentes na microcirculação aumentam a permeabilidade vascular, exsudação de plasma, e deslocam células sanguíneas para interstício resultando no aparecimento de sinais e sintomas macroscópicos característicos que são o edema, calor, rubor e a perda da função (GILROY; MAEYER, 2015; PARK *et al.*, 2016). Enquanto as respostas locais e sistêmicas são ativadas, a inflamação tem como objetivo a eliminação do agente causador e reparação do dano tecidual (GILROY; MAEYER, 2015; PARK *et al.*, 2016). Entretanto, a não resolução do processo inflamatório, mantendo-se de forma desregulada ou persistente é um fator determinante que contribui para a patogênese de muitas doenças (FULLERTON; GILROY, 2016).

A inflamação pode ser classificada em aguda ou crônica. De início rápido e de duração curta, de poucos minutos a poucos dias, a inflamação aguda é caracterizada pela exsudação de líquido e proteínas plasmáticas, bem como de acúmulo de leucócitos, com a predominância inicial principalmente de neutrófilos. Enquanto que, a inflamação crônica por sua vez, possui uma duração mais longa, podendo durar por dias a anos, tendo como característica o influxo de macrófagos e linfócitos com proliferação vascular associada e fibrose (HEADLAND; NORLING, 2015; FULLERTON; GILROY, 2016).

O processo inflamatório se desencadeia de maneira que as células do mecanismo de defesa do hospedeiro reconhecem um micro-organismo invasor, fator

este que é ocasionado por meio de receptores presentes na superfície celular que identificam a presença de substâncias liberadas por células apoptóticas e patógenos. Estes receptores são denominados de “receptores padrão de reconhecimento”, e são encontrados por exemplo, em neutrófilos, monócitos, macrófagos, células epiteliais e em células dendríticas (PARK; LEE *et al.*, 2013; LOCATI; MANTOVANI; SICA, 2013).

O receptor reconhece um determinado estímulo, ocasionando alterações na superfície celular de modo a promover a captação de uma partícula, ou a sinalização e a expressão de determinados genes. Dentre estes “receptores padrão de reconhecimento”, destacam-se principalmente os receptores tipo Toll (TLRs) que estão localizados nas membranas plasmáticas, e detectam micro-organismos extra e intracelulares, dos quais reconhecem principalmente lipopolissacarídeos (LPS) de gram-negativos (PARK; LEE, 2013).

O LPS é uma molécula que apresenta elevada toxicidade derivada da membrana celular externa de bactérias gram-negativas, sendo capaz de desencadear vias de sinalização intracelular, atuando através de sua interação com receptores de membrana sob a presença de proteínas de ligação LBP (*Lipopolysaccharide Binding Protein*). As proteínas acessórias LBP e o CD14 permitem o reconhecimento sensível do LPS, bem como sua transferência eficiente para o complexo TLR. A LBP que é uma proteína solúvel, tem uma estrutura alongada com alta afinidade pelo LPS, e o CD14 que se encontra presente na membrana celular, fornece a ligação para o LPS. Portanto LBP apresenta o LPS ao CD14 ligando-o ao LPS e, por sua vez, CD14 entrega LPS ao complexo TLRs conforme a Figura 1 (PARK; LEE, 2013; KIM; KIM, 2017).

Atuando como um importante ativador de células fagocíticas como neutrófilos e monócitos/macrófagos, o LPS atua no reconhecimento, possibilitando a ativação de fatores de transcrição que estimulam a produção de diversas proteínas de membrana que liberam a produção de mediadores da inflamação como óxido nítrico (NO), prostaglandinas, fatores de crescimento tumoral, espécies reativas de oxigênio (EROS), ocorrendo a ampliação da resposta inflamatória, e o desencadeamento de diversas respostas moleculares e celulares, como o aumento da fagocitose, e a captação, migração e adesão nas respostas primárias essenciais

destas células, possibilitando a eliminação destes patógenos (ROUGERIE *et al.*, 2013; PARK; LEE, 2013).

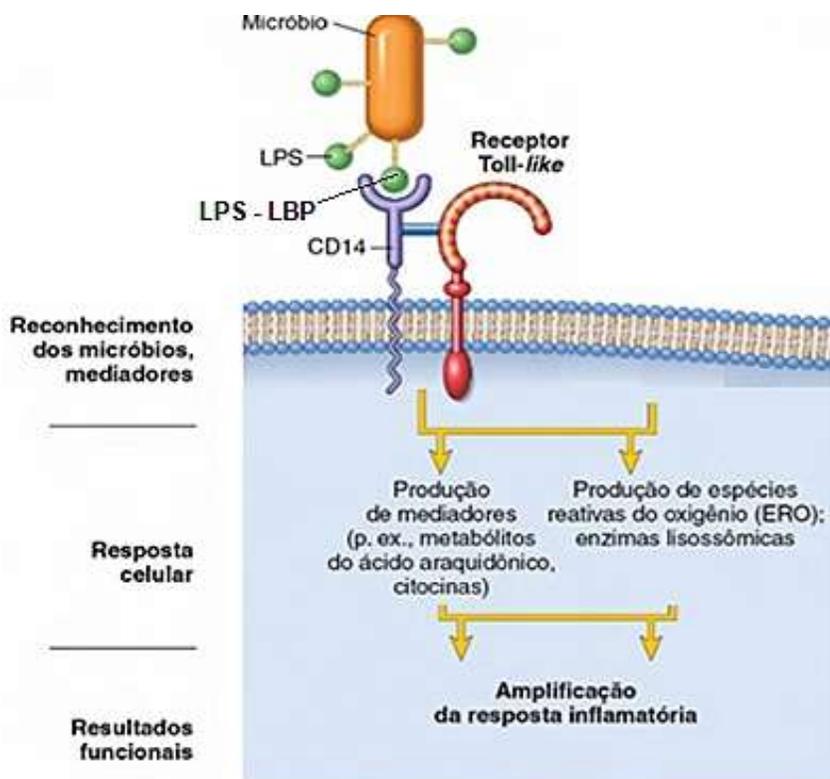


Figura 1. Ativação dos leucócitos. Receptor TLRs de superfície dos leucócitos reconhecem diferentes estímulos. Os receptores iniciam as respostas que medeiam as funções dos leucócitos. O lipopolissacarídeo (LPS) através da sua proteína LBP, apresenta o LPS ao CD14 que ao se ligar ao LPS, o transfere ao complexo TLRs desencadeando respostas celulares. Fonte: Robbins, 2013 adaptado.

Vale a pena destacar, que os efeitos anti-inflamatórios e pró-resolutivos referem-se principalmente a uma ação inibitória com o objetivo de interromper por exemplo, o extravasamento de células imunes - marca registrada da inflamação aguda - e também estimular ações de resolução que ativem processos específicos, como apoptose ou eferocitose, de forma a alcançar um equilíbrio na resposta inflamatória (SUGIMOTO *et al.*, 2016).

Durante todo este processo inflamatório, os neutrófilos, também conhecidos como células polimorfonucleares (PMN), são os leucócitos circulantes mais abundantes do sistema imunológico humano, contribuindo cerca de 50-70% de todos os leucócitos circulantes em adultos saudáveis, atuando como a primeira linha de defesa imunológica respondendo rapidamente sinais inflamatórios após infecção

ou dano tecidual migrando para a área inflamada (KRUGER *et al.*, 2015; MORTAZ *et al.*, 2018).

Uma vez ativados, eles reconhecem o estímulo e migram para o local da inflamação por adesão às células endoteliais, seguido pela migração através das paredes vasculares. Lá eles "engolem" patógenos invasores através da fagocitose, matando agentes infecciosos, como bactérias para eliminá-los. Essa função é alcançada por meio da liberação de enzimas proteolíticas, citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1, geração de óxido nítrico (NO), produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), quimiocinas e a liberação de proteases (elastase, MMPs de metaloproteinases) (KRUGER *et al.*, 2015; PAZ *et al.*, 2016; MORTAZ *et al.*, 2018).

Entretanto, apesar de abundantes no sangue, os neutrófilos predominam principalmente no infiltrado inflamatório inicial, uma vez que apresentam uma vida breve, morrendo por apoptose dentro de 24-48 horas devido a produção de mediadores lipídicos de pró-resolução, que regulam a produção de quimiocinas e citocinas, sendo substituídos em seguida pelos monócitos/macrófagos, cuja a função também é a fagocitose e eliminação do agente agressor conforme a figura 2 (MANTOVANI *et al.*, 2011; KUMMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

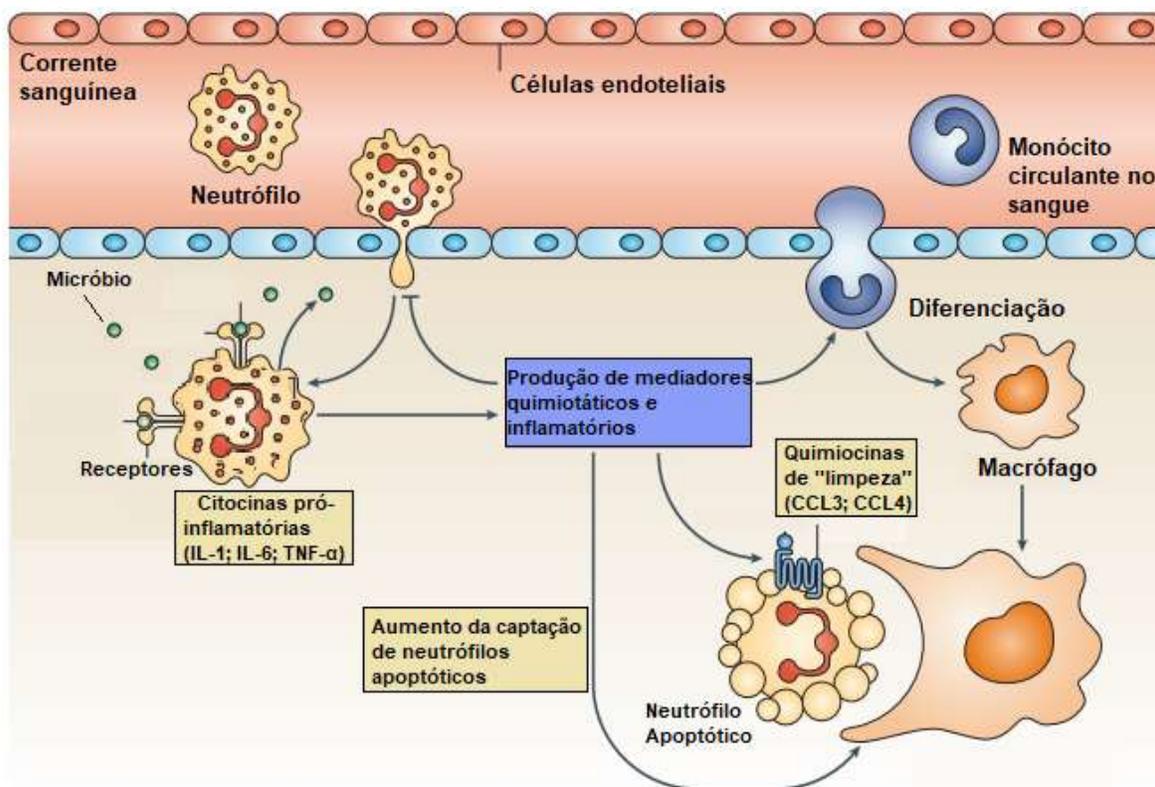


Figura 2. Processo de migração dos neutrófilos e sua substituição por macrófagos. Os neutrófilos se direcionam para o local inflamado, e englobam patógenos invasores por meio da fagocitose, desencadeando a liberação de enzimas proteolíticas, e de citocinas pró-inflamatórias que ampliam a resposta. Após 24-48h, ocorre a regulação da resposta pela produção de mediadores quimiotáticos e inflamatórios, ocorrendo assim a sua substituição pelos monócitos/macrófagos. Fonte: Mantovani et al., 2011 adaptado.

2.2. Monócitos e Macrófagos

Os monócitos são leucócitos circulantes que possuem um importante papel tanto na imunidade inata quanto na adaptativa, funcionando principalmente na defesa imune, na inflamação e na remodelação dos tecidos. Durante a inflamação, os monócitos circulantes no sangue saem da corrente sanguínea e são direcionados para o tecido lesionado após o recrutamento de leucócitos na cascata inflamatória, onde ocorre o condicionamento por fatores locais de crescimento, citocinas pró-inflamatórias que desencadeiam a sua diferenciação. Eles podem se diferenciar em macrófagos e/ou células dentríticas dependendo do estímulo a que está sujeito (SHI;PAMER, 2011; KRATOFIL;KUBES; DENISET, 2017).

A população de monócitos é heterogênea e na corrente sanguínea são encontrados os derivados de precursores da medula óssea, no qual são

subdivididos em subconjuntos de acordo com a presença de moléculas específicas e com a expressão do receptor de quimiocina que o diferem em tamanho, tráfego, expressão inata do receptor imune e na capacidade de diferenciar após estímulos de citocinas, tornando desta forma a sua capacidade de mobilização e fluxo para onde eles são essenciais na promoção da defesa imunológica durante a infecção e na condução de doenças inflamatórias (SHI;PAMER, 2011).

Entre os subconjuntos em humanos que são mobilizados a partir da medula óssea e recrutados para locais de inflamação, são classificados de acordo com a base nos níveis de expressão CD16 e de CD14, um receptor de imunoglobulina e um componente do complexo receptor de lipopolissacarídeos, respectivamente. Portanto, são descritos como: os monócitos clássicos (CD14 ++ CD16-), os intermediários (CD14 + CD16 +) e os não clássicos (CD14 + CD16 ++), sendo os monócitos clássicos o mais envolvido na inflamação (SHI; PAMER, 2011; KRATOFIL;KUBES; DENISET, 2017).

Predominantes no sangue, os monócitos clássicos expressam principalmente altos níveis do receptor de quimiocina CCR2 e baixos níveis de CX3CR1 produzindo principalmente IL-10 e IL-1 e podem migrar para locais de lesão e infecção onde se diferenciam em macrófagos inflamatórios (AUFRAY, 2009; ZHU; THOMAS; HEDRICK, 2016). Em contraste com esse importante subconjunto, os monócitos intermediários foi proposto como sendo um monócito em transição de um monócito clássico para não clássico, eles por sua vez expressam altos níveis de CX3CR1 e baixos níveis de CCR2, e são responsáveis principalmente pela produção de TNF- α em resposta à estimulação do LPS (AUFRAY,2009; KRATOFIL; KUBES; DENISET, 2017). E os monócitos não clássicos, conhecidos como monócitos de patrulha, também apresentam altos níveis do receptor de quimiocina CX3CR1 e exibem uma capacidade de patrulhar a vasculatura em repouso e remover detritos (ZHU; THOMAS; HEDRICK, 2016).

Dentre estes, principalmente os monócitos inflamatórios trafegam seletivamente para os locais da inflamação, produzindo citocinas, sendo altamente infiltrativo e atraído por mediadores quimiotáticos e inflamatórios, possibilitando assim a sua conversão em macrófagos, resultando em algumas transformações que lhe permitem assegurar importantes funções fisiológicas, como por exemplo, o aumento na sua capacidade fagocítica (YANG *et al.*, 2014).

Considerados células hematopoiéticas mononucleares fagocíticas, os macrófagos apresentam mecanismos microbicidas mais sofisticado que os monócitos, já que sua elevada capacidade fagocítica deve-se por apresentar principalmente maior quantidade de vesículas intracelulares - lisossomos e fagolisossomos, que são organelas citoplasmáticas capazes de degradar partículas -. A ingestão destes micróbios ocorre através do reconhecimento por receptores de superfície celular, e os macrófagos assim como os monócitos, também expressam estes receptores que ativam as células para produzir citocinas e substâncias microbicidas e receptores que estimulam a migração/quimiotaxia das células para locais de infecção (LOCATI; MANTOVANI; SICA, 2013; ZHANG; WANG, 2014).

Além de amplamente importantes no sistema imunológico do hospedeiro contra patógenos como micro-organismos estranhos, incluindo bactérias, vírus, fungos e parasitas, fagocitando estes patógenos e células mortas, os macrófagos, também atuam apresentando antígenos, produzindo mediadores inflamatórios como citocinas pró (IL-1 β ; IL-6 e o TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10), atuando como células sentinelas para sentir sinais de perigo de invasores e/ou de danos nos tecidos (LIU; YANG, 2012; FRANKEN; SCHIWONAND; KURTS, 2016).

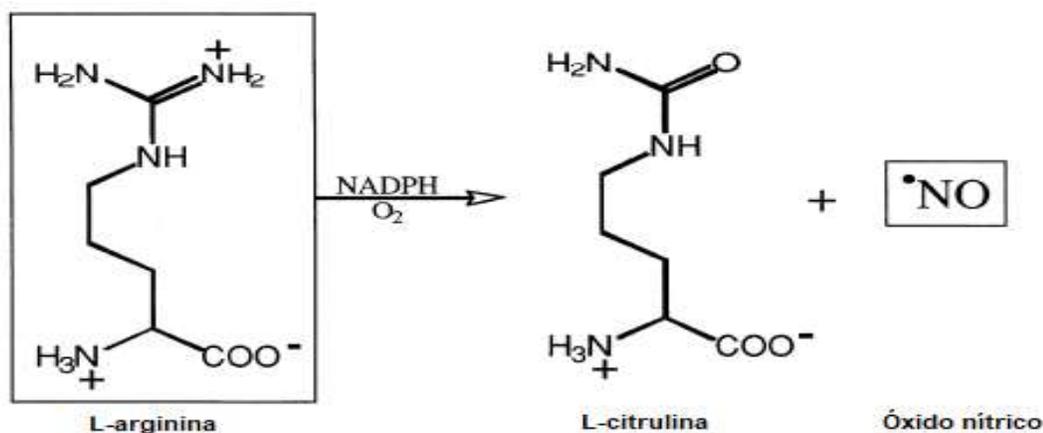
É importante destacar ainda, que estas células também são encontradas residindo órgãos do hospedeiro, sendo denominados como macrófagos residentes/teciduais, recebendo denominações específicas de acordo com a sua localização, como por exemplo, no fígado são denominados Células de Kupffer, e nos rins células mesenquimais (LOCATI; MANTOVANI; SICA, 2013; ZHANG; WANG, 2014).

Portanto, durante a inflamação após a apoptose dos neutrófilos, as células mononucleares especializadas, como monócitos/macrófagos e linfócitos, são recrutados para o local, e os macrófagos se mobilizam e participam da produção por meio da ativação e regulação de células efetoras inflamatórias/imunes (LIU; YANG, 2012). Os macrófagos residentes/teciduais são estimulados por receptores de reconhecimento levando a ocorrer a ativação e associação com uma série de genes de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 e TNF- α , que uma vez ativados as células desempenham um papel fundamental no início da inflamação. Além da resposta imune inata mediada por TLRs, os micróbios são opsonizados por

anticorpos específicos e complementam caminhos (LIU; YANG, 2012; HAMIDZADEH *et al.*, 2017).

2.3. Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, incolor, inorgânico, gasoso que possui vida curta, e no organismo é produzido enzimaticamente pela oxidação de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) da L-arginina em L-citrulina, catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) conforme a figura 3 (SPROSTON *et al.*,



2018).

Figura 3. Síntese de óxido nítrico por óxido nítrico sintase (NOS). O óxido nítrico é gerado pela óxido nítrico sintase (NOS) na presença de NADPH e oxigênio. Fonte: Giulivi, 2003 adaptado.

Existem três isoformas diferentes da NOS enzimas: NOS endotelial (eNOS ou NOS3); NOS neuronal (nNOS ou NOS1); e NOS induzível (iNOS ou NOS2). O nNOS é expresso sobretudo por neurônios no cérebro e no sistema nervoso, enquanto o eNOS é expressa basicamente pelas células endoteliais na vasculatura e a iNOS manifestando em resposta a estímulos inflamatórios, devido a estímulos bacterianos, citocinas e mediadores lipídicos. Este radical ao ser degradado pelo oxigênio, sua oxidação produz nitrito (NO_2), e nitrato (NO_3). Há ainda a possibilidade destes metabólitos serem convertidos novamente em NO ao sofrerem ação de substâncias redutoras presentes na membrana celular (CALCERRADA; PELUFFO; RAD, 2011; SPROSTON *et al.*, 2018).

Na inflamação mediada por leucócitos como neutrófilos, monócitos e macrófagos, o NO apresenta diversas funções biológicas, incluindo vasodilatação e neurotransmissão, apresentando propriedades que permitem que seja facilmente

solúvel e capaz de difundir através das membranas celulares para conduzir processos intracelulares regulando processos como a adesão de leucócitos e transmigração, proliferação, apoptose e expressão de citocinas (CALCERRADA; PELUFFO; RADI, 2011; GARCIA-ORTIZ; SERRADOR, 2018).

Quando liberado por exemplo, em macrófagos teciduais durante a fagocitose apresenta atuação como um *feedback* positivo, levando ao recrutamento de outros fagócitos. Entretanto, níveis excessivos do NO durante a inflamação aguda ou crônica podem levar à destruição do tecido devido a modulação da atividade leucocitária, comum em doenças autoimunes e inflamatórias, sendo o nível de NO produzido também regulado de acordo com o nível transcricional dependendo do tipo de célula e da natureza da estimulação envolvidos (LO FARO *et al.*, 2014; SPROSTON *et al.*, 2018).

Devido a sua versatilidade na indução de respostas variáveis, sugere-se ter efeitos pró e anti-inflamatórios dependendo de “onde” e “quanto” NO é produzido. Apesar de por exemplo, baixas quantidades de NO derivados da eNOS sejam benéficos, pois, podem inibir a adesão e migração de células inflamatórias. Por outro lado, as quantidades relativamente grandes de NO produzidas principalmente por iNOS após estimulação por lipopolissacarídeo (LPS) ou citocinas inflamatórias (por exemplo, IL-1 β e TNF- α) durante a modulação da inflamação indicam que a inibição das vias NO é frequentemente benéfica no tratamento de doença inflamatória (LO FARO *et al.*, 2014).

2.4. *Libidibia ferrea* L., ex *Caesalpinia ferrea*

2.4.1. Aspectos geográficos, botânicos e etnofarmacológicos

Anteriormente classificada como *Caesalpinia ferrea*, pertencente à família Leguminosae – Caesalpinioideae, a *Libidibia ferrea* L. var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P é uma angiosperma de porte médio nativo do Brasil, sendo comumente conhecida como “jucá” ou “pau-ferro”, sendo encontrada por todo Brasil, com destaque principalmente nas regiões norte e nordeste. (FREITAS *et al.*, 2012; CAVALHEIRO *et al.*, 2009).

A árvore de *L. Ferrea* pode chegar a altura entre 10 e 15 m de altura e possui um tronco fino com um diâmetro de 40 a 60 cm apresentando pontos pálidos em seu tronco como manchas clareadas (Figura 4A e 4B). As folhas são verdes e de um tipo

composto bipinadas podendo medir de 7 a 20 cm de comprimento (Figura 4C) (GALDINO; MESQUITA; FERRAZ 2007; FERREIRA; SOARES, 2015). A sua floração em cachos pequenos, vistosos e amarelados, percorrendo até o início da estação chuvosa (Figura 4D e 4E) (GALDINO; MESQUITA; FERRAZ 2007).

O período da sua frutificação ocorre durante o final da estação seca e se mantém até a estação chuvosa (GALDINO; MESQUITA; FERRAZ 2007). Os seus frutos são denominados como vagens, possuem cor esverdeada quando ainda imaturos, porém sua coloração é alterada quando atinge a maturação apresentando a cor marrom escura, seus frutos possuem ainda um aspecto achatado, e oblongado, com formato bacóide, medindo em torno de 1 cm de espessura e 10 cm de largura (Figura 4F) (GALDINO; MESQUITA; FERRAZ 2007; EMBRAPA, 2017).

As sementes apresentam coloração entre o verde para a amarelado, consistência firme e aspecto rugoso, formato discoide, na base achatada e ápice arredondado, sendo separadas em cavidades individuais visíveis e apresentam disposição unisseriada e transversal, e tamanho médio de 0,9 x 0,5 x 0,5 cm (Figura 4F) (GALDINO; MESQUITA; FERRAZ 2007).

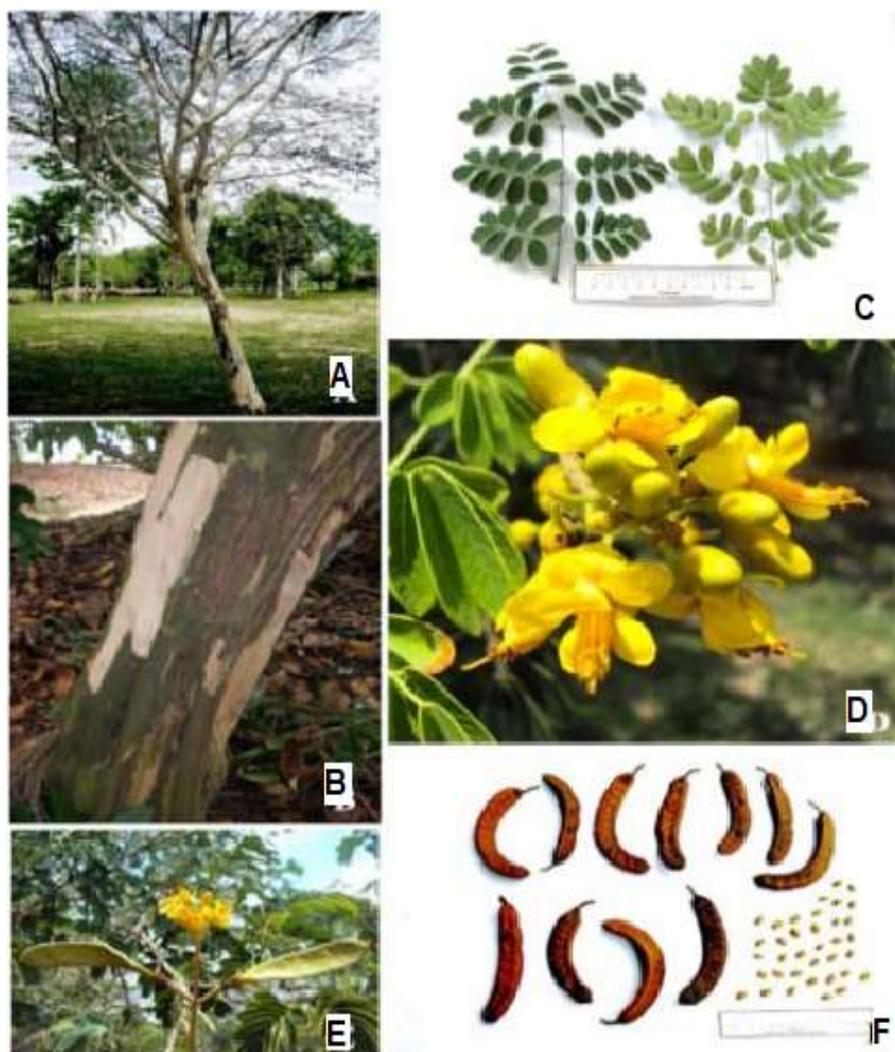


Figura 4.: Imagens de *Libidibia ferrea* L. (A) Árvore de *L. ferrea*. (B) Detalhes do tronco com pontos pálidos. (C) Folhas. (D) Flores. (E) Inflorescência e frutas. (F) Frutas e sementes. Fonte: Costa; Guilhon-Simplicio; Souza, 2015. Créditos das fotos: Dr. Luís Souza / INPA

2.4.2. Aspectos fitoquímicos

Em sua composição, estudos fitoquímicos mostraram a presença de diversos componentes ativos a partir de diferentes partes da planta de *Libidibia ferrea* L. nos extratos hidroalcoólicos e aquosos da casca de caule, vagens e folhas com a presença de triterpenos, sesquiterpenos, saponinas, taninos, alcaloides e flavonoides, esteroides e cumarinas (GONZALEZ *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2008).

Dentre os componentes de maior quantidade e importância medicinal, os taninos que são polifenóis, tem sido caracterizados principalmente nas classes de

metabólitos secundários que apresentam diversas atividades farmacológicas (UEDA *et al.*, 2001). Além disso, estudos reforçam a ampla presença destes polifenóis nos extrato da *L.ferrea*, como Ueda *et al.*, 2001 que isolaram e identificaram o ácido elágico como um dos componentes presentes de extrato a partir dos frutos secos. Nakamura *et al.*, 2002 e Silva *et al.*, 2013 também durante o processo de extração e isolamento dos componentes presentes nos frutos, identificaram principalmente a presença de polifenóis como o de ácido gálico e galato metilado.

A presença de ácido gálico e quercetina em extratos a partir das folhas é também comumente encontrada, como descrita por Port's *et al.* 2013 e por Silva *et al.*, 2014. A literatura relata ainda, a presença de chalconas presente nesta espécie, sendo encontrado amplamente a partir dos caules de *L.Ferrea* como o pauferrol (NOZAKI *et al.*, 2007; OHIRA *et al.*, 2013).

2.4.3. Aspectos farmacológicos

Devido a estes fatores presentes na sua composição, cada vez mais estudos tem destacado o seu uso na medicina popular, no qual a planta de *Libidibia ferrea* L. tem demonstrado uma grande diversidade de propriedades terapêuticas tais como: cicatrizante, anti-inflamatório, antidiabético, antidiarreico, anti-térmico, antimicrobiano (CAVALHEIRO *et al.*, 2009; SAMPAIO *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2012).

2.4.3.1. Frutos (Vagem)

Do ponto de vista farmacológico algumas das propriedades terapêuticas de *L. ferrea* têm sido descritas, como um estudo *in vivo* preliminar realizado por Carvalho *et al* (1996) acerca do extrato aquoso bruto dos frutos de *Caesalpinia ferrea* (jucá) afim de investigar possíveis propriedades anti-inflamatórias e analgésicas através do edema da pata traseira induzido por carragenina em ratos Wistar. Para avaliar a atividade analgésica as contrações musculares foram induzidas pela injeção intraperitoneal, o extrato bruto aquoso dos frutos de *C.ferrea* foi administrado em doses de 10 mg/kg e 20 mg/kg. E para avaliar a atividade anti-inflamatória, os camundongos foram tratados por via oral com 300mg/kg de extrato bruto aquoso. O edema da pata traseira foi significativamente inibido pela administração oral de 300mg/kg do extrato. E quanto ao efeito analgésico houve uma redução dose-dependente no número de contorções totais induzidas pelo ácido acético.

Afim de verificar o potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos do *Libidibia ferrea* L. (jucá), Kobayashi *et al* (2015) realizaram um estudo *in vivo* onde utilizaram 24 ratos Wistar divididos aleatoriamente em quatro grupos (G1 a G4), de seis animais cada, sendo o Grupo 1 (G1) tratado com NaCl 0,9%, o Grupo 2 (G2) com digliconato de clorexidina a 1%, o Grupo 3 (G3) com extrato de *L.ferrea* a 12,5% e o Grupo 4 (G4) com extrato de *L.ferrea* a 50%. Todos os tratamentos foram realizados pela via tópica a cada 24 horas. Para a confecção das feridas, foi retirado um fragmento de pele da região interescapular dorsal por animal. Os ferimentos foram avaliados macroscopicamente quanto à coloração do leito da ferida, presença de crostas, exsudação e prurido, diariamente. As mensurações do diâmetro maior e menor das feridas foram realizadas a cada 72 horas. No nono dia do experimento, foi retirado um fragmento de pele do dorso. Os fragmentos de pele foram fixados em formalina 10% e processados para histopatologia para avaliação da fase proliferativa da cicatrização. Os achados histopatológicos foram avaliados qualitativamente como ausente (0), discreto (1), moderado (2) e acentuado (3). Foi caracterizada histologicamente a fase inflamatória da cicatrização quando o infiltrado de neutrófilos e macrófagos estavam presentes; a fase proliferativa foi evidenciada pela proliferação vascular, fibroblástica e reepitelização. As feridas dos animais tratados com NaCl 0,9% apresentaram-se rosadas, sem exsudação ou qualquer outro sinal de infecção durante o período experimental. Todos os animais que receberam tratamento tópico com *L.ferrea* formaram crostas exuberantes de coloração marrom-escuro a preto sobre a ferida, sendo que os animais do G4 (*L. ferrea* 50%) formaram crostas maiores do que os do G3 (*L. ferrea* 12,5%). Em um animal do G3 houve o descolamento da crosta no sexto dia, durante a manipulação do animal. No G4, dois animais apresentaram desprendimento da crosta no quinto dia. O tempo de retração das feridas cutâneas de ratos Wistar, utilizando extrato etanólico dos frutos de *L. ferrea* a 12,5%, foi estatisticamente semelhante ao NaCl 0,9%. A concentração do extrato a 12,5% mostrou-se superior à concentração a 50%, demonstrando potencial cicatrizante do extrato.

Carvalho *et al* (2016) também avaliaram a atividade cicatrizante de uma pomada preparada a partir da vagem da *Libidibia ferrea* L. em lesões cutâneas em testes pré-clínicos em ratos. Foram selecionados dezoito ratos e dividiram em dois grupos; grupo controle positivo, tratado com Kollagenase® e grupo experimental,

tratado com a *Libidibia ferrea* L. As lesões foram clinicamente avaliadas em 0 - 21º dias. Foram realizadas análises histopatológica e clínica mostrando que a taxa de contração das lesões no grupo experimental foi menor do que no grupo controle, houve uma diminuição significativa na ferida do grupo tratado com a pomada da *L. ferrea*. Além disso, os dados morfométricos mostraram que nos dias 3 - 21º após o procedimento, o grupo experimental apresentou uma redução significativa na taxa de contração das lesões na pele. A análise histológica revelou também que os parâmetros clínicos e histológicos para o grupo experimental foram semelhantes aos do grupo controle. A *Libidibia ferrea* L. revelou atividade de cicatrização de feridas, mostrando retração da lesão na injúria causada nos animais experimentais, favorecendo assim a cicatrização. Entretanto, pesquisas adicionais são necessárias para identificar e estudar seus componentes bioativos na planta.

Com o objetivo de obter, caracterizar e avaliar um extrato do frutos de *Libidibia ferrea* L. quanto a sua viabilidade para formulação como enxaguatório bucal, Marreiro *et al.*, (2014) analisaram o pH, a sedimentação, densidade e estabilidade, assim como também realizaram testes microbiológicos do extrato. O teste microbiológico foi utilizado para verificar a presença de agentes contaminantes como o *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, fungos, leveduras, coliformes e por meio das concentrações inibitórias mínimas frente a cepas padrão de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis*. Os resultados de caracterização, avaliação microbiológica e concentração mínima inibitória foram tabulados e avaliadas por meio de estatística descritiva. O extrato de *L. ferrea* apresentou características estáveis, qualidade do produto e atividade antibacteriana frente aos micro-organismos testados independentemente dos intervalos de tempo experimentais. De acordo com esses resultados, pode-se concluir que a formulação de um enxaguatório bucal contendo extrato de *L. ferrea* no controle do biofilme é viável.

Conde *et al.*, (2015) realizaram um estudo tipo *screening* de espécies amazônicas para avaliar a ação antimicrobiana sobre micro-organismos formadores do biofilme dental *in vitro* através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por difusão em meio sólido e a Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA). Foram empregadas cepas padrão *S. sobrinus*; *S. mutans*; *S. mitis*; *S. sanguis*; *L. casei*. Oito espécies de plantas da Amazônia foram estudadas:

Carapa guianensis (Andiroba); *Aspidosperma nitidum* (Carapanauba); *Copaifera multijuga* (Copaíba); *Arrabidaea chica* (Crajiru); *Spilanthus acmella* (Jambu); *Eupatorium ayapana* (Japana-branca); *Libidibia ferrea* (Jucá); *Ocimum micranthum* (Alfavaca). Das espécies utilizadas, o estudo demonstrou que o Jucá, Crajiru, Alfavaca e a Copaíba apresentaram CIM com halos de inibição para todas as cepas ensaiadas, com valores de 62.5, 500, 1000 e 1000 mg/mL, respectivamente. Enquanto que na CIMA, os extratos de Jucá, Jambu e Crajiru inibiram a aderência em todas as cepas testadas. Portanto, os extratos de Jucá, Crajiru, Alfavaca e o óleo essencial de Copaíba tiveram apresentaram atividade antimicrobiana e os extratos de Jucá, Crajiru, Alfavaca, Jambu e os óleos de Copaíba e Andiroba conseguiram inibir a aderência microbiana.

Ferreira *et al.*, (2019) investigaram a ação do extrato hidroetanólico de frutos de *Libidibia ferrea* L. oral em adultos e embriões de *Danio rerio* (Zebrafish), enfatizando aspectos histopatológicos e alterações morfofuncionais, com possíveis alterações no nível orgânico-celular das brânquias, fígado, rins, intestino e embriões. O resultado obtido por LC-M / MS do extrato indicou uma alta concentração de possíveis substâncias poli-hidroxiladas. Na dose de 2 g / kg por via oral, produziu efeitos não significativos ou alterações dos órgãos analisados. No entanto, para embriões, o tratamento com diferentes concentrações demonstraram toxicidade cardíaca dependendo da concentração. Pode-se sugerir que o uso oral do extrato hidroetanólico de *L. ferrea* um grau aceitável de segurança para uso como medicamento oral, e os resultados nos embriões mostraram afinidade significativa para o coração; no entanto, é percebido que é dependente das concentrações utilizadas.

Falcão *et al.*, 2019a investigaram a composição fitoquímica do extrato bruto e frações de frutos de *L. ferrea* e também avaliaram *in vivo* suas atividades anti-inflamatórias, antinociceptivas e o efeito na viabilidade celular *in vitro*. Foi realizada a caracterização através da análise cromatográfica dos polifenóis presentes no extrato bruto, frações hidroalcoólicas de 20-80% de etanol (CE20, CE40, CE60 e CE80), fração aquosa (AqF) e frações de acetato de etila (EAF). A atividade inflamatória foi avaliada pelo uso de modelos de peritonite induzida por narração submetidos a um ensaio de migração de leucócitos e análise da atividade da mieloperoxidase. A atividade antinociceptiva foi avaliada pela escrita abdominal induzida por ácido

acético e pelo teste de platina. A viabilidade celular foi determinada pelo uso de MTT em uma células de fibroblastos embrionários. A cromatografia revelou a presença de teor de ácido elágico em EAF (3.06), CE (2.96) e CE40 (2.89). O ácido gálico foi encontrado em EAF (12.03), CE 20 (4.43) e CE (3.99). O extrato bruto de *L. ferrea* e todas as frações reduziram significativamente a migração de leucócitos e a atividade da MPO ($p < 0,001$). O efeito antioxidante de *L. ferrea* foi observado através de altos níveis de glutathiona total e redução dos níveis de MDA ($p < 0,001$). A nocicepção induzida por ácido acético foi significativamente inibida após a administração do extrato bruto de *L. ferrea* e de todas as frações ($p < 0,001$). O extrato bruto e todas as frações aumentaram significativamente a viabilidade da linhagem celular 3T3 ($p < 0,05$). O procedimento de extração adequado preserva os componentes químicos dos frutos de *L. ferrea*, como ácido gálico e ácido elárgico. O extrato bruto e as frações dos frutos de *L. ferrea* exibiram atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e antinociceptivas, no caso de avivamento e melhora da viabilidade celular no inversor.

2.4.3.2. Sementes

Cavalheiro *et al.*, (2009) pesquisaram as atividades biológicas e enzimáticas no extrato aquoso de sementes de *C. ferrea* na busca por compostos de interesse industrial e farmacológico. Foi realizada avaliação da toxicidade aguda, atividades hemolíticas, atividade antifúngica e antimicrobiana em meio sólido e, atividade anticoagulante. O extrato bruto das sementes *C. ferrea* não apresentou toxicidade aguda em camundongos mesmo quando administrada a dose máxima (0,3 mL.10g-1 de peso corpóreo). O extrato também não causou hemólise em eritrócitos de rato e coelho embora tenha sido relatada para essa espécie, a presença de compostos conhecidos por serem responsáveis pela atividade hemolítica, tais compostos como fenólicos e saponinas. Durante um período de aproximadamente 30 min, o extrato apresentou atividade anticoagulante, embora não tenha persistido. Os resultados dos ensaios de atividade antibacteriana em meio sólido mostraram que o extrato de *C. ferrea* não inibiu o crescimento de nenhuma das cepas bacterianas analisadas. Os resultados obtidos demonstram que o extrato de sementes de *C. ferrea* não apresentou atividade tóxica aguda, hemolítica, heparinásica, antibacteriana e antifúngica, entretanto apresenta anticoagulante, atividades essas indicativas da

presença de compostos bioativos de interesse farmacológico e/ou industrial. Estudos posteriores fazem-se necessários para identificação e purificação de tais compostos.

2.3.3.3. Folhas

Falcão *et al.*, 2019b realizaram análise cromatográfica do extrato aquoso bruto das folhas de *Libidibia ferrea* L. (Mart. Ex. Tul.) L.P. Queiroz para avaliar seu potencial antioxidante e anti-inflamatório *in vivo*. Os polifenóis presentes no extrato foram caracterizados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A atividade anti-inflamatória foi estudada em um modelo experimental de inflamação intra-articular induzida por zymosan, realizado em ratos Wistar tratados com o extrato nas doses de 100, 200 e 300 mg/kg por gavagem. O líquido sinovial foi coletado para contagem global de leucócitos, para a realização da análise espectroscópica de UV / VIS da atividade de mieloperoxidase (MPO), total glutathiona e malondialdeído (MDA) e para quantificação de citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α por meio do ensaio de imunoabsorção enzimática. A membrana sinovial foi coletada para análise histológica. O nível de significância estatística foi de $p < 0,05$. Na HPLC detectou concentrações de 1,56 (0,77) % m/m para ácido elágico e 1,20 (1,38) % m/m para ácido gálico. O tratamento com o extrato em todas as doses diminuiu significativamente o influxo de leucócitos no líquido sinovial ($p < 0,001$) e na atividade de mieloperoxidase ($p < 0,001$), um importante marcador de neutrófilos. O extrato em doses de 100 mg/kg ($p < 0,05$), 200 e 300 mg / kg ($p < 0,001$) também reduziram os níveis de MDA. E em doses de 200 e 300 mg / kg diminuiu significativamente os níveis de IL-1 β ($p < 0,05$) e TNF- α ($p < 0,001$). Todas as doses resultaram em níveis aumentados de glutathiona ($p < 0,001$). Achados histopatológicos confirmaram redução do infiltrado inflamatório nos ratos tratados com LfAE na dose de 200 mg / kg ($p < 0,05$). Portanto, o extrato bruto das folhas do *Libidibia ferrea* L. tem um importante efeito antioxidante e anti-inflamatório na inflamação intra-articular.

2.4.3.3. Casca do Caule

Oliveira *et al.*, (2010) realizaram um estudo *in vivo* avaliando a cicatrização de feridas cutâneas abertas em caprinos, tratados com uso tópico de pomada da casca de *Caesalpinia ferrea* mediante análise clínica, morfométrica, histopatológica e bacteriológica do processo cicatricial até o 21^a dia de pós-operatório. A aplicação

diária da pomada foi realizada sobre ferida circular padronizada de 16 cm² de área na região torácica de cada animal. Morfometricamente, as feridas do controle apresentaram áreas cirúrgicas menores e grau de contração maior que as do grupo tratado, entretanto, histologicamente, houve completa epitelização das feridas tratadas no 21º dia. No exame microbiológico realizado no momento da produção da ferida, não se observou crescimento bacteriano, demonstrando que o uso tópico da pomada de *Caesalpinia ferrea* apresentou efeito significativo na cicatrização da pele de caprinos.

Oliveira *et al.*, (2013) avaliaram a ação antimicrobiana *in vitro* do extrato da casca do caule e da vagem de jucá diante de micro-organismos da cavidade bucal. Foram empregados no estudo, extratos aquosos a 7,5% em diluições variando de 1:1 a 1:512, por meio da técnica de difusão em ágar. Foram usadas cepas padrão de *Streptococcus salivarius*; *Streptococcus mutans*; *Streptococcus oralis*; *Lactobacillus casei* e a *Candida albicans*. A clorexidina 0,12% foi utilizada como controle positivo. Os resultados da difusão em ágar certificaram que quando avaliado frente ao *L. casei*, o extrato da vagem mostrou-se mais efetivo, com CIM em 9,3 mg/ml quando comparado à CIM da casca que foi 37,5 mg/ml. Além disso, quando o extrato da vagem foi testado diante aos *S. oralis* e *S. mutans* os valores de CIM foram iguais e o dobro, respectivamente, quando comparados com os valores obtidos com o extrato da casca do caule. Em relação a *C. albicans*, o valor de CIM para o extrato da vagem e da casca do caule foi 18,7 mg/ml. E a frente do *S. salivarius* o extrato da casca do caule teve valor de MIC 37,5 mg/ml e o extrato da vagem não apresentou atividade. Portanto, o extrato da casca do caule de jucá apresentou atividade antimicrobiana satisfatória frente aos patógenos da cavidade bucal e superior ao extrato da vagem.

Com o intuito de testar a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da casca de *Libidibia ferrea* L., Paiva *et al.*, (2015) testaram o extrato em diferentes concentrações contra micro-organismos causadores de mastite em caprinos. Foram isoladas 18 estirpes bacterianas de cabras com mastite crescidas em meio ágar sangue as quais foram transferidas para caldo BHI (Infusão cérebro-coração) e após o crescimento, foi feito o teste antimicrobiano pela técnica de difusão em discos, usando os seguintes antibióticos: ampicilina, cefalexina, gentamicina, penicilina g e oxacilina. Foram testadas também três concentrações de extrato hidroalcoólico de *L.*

ferrea (extrato bruto, extrato 70% (v/v) e extrato 50% (v/v)). Os micro-organismos isolados apresentaram alta resistência a ampicilina, penicilina G e oxacilina, apresentando resistência de 88, 83 e 77%, respectivamente. O extrato bruto apresentou uma eficiência de 61,1% na inibição dos micro-organismos em teste. O extrato hidroalcoólico bruto da casca de *L. ferrea* tem potencial como antimicrobiano natural contra micro-organismos causadores de mastite caprina.

2.5. Ácido Gálico

O ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) é um ácido fenólico que apresenta aspecto sólido cristalino, ligeiramente incolor ou ligeiramente amarelo e seu peso molecular é de 170,11954 g/mol e sua fórmula molecular é $C_7H_6O_5$ (FERNANDES; SALGADO, 2015). É amplamente encontrado em diversas famílias de plantas superiores, e pode ser encontrado no estado livre e também como parte de taninos, ou como parte de moléculas mais complexas, como derivados ésteres ou polímeros. Na natureza, o ácido gálico e seus derivados estão presentes praticamente em quase todas as partes da planta, como casca, folha, fruto, raiz e semente (DAGLIA *et al.*, 2014; CHOUBEY *et al.*, 2015). Sua estrutura química é mostrada conforme a Figura 5.

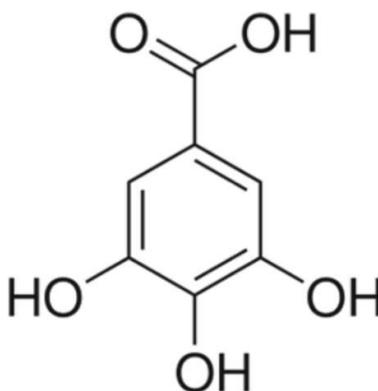


Figura 5. Imagem da estrutura química do ácido gálico. Fonte: Fernandes; Salgado, 2015.

Muitas vezes considerado como princípio ativo de plantas medicinais, os ácidos fenólicos possuem um vasto potencial terapêutico, sendo amplamente estudados de maneira isolada ou em extratos de plantas (CHOUBEY *et al.*, 2015). Na literatura, como supracitado no item 2.4.2 acerca dos estudos fitoquímicos

realizados na *Libidibia ferrea* L., ressaltam existência marcante de ácidos fenólicos como o ácido gálico (UEDA *et al.*, 2001; NAKAMURA *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2013; FALCÃO *et al.*, 2019). Em vista disto, o ácido gálico é usualmente classificado como um dos principais marcadores da *Libidibia ferrea* L., isto é, considerado como um componente presente na matéria-prima vegetal, que tem íntima correlação com o efeito terapêutico, sendo assim utilizado como referência no controle da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos (SANTOS; ALMEIDA, 2016).

2.5.1. Aspectos farmacológicos do ácido gálico

Ao atuar de maneira isolada, o ácido gálico tem despertado o interesse dos pesquisadores por suas atividades farmacológicas como anticarcinogênicos, antimicrobianos, agentes antimutagênicos, antiangiogênicos e anti-inflamatórios, além do uso em tratamento de doenças críticas como depressão, câncer, infecções microbianas, doenças lipídicas (CHOUBEY *et al.*, 2015).

Liang *et al.*, 2012 ao avaliarem os efeitos antitumorais do ácido gálico (GA) no osteossarcoma em duas linhas celulares humanas de osteossarcoma U-2OS e MNNG / HOS, que foram manuseadas em meio de cultura e tratados com ácido gálico. Em seguida, submetidos a ensaios de proliferação celular e apoptose. Os resultados mostraram que o ácido gálico inibiu a proliferação e induziu a apoptose do osteossarcoma, acompanhadas pela regulação positiva da ativação de p-38 e regulação negativa da c-Jun c-Jun N-terminal (JNK) e ativação da quinase regulada por sinal extracelular (ERK1 / 2). Adicionalmente, o inibidor da p38 MAPK anulou a inibição do crescimento induzida por ácido gálico das células de osteossarcoma, enquanto os inibidores de JNK ou ERK1/2 sensibilizaram as células de osteossarcoma à inibição do crescimento induzida pelo ácido gálico. Este estudo demonstrou o potencial antitumoral da ácido no osteossarcoma que é mediada pela modulação da proliferação celular, apoptose e angiogênese, podendo ser um potente agente para intervenção em osteossarcoma.

Afim de investigar de explorar o efeito do ácido gálico na morfologia e no crescimento de cristais de hidroxiapatita Tang *et al.*, 2014, produziram os cristais misturando cloreto de cálcio (CaCl₂) e fosfato monopotássico (KH₂PO₄) com ou sem ácido gálico (4g/L) à temperatura ambiente por 3, 12, 24h e 3, 7, 14 dias. Posteriormente, a microestrutura, morfologia e composição dos cristais foram

investigadas por MEV, DRX, ATR-FTIR e microscopia de fluorescência. A fase mineral do hidroxiapatita em ambos os grupos após 14 dias, mas seus processos e morfologia foram completamente diferentes. Os cristais dos grupos que usaram o ácido gálico por 14 dias eram do tipo ouriço, enquanto cristais soltos do tipo agulha foram observados nos grupos sem ácido gálico. Os resultados de DRX indicaram que o ácido gálico pode limitar o crescimento dos cristais e os resultados da ATR-FTIR e microscopia de fluorescência revelaram que estruturas únicas podem ser causadas pela participação de ácido gálico durante a formação de cristais. O ácido gálico demonstrou que pode afetar e participar da formação da hidroxiapatita e regular a morfologia e a estrutura dos cristais, para aprimorar o processo de remineralização.

BenSaad *et al.*, 2017 investigaram o efeito do ácido gálico sobre mediadores de inflamação *in vitro* em macrófagos RAW 264.7. Os compostos de ácido gálico e punicalagina A&B foram isolados do *Punica granatum* (romã) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e posteriormente identificado por espectrometria de massa (MS). Os efeitos inibitórios do ácido gálico foram avaliados na produção de NO induzido por LPS pelo reagente de Griess, PGE-2 e IL-6 pelo kit de imunoenensaio de ELISA e a prostaglandina E2 e COX-2 por *Western blotting*. Os resultados obtidos neste estudo indicam que o o ácido gálico isolado de *P. granatum* inibiram a produção de NO, PGE2 e IL-6 em macrófagos RAW267.4 induzidos por LPS. Portanto, o ácido gálico pode ser um dos compostos responsáveis pelo efeito anti-inflamatório de *P. granatum*. No entanto, existem algumas limitações neste estudo; controles positivos não foram utilizados. Portanto, são necessários mais estudos para indicar se os resultados obtidos no estudo são relevantes para a saúde humana.

Li *et al.*, 2017 investigaram os efeitos inibitórios do ácido gálico em cepas de fungos *in vitro* e *in vivo*. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método padrão NCCLS (M38-A e M27-A2) *in vitro* diante de trinta estirpes de fungos pertencentes a nove espécies, e constatou-se que o ácido gálico possui um amplo espectro de atividade antifúngica, com CIMs para todas as cepas de dermatófitos testadas entre 43,75 e 83,33 µg / mL. O ácido gálico também foi ativo contra três linhagens de *Candida*, com CIMs entre 12,5 e 100,0 µg / mL. As espécies de *Candida* mais sensíveis foram *Candida albicans* (CIM = 12,5 µg / mL), e as espécies

filamentosas mais sensíveis foram *Trichophyton rubrum* (CIM = 43,75 µg / mL), que foi comparável em potencial com o controle, o fluconazol. O mecanismo de ação anti-fúngico foi investigado através da inibição da biossíntese de ergosterol usando um ensaio baseado em HPLC e um ensaio imunossorvente ligado a enzima. O ácido gálico reduziu a atividade da esteroide 14 α -desmetilase P450 (CYP51) e do esqualeno epoxidase na membrana do *T. rubrum*, respectivamente. O modelo *in vivo* demonstrou que a administração do ácido gálico por injeção intraperitoneal (80 mg / kg d) aumentou significativamente a taxa de cura em um modelo de infecção por camundongos da infecção fúngica sistêmica. Os resultados confirmam os efeitos antifúngicos do ácido gálico e um mecanismo de ação, sugerindo que o ácido gálico tem potencial para se desenvolver ainda mais como um agente antifúngico natural para uso clínico.

Santos *et al.*, 2018 avaliaram o potencial do ácido gálico para modular a proliferação celular induzida por leptina e a migração de linhagens celulares de carcinoma espinocelular oral. O efeito do ácido gálico na secreção de leptina pelas células do carcinoma epidermoide oral, bem como os mecanismos moleculares subjacentes, também foram avaliados. Para isso, foram realizados ensaios de proliferação, migração, imunocitoquímica e qPCR. Os níveis de expressão de genes relacionados à migração celular (MMP2, MMP9, Col1A1 e E-caderina), angiogênese (HIF-1 α , mir210), sinalização de leptina (LepR, p44 / 42 MAPK), apoptose (casp-3) e os níveis de leptina secretada por células de carcinoma epidermoide oral também foram medidos. O ácido gálico diminuiu a proliferação e a migração de células de carcinoma epidermoide tratado com leptina e reduziu a expressão de mRNA de MMP2, MMP9, Col1A1, mir210, mas não alterou o HIF-1 α . O ácido gálico diminuiu os níveis de leptina secretada pelas células do carcinoma de células escamosas orais, de acordo com a regulação negativa da expressão de p44 / 42 MAPK. Portanto, o ácido gálico possibilitou a quebra do fenótipo neoplásico das células do carcinoma epidermoide oral, interferindo na via da leptina.

Karatas e Gevrek, 2020 realizaram um estudo com o objetivo de avaliar os efeitos anti-inflamatórios do ácido gálico na periodontite experimental em ratos Wistar, avaliando a perda óssea alveolar, a atividade osteoclástica, a atividade osteoblástica e a atividade da colagenase também foram determinadas. Foram utilizados no presente estudo 32 ratos Wistar. Os grupos de estudo foram criados da

seguinte forma: Grupo controle saudável (n = 8); grupo com periodontite (n = 8); periodontite + administração de 30 mg/kg de ácido gálico (n = 8); periodontite + administração de 60 mg/kg de ácido gálico (n = 8). A periodontite experimental foi criada com a colocação de suturas de seda em torno do primeiro molar inferior direito. As alterações morfológicas no osso alveolar foram determinadas por avaliação estereomicroscópica. As mandíbulas foram submetidas a avaliação histológica. Determinou-se a matriz metaloproteinase da matriz (MMP-8), inibidor tecidual das MMPs (TIMP) -1, expressões de proteína morfogenética óssea (BMP) -2, células osteoclásticas positivas para fosfatase ácida resistente a tartarato (TRAP), osteoblastos e contagem de células inflamatórias. A maior perda óssea alveolar foi observada no grupo periodontite. Ambas as doses de ácido gálico diminuíram a perda óssea alveolar em comparação com periodontite. As contagens de células de osteoclastos TRAP-positivas foram maiores no grupo com periodontite, e o ácido gálico reduziu com sucesso essas contagens. As células osteoblásticas também aumentaram nos grupos administrados com ácido gálico. A inflamação foi menor nos grupos que houve a administração de ácido gálico, apoiando o papel do ácido gálico na prevenção da inflamação. As doses de 30 e 60 mg/kg de ácido gálico diminuíram os níveis de MMP-8 e aumentaram os níveis de TIMP-1. Os níveis de BMP aumentaram nos grupos administrados com ácido gálico, semelhantes a vários osteoblastos. Estes resultados revelaram um efeito anti-inflamatório do ácido gálico, indicado pela diminuição da perda óssea alveolar e atividade da collagenase e aumento da atividade osteoblástica.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL:

- O objetivo deste estudo foi analisar *in vitro* os efeitos citotóxicos e anti-inflamatórios do extrato da *Libidibia ferrea* L. em macrófagos RAW 264.7 e monócitos de sangue periférico humano;

3.2. OBJETIVOS PRIMÁRIOS:

- Avaliar *in vitro* a viabilidade celular do extrato da *Libidibia ferrea* L. sobre macrófagos RAW 264.7 e monócitos de sangue periférico humano estimulados por lipopolissacarídeos (LPS);
- Analisar *in vitro* a atividade anti-inflamatória dos extrato da *Libidibia ferrea* L. e do ácido gálico sobre as culturas celulares de macrófagos RAW 264.7 e em monócitos de sangue periférico humano estimulados por lipopolissacarídeos (LPS).

3.3. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS:

- Avaliar *in vitro* a viabilidade celular do ácido gálico sobre macrófagos RAW 264.7 e monócitos de sangue periférico humano estimulados por lipopolissacarídeos (LPS);
- Analisar *in vitro* a atividade anti-inflamatória do ácido gálico sobre as culturas celulares de macrófagos RAW 264.7 e em monócitos de sangue periférico humano estimulados por lipopolissacarídeos (LPS).

4. METODOLOGIA

4.1. Tipo de Estudo:

Tratou-se de uma pesquisa do tipo: quantitativo, experimental e laboratorial.

4.2. Local do estudo:

A etapa de coleta das amostras de sangue periférico humano foi realizada nas Clínicas de Cirurgia e Periodontia da Faculdade de Odontologia (FAO/UFAM) enquanto que, a etapa laboratorial para cultivo das células inflamatórias, bem como os desafios celulares, foram desenvolvidas no Laboratório de Atividades Biológicas (BIOPHAR) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/UFAM).

4.3. Aspectos éticos

Para obtenção das amostras e sangue periférico humano para cultivo de monócitos *in vitro*, este projeto de pesquisa, primeiramente, foi submetido e aprovado - CAAE 92262518.6.0000.5020 - no Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, conforme prevê a resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde; e de acordo com a resolução nº 411/11 do Conselho Nacional de Saúde, acerca dos projetos que envolvam armazenamento de material biológico humano.

4.4. Fluxograma do experimento

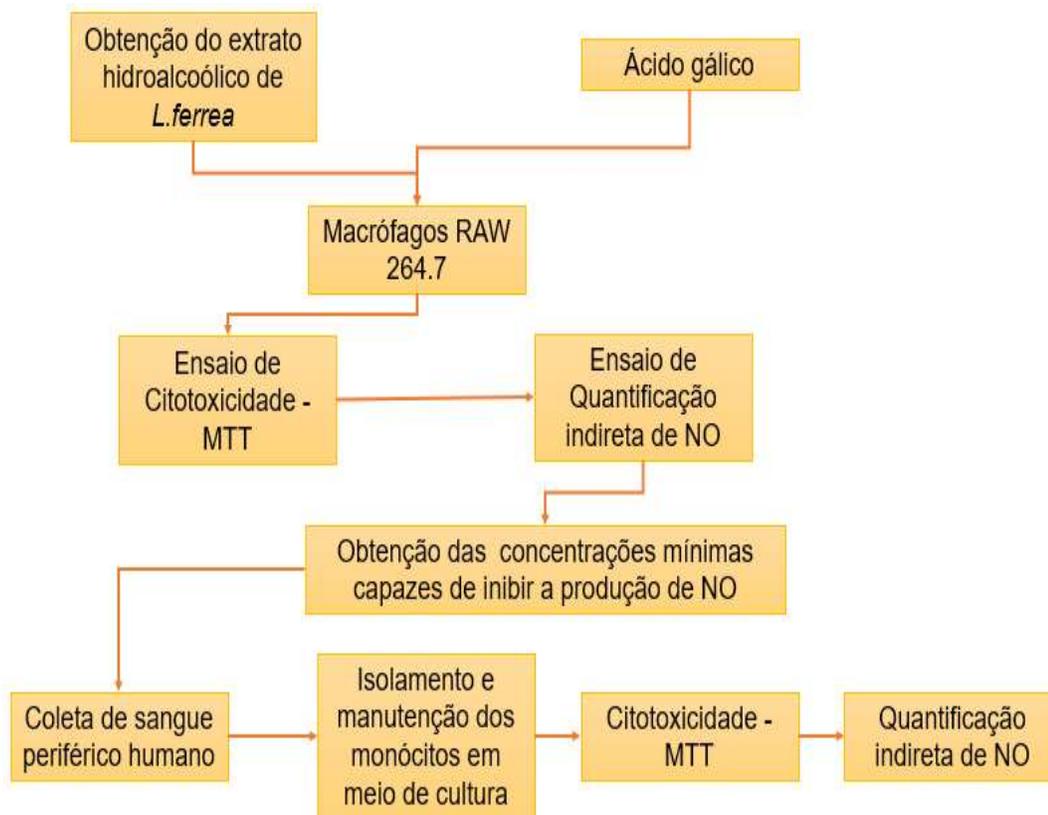


Figura 6. Delineamento experimental do projeto. Resumo da sequência das etapas metodológicas realizadas com o extrato hidroalcoólico da *Libidibia ferrea* L. e do ácido gálico nos macrófagos RAW 264.7 e monócitos de sangue periférico humano. Fonte: Próprio autor.

4.5. Obtenção do extrato de *L. ferrea* (228022-INPA) e do ácido gálico

O extrato hidroalcoólico da casca do caule da *L. ferrea* (7,5%) foi obtido de acordo com a metodologia descrita por Venâncio *et al.* (2015). A casca do caule da *Libidibia ferrea* L. (228022-INPA), foi coletada no Instituto Nacional de Pesquisa Amazônica (INPA), e processada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas (FCF/UFAM). Esta matéria-prima foi escolhida buscando eliminar interferências acerca da sazonalidade, uma vez que a casca do caule encontra-se disponível durante todo o ano.

Primeiramente, a casca do caule da *L. ferrea* foi submetida a um processo de secagem a temperatura ambiente por 48 horas. Em seguida, foi submetida a secagem em estufa de ar circulante a 40°C por 10 dias, até ocorrer a estabilização

da umidade residual. Após o período secagem, seguiu para o processo de moagem em moinho de facas para obtenção da matéria-prima vegetal triturada (MPV).

O extrato foi preparado por meio da técnica de decocção por refluxo a temperatura ambiente, no qual o foi utilizado o solvente de 7,5% (m/V), com água e etanol sendo utilizados como líquido extrator, na proporção de 1:1, ambos em uma quantidade de 500mL. Uma vez realizada a extração, o extrato foi filtrado e seguiu para o aparelho Spray Dryer (modelo MSD 1.0) para obtenção do extrato seco por aspersão reduzido a pó, este que em seguida foi devidamente armazenado em frascos de âmbar previamente esterilizados e secos com tampas.

O ácido gálico utilizado foi comprado junto a Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil.

4.6. Cultura de células

Em buscar de maior conhecimento acerca do comportamento de células animais fora do organismo, Harrison, em 1907, e Carrel, deram início a estudos sobre cultivo celulares em um meio ambiente controlado, permitindo o controle do ambiente físico-químico (pH, temperatura, pressão osmótica e O₂ e CO₂ tensão) (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010; PHILIPPEOS *et al.*, 2012; BARBOSA *et al.*, 2015). Tal método, possibilitou o desenvolvimento de novas drogas, vacinas, proteínas, anticorpos, fatores de crescimento, coeficientes de coagulação. Fatores estes que ressaltam a sua importância em diversos setores de desenvolvimento, por exemplo: a medicina, a biotecnologia e indústria farmacêutica (BARBOSA *et al.*, 2015).

Entre os tipos de cultura existentes, destacam-se a cultura primária e a cultura de linhagem contínua. As células primárias são isoladas diretamente dos tecidos, e passam por um processo de desagregação mecânica, enzimática ou dissociação química, possuem um crescimento finito e resistem a um determinado número de passagens (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010; REBELLO, 2014; PHILIPPEOS *et al.*, 2012). Este tipo celular tem como a principal vantagem, a maior preservação das características fenotípicas e genotípicas originais daquele tecido, porém, as células que conseguem manter as características originais possuem como principal desvantagem, o tempo de vida curto. Além disso, por serem oriundas diretamente do tecido, tendem a ser mais heterogêneas, torna o processo de

isolamento celular mais trabalhoso (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010; PHILIPPEOS *et al.*, 2012)

Entretanto, a medida em que ocorre a replicação e propagação destas células em cultura, aquelas que conseguem se proliferar e se adaptar ao cultivo celular preservando ainda grande parte das características do tecido de origem, são denominadas cultura de linhagem contínua (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010). Neste tipo de linhagem, as células podem ser imortalizadas e apresentam elevada capacidade de proliferação, podendo assim, serem replicadas indefinidamente por um longo período de tempo, fator este que tornou este tipo de linhagem ser mais utilizada em pesquisas quando comparadas com as de cultura primária, além de apresentarem características mais homogêneas. (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010)

Considerando tais características sobre os alguns dos tipos celulares utilizados em cultura de células, em nosso estudo, foram trabalhadas duas linhagens celulares diferentes, sendo os monócitos de sangue periférico humano de cultura primária, e os macrófagos murinos RAW 264.7 de linhagem contínua.

4.7. Obtenção e cultura de células dos macrófagos RAW 264.7

Os macrófagos da linhagem RAW 264.7 que encontravam-se armazenados a -80° C, foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Os macrófagos foram cultivados em meio de cultura DMEM (*Meio Eagle Dulbecco Modificado*) completo, suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado e penicilina/estreptomicina (100 IU/mL / 100 µg/mL), sendo mantidos em estufa úmida (5%CO₂/95% ar, 37° C) e com trocas do meio a cada 2-3 dias. A medida que atingia a sub-confluência, as células eram submetidas ao tratamento enzimático com solução de tripsina 0,05% / EDTA 0,02%, e era realizada a centrifugação a 25°C, 5 minutos, 1500 rpm para obtenção do *pellet celular*. Após a formação do *pellet*, as células eram ressuspensas em meio de cultura DMEM, para a sua propagação em cultura para os experimentos.

4.8. Desafios celulares - macrófagos RAW 264.7

Parte dos macrófagos em cultura, após o tratamento enzimático e contagem em câmara de Neubauer com exclusão das células não viáveis pelo método azul de Tripán, foram utilizadas para os desafios experimentais. Suspensões celulares, com concentração ajustada para 10^6 células/mL em meio DMEM completo, foram semeadas (200 μ L/poço) em placas de 96 poços e incubadas em estufa úmida (5%CO₂/95% ar, 37°C) por 24 h, para adesão das células na placa. Após este período, o meio de cultura presente nas placas foi removido e os macrófagos foram desafiados com a endotoxina lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (1 μ g/mL - 50 μ L/poço), e em seus respectivos poços foram tratados com o extrato de *L. Ferrea* (50 μ L/poço) e ácido gálico (50 μ L/poço) - ambos previamente diluídos em meio de cultura DMEM - e completados com meio de cultura DMEM (100 μ L/poço). Os grupos experimentais seguiram a diluição seriada do extrato e do ácido gálico, partindo da concentração inicial de 100 μ M/mL.

As células na presença dos extratos e LPS foram incubadas em estufa úmida (5%CO₂/95% ar, 37°C) por 24h (OLIVEIRA *et al.*, 2014; DONG *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2017). Os macrófagos na presença somente de LPS e do meio DMEM completo foram considerados controles positivo e negativo, respectivamente. O anti-inflamatório dexametasona (20 μ g/mL) foi utilizado como substância padrão para comparação dos resultados. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata. Portanto, os grupos experimentais ficaram organizados da seguinte forma na linhagem de macrófagos RAW 267.4.

Grupo I – Meio de cultura DMEM como controle negativo;

Grupo II – LPS de *Escherichia coli* a 1 μ g/mL como controle positivo;

Grupo III – Droga padrão: dexametasona 20 μ g/mL;

Grupo IV – Extrato hidroalcólico de *L.ferrea* a 100 μ g/mL; 50 μ g/mL; 25 μ g/mL; 12,5 μ g/mL; 6,25 μ g/mL; 3,125 μ g/mL;

Grupo V – Ácido gálico a 100 μ M; 50 μ M; 25 μ M; 12,5 μ M; 6,25 μ M; 3,125 μ M;

4.9. Ensaio de viabilidade celular pelo método MTT

O ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT (colorimétrico MTT (3-[4,5-dimethylthiazolyl-2]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich) é um ensaio quantitativo utilizado para determinar a interrupção de uma função bioquímica crítica, que quantifica a atividade mitocondrial através da formação de cristais de formazana pela mitocôndria e enzimas desidrogenases, produto este formado pela redução de tetrazolio. O ensaio detecta células vivas, mas não mortas, e o sinal gerado depende do grau de ativação das células (MOSMANN,1983).

Os macrófagos RAW 264.7 após o tempo de desafio+tratamento de 24h, o sobrenadante foi removido e adicionado 50 µL/poço de meio de cultura DMEM completo e 10 µL/poço da solução de MTT (5 mg/mL). As placas foram incubadas em estufa úmida (5%CO₂ /95% ar, 37°C) por 3h. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi removido e 100µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado para dissolução dos cristais de formazan. Em seguida, foi realizada a leitura de absorbância (560 nm) em aparelho de microplaca (DTX-800 Multidetector - Beckman Coulter, Indianapolis, USA).

O mesmo procedimento foi realizado nos monócitos de sangue periférico humano, diferenciando-se que ao invés de se utilizar o meio de cultura DMEM, foi utilizado o meio de cultura RPMI 1640 completo.

4.10. Quantificação de Nitrito (NO) – Método de Griess

A produção de óxido nítrico (NO) foi mensurada através do método de Griess descrito por Green *et al.*, 1982 com modificações, que realiza a dosagem de óxido nítrico de forma indireta por meio de seus produtos de degradação. Para determinar a produção indireta do óxido nítrico, as concentrações de nitrito presente no sobrenadante celular após as 24h de desafio+ tratamento foram removidos (100 µL/poço) e colocados em uma outra de 96 poços. Primeiramente, o nitrito reage com a Sulfanilamida (Sigma-Aldrich) (50µL/poço) a 1% dissolvida em ácido fosfórico H₃PO₄ (CFQ - Química) a 5% em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio, que ao reagir com o Naftil-1-etilenodiamina (Sigma-

Aldrich, São Paulo, Brasil) (50µL/poço) a 0,1% dissolvido em água destilada H₂O forma um composto de coloração púrpura.

Após os reagentes serem adicionados em cada poço, a placa foi incubada por 20 minutos, e as amostras foram lidas em um leitor de microplacas (DTX-800 Multidetector - Beckman Coulter, Indianapolis, USA) a 560 nm. O cálculo das concentrações de nitrito foi realizado com base em curva padrão utilizando diferentes concentrações de nitrato de sódio NaNO₃ 15 µM até 1000 µM (SILVA, 2016).

Assim que finalizados os testes de citotoxicidade pelo método MTT e a quantificação indireta do óxido nítrico pelo método de Griess em macrófagos RAW 264.7, foram obtidas as curvas de concentração do extrato de *L.ferrea* e do ácido gálico. Partindo destes resultados, seguiu-se a utilização das concentrações mínimas para a realização de ambos os métodos supracitados em cultura de células nos monócitos de sangue periférico humano, obtidos seguindo o protocolo a seguir:

4.11. Seleção dos doadores do estudo:

Para a obtenção das amostras de sangue periférico humano, os doadores (n=10) do estudo foram selecionados de acordo com os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

4.11.1. Critérios de Inclusão:

- Maiores de 18 anos;

4.11.2. Critérios de Exclusão:

- Fumantes;
- Fazem uso de álcool ou quaisquer outros tipos de droga;
- Portadores de doenças infecciosas sistêmicas, de qualquer natureza, aguda ou crônica, com ou sem manifestação bucal;
- Sofrendo de neoplasia malignas, de natureza bucal ou não;
- Sob qualquer tipo de tratamento quimioterápico ou radioterápico;
- Portadores de alterações endócrinas (diabetes, gravidez, hipotireoidismo, hipertireoidismo);
- Sob tratamento prolongado de antibioticoterapia de amplo espectro ou antifúngico;

- Portadores de doenças hematológicas de qualquer natureza;
- Sob tratamento de antipsicóticos, metais pesados, anticonvulsivantes e cardiotônicos;

4.12. Obtenção e cultura de monócitos de sangue periférico humano

As amostras de sangue periférico humano foram obtidas de doadores voluntários. Para estes doadores/pacientes foi solicitado o exame pré-operatório hemograma para planejamento e prevenção dos riscos cirúrgicos, uma vez que tais pacientes foram submetidos a procedimentos cirúrgicos previstos nos planos de tratamento, independente da pesquisa em questão. Portanto, a amostra de sangue a ser doada (20 mL) foi parte do volume coletado por profissional da saúde capacitado com auxílio de tubos à vácuo (BD Vucatainer, São Paulo, Brasil) contendo EDTA (BD Vucatainer, São Paulo, Brasil) como anticoagulante, onde tal procedimento encontrava-se previsto para o hemograma em função do procedimento cirúrgico, após assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A), responderam as perguntas de um questionário informativo (APÊNDICE B), bem como, assinaram os instrumentos de doação de material biológico (Resolução nº 441/11) (APÊNDICE C).

Em seguida, o processo de obtenção e cultura de monócitos foi de acordo com Faria, 2011 adaptado. Portanto, 10 mL de sangue periférico humano foram aplicados sobre 5mL de Histopaque 1083 (Sigma-Aldrich) em tubos Falcons de 15mL e centrifugados por 30 min, 25°C, 400x g (s/accel e s/brake) para que a interface contendo as células mononucleares fosse isolada.

Após a coleta da banda contendo as células mononucleares, em outro tubo Falcon de 15 mL contendo 9mL de meio de cultura RPMI 1640 completo (suplementado com 10% de SBF e penicilina/estreptomicina 100 IU/mL / 100 µg/mL), passaram por uma lavagem inicial e após a formação do *pellet* foram ressuspensas após centrifugação por 10 min, 21°C, 370 x g (9 accel/9 break). Em seguida passaram por mais duas lavagens, contendo 5 mL de RPMI 1640 completo, sendo centrifugadas a 239 x g, 21°C, 5 min (8 accel/8 break).

Feito o processo de lavagem, os leucócitos foram ressuspensos a 1 mL de meio RPMI 1640 completo, e realizada a contagem em câmara Neubauer com

exclusão das células não viáveis pelo método azul de Tripán 0,4%. Suspensões celulares (2×10^6 células/mL em meio de cultura RPMI 1640 completo) foram semeadas (100µL/poço) em placas de cultura celular de 96 poços, e completadas com mais 100µL/poço de meio RPMI completo, e incubadas por 24h em estufa úmida (5%CO₂/95% ar, 37°C) para adesão dos monócitos no fundo da placa.

Após 24h foram realizadas duas lavagens com PBS (100µL/poço) possibilitando a remoção dos leucócitos (não-aderentes) que encontravam-se em suspensão, e manutenção monócitos aderentes no fundo de cada poço. Em seguida, os monócitos foram desafiados acrescentando a endotoxina lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (1µg/mL;50 µL/poço), e tratadas separadamente em seus respectivos poços, dexametasona (50µL/poço) com o extrato hidroalcoólico de *L. Ferrea* (50µL/poço) e com ácido gálico (50µL/poço), sendo completado com 100 µL/poço de meio completo de RPMI, somando um volume final de 200µL/poço. As placas foram incubadas por mais 24h em estufa úmida (5%CO₂/95% ar, 37°C), de acordo com os seguintes grupos experimentais:

Grupo I: Meio RPMI 1640 – controle negativo;

Grupo II: Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* – controle positivo;

Grupo III: Droga padrão: dexametasona 20 µg/mL;

Grupo IV: Ácido gálico 6,25 µM/mL;

Grupo V: Extrato hidroalcoólico de *L. ferrea* (7,5%) reconstituído em meio de cultura na concentração de 100 µg/mL;

Grupo VI: Extrato hidroalcoólico de *L. ferrea* (7,5%) reconstituído em meio de cultura na concentração de 50 µg/mL.

Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

4.11. Análises dos resultados

Os resultados foram analisados por meio da média \pm desvio padrão (SD), e expressos de acordo com o padrão de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) apresentado. De acordo com a análise de variância dos dados, a comparação entre os grupos foi determinada pela Análise de Variância (ANOVA) a um critério (One-

Way), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD e o teste de Dunnet, ou mediante os testes de Kruskal- Wallis seguido do teste de Mann-Whitney, quando não apresentaram homogeneidade de variância.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da viabilidade celular e a obtenção da concentração de inibição do óxido nítrico (NO) da *Libidibia ferrea* L. e do ácido gálico em macrófagos RAW 264.7

Os resultados de viabilidade celular em células permanentes (macrófagos murinos RAW 264.7) mostraram que não houve citotoxicidade nas sete concentrações (100 µg/mL; 50 µg/mL; 25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 6,25 µg/mL; 3,125 µg/mL; 1,56 µg/mL) do extrato testadas de *L.ferrea*, quando comparadas ao controle negativo (meio de cultura) conforme a figura 7A.

Em contrapartida, no ácido gálico as concentrações testadas de 100µM; 50µM; 25µM e 12,5 µM apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas com o controle negativo, obtendo resultados abaixo de 50% de viabilidade celular, sendo consideradas concentrações citotóxicas, porém, nas concentrações 3,125 µM e 6,25 µM foram obtidos resultados similares ao do controle negativo, portanto, concentrações não citotóxicas (Figura 7B).

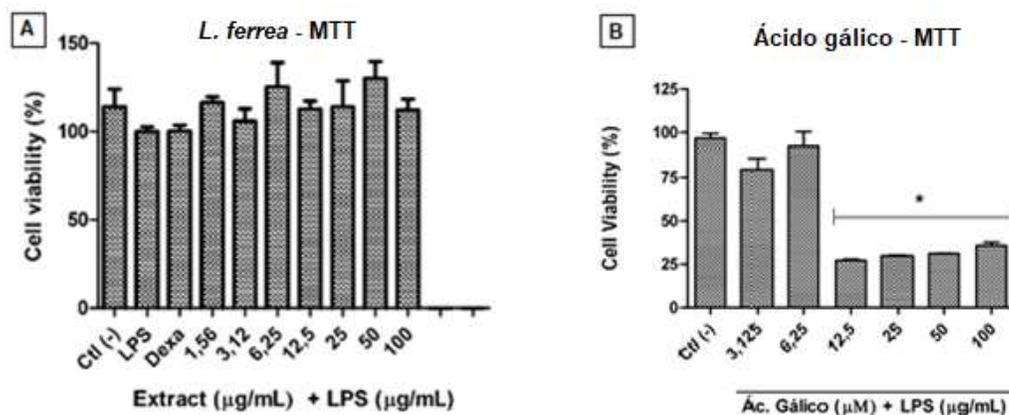


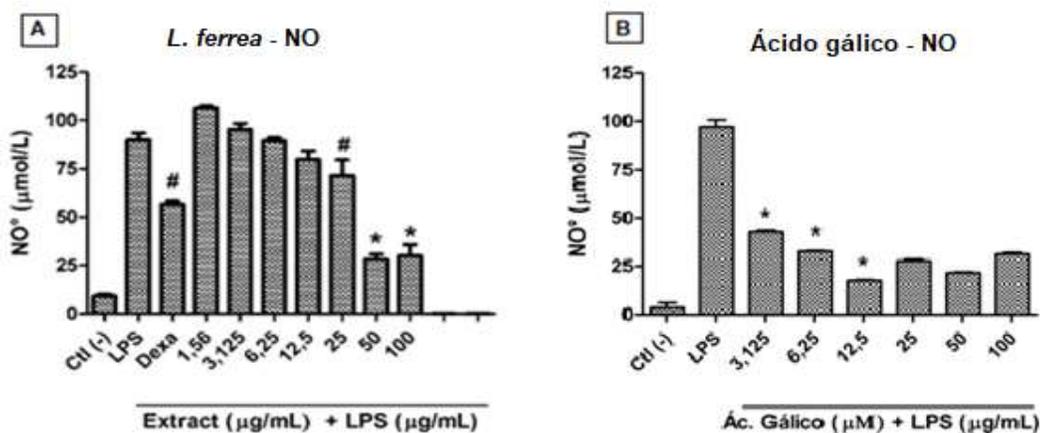
Figura 7. Ensaio de citotoxicidade nos macrófagos. Percentual dos macrófagos RAW 264.7 viáveis após desafio *in vitro* com diferentes concentrações do extrato de *L. Ferrea* (Figura 7A) e ácido gálico (Figura 7B) durante o período de 24 h após o desafio com LPS. (*) $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao controle negativo. Software GraphPad Prism (versão 5.0) foi utilizado para análise estatística.

Uma vez confirmada as concentrações que mantiveram a viabilidade celular de *L. ferrea*, seu efeito anti-inflamatório foi avaliado diante da produção de NO pelos macrófagos RAW 267.4, sendo as concentrações do extrato de *L. ferrea* 50 µg/mL e

100 $\mu\text{g/mL}$ obtiveram melhores resultados na redução da produção de NO, caracterizando-as concentrações anti-inflamatórias mínimas do extrato conforme o gráfico 8A, apresentando diferença estatística significativa, quando comparado a dexametasona, e diferença significativa do LPS em relação a todos os outros grupos.

Nas concentrações testadas de ácido gálico, houve inibição na produção de NO em todas as concentrações testadas, havendo diferença estatística nas concentrações 12,5 $\mu\text{M/mL}$; 6,25 $\mu\text{g/mL}$; 3,125 $\mu\text{M/mL}$ quando comparadas com o controle.

Destaca-se, ainda, que este perfil anti-inflamatório do extrato de *L.ferrea* e ácido gálico alcançaram resultados superiores ao corticosteroide dexametasona,



considerado o fármaco padrão ouro (Figuras 8A e 8B).

Figura 8. Ensaio de Inibição do óxido nítrico pelos macrófagos RAW 264.7. Após desafio com LPS em diferentes concentrações do extrato de *L. Ferrea* (Figura 8A) e ácido gálico (Figura 8B) durante o período de 24 h. (*) $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao controle negativo e (#) indica diferença do LPS em relação a todos os outros grupos Software GraphPad Prism (versão 5.0) foi utilizado para análise estatística.

5.2. Avaliação da viabilidade celular e o efeito do *L.ferrea* e do ácido gálico na inibição de óxido nítrico (NO) em monócitos humanos

Encontrada as concentrações não citotóxicas e a concentração inibitória mínima nos macrófagos RAW 267.4, as concentrações do extrato hidroalcolico do *L.ferrea* que obtiveram os melhores resultados foram as de 100 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$, e o ácido gálico na concentração de 6,25 $\mu\text{M/mL}$. Por este motivo, foram selecionados

para nova realização destes ensaios, desta vez em células primárias de monócitos de sangue periférico humano, com o intuito de avaliar novamente as interferências destes extratos na viabilidade celular através do método colorimétrico de MTT, conforme ilustrado no na figura 9A.

Neste estudo, assim como realizado anteriormente, os extratos hidroalcoólicos do *L.ferrea* e o ácido gálico também foram avaliados quanto à capacidade de inibição da produção de NO, seguindo os mesmos grupos testes utilizado no método de MTT, como demonstrado nos gráficos 9A e 9B.

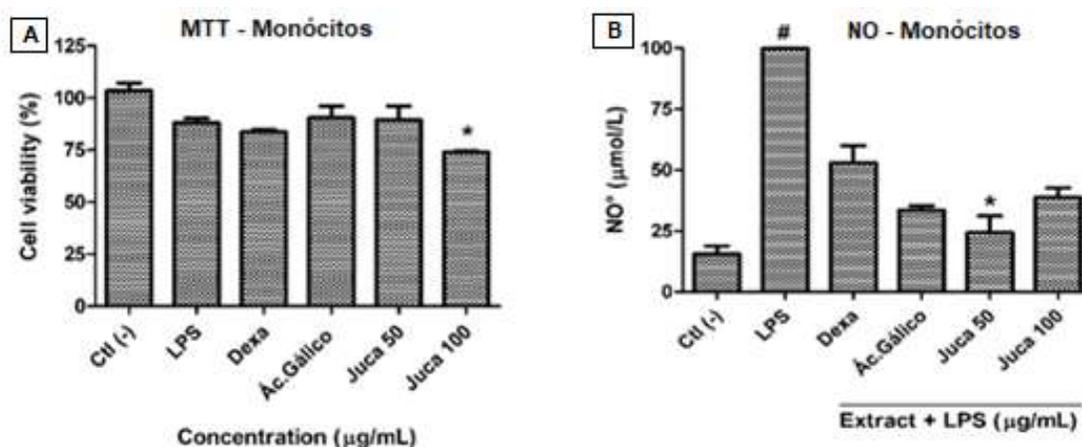


Figura 9. Ensaio de citotoxicidade e de Inibição do óxido nítrico pelos monócitos. Percentual dos monócitos viáveis após desafio *in vitro* em concentrações do extrato de *L. Ferrea* (50 e 100 µg/mL), ácido gálico (6,25 µM/mL) e dexametasona (20 µg/mL) durante o período de 24 h após o desafio com LPS (Figura 9A) Os valores de (*) $p < 0.05$, quando comparado ao controle negativo. A quantificação de nitrito foi mensurada em sobrenadantes de monócitos de sangue periférico humano estimulados por LPS por 24h (Figura 9B). Os valores de (*) $p < 0.05$, quando comparado a droga padrão (dexametasona) e (#) indica diferença do LPS em relação a todos os outros grupos. Software GraphPad Prism (versão 5.0) foi utilizado para análise estatística.

Nos grupos testados, foi observado que na concentração de 100 µg/mL houve diferença estatística quando comparado com o controle negativo (meio de cultura), enquanto que os demais compostos mantiveram a viabilidade celular próxima do controle, não havendo diferença estatística. Entretanto, nenhuma das concentrações testadas apresentaram citotoxicidade diante dos monócitos de cultura primária, uma vez que todos obtiveram o valores acima de 50%, logo podemos considerar que estas concentrações são seguras para a realização de outros ensaios.

Verificou-se ainda que todos os grupos testados apresentaram capacidade de inibição do óxido nítrico, sendo os extratos de *L.ferrea* nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL e o ácido gálico a 6,25 µM/mL, portanto, ambas amostras

testadas assim como nos ensaios com os macrófagos RAW 264.7 alcançaram resultado mais satisfatório quando comparado a droga padrão (dexametasona).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado o potencial anti-inflamatório em cultura de células do extrato da casca do caule de *Libibidia ferrea* L. e do ácido gálico – composto fenólico comumente encontrado na composição desta espécie vegetal -, utilizando duas linhagens de células diferentes, sendo uma linhagem de células permanentes obtidas no banco de células do Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/UFAM), os macrófagos murinos RAW 267.4, e na linhagem de células primárias, os monócitos, que foram obtidos a partir de sangue periférico humano, respectivamente.

6.1. Avaliação do extrato de *L.ferrea* e ácido gálico sobre a viabilidade celular

Os ensaios de citotoxicidade estão entre os primeiros métodos *in vitro* usados para prever a toxicidade de substâncias para vários tecidos, fornecendo um meio crucial para a avaliação, triagem de segurança e classificação dos compostos, onde há o monitoramento da resposta de células cultivadas após tratamento com potenciais tóxicos, possibilitando desta forma, medir a viabilidade, a integridade da membrana celular, proliferação celular e atividade metabólica dependendo do método utilizado (TOLOSA *et al.*, 2015). Dentre os métodos disponíveis, o ensaio colorimétrico de redução de MTT, cujo o princípio é que, para a maioria das células viáveis a atividade mitocondrial é constante e, portanto, um aumento ou a diminuição do número de células viáveis está linearmente relacionada à atividade mitocondrial, onde o rendimento de células viáveis é avaliado sem a necessidade de contagem celular (MERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011).

O extrato de *L.ferrea* não apresentou nenhuma citotoxicidade nas sete concentrações testadas (100 µg/mL; 50 µg/mL; 25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 6,25 µg/mL; 3,125 µg/mL; 1,56 µg/mL;) nos macrófagos RAW 267.4. Foi constatado ainda, que a viabilidade celular nas concentrações de 1,56 µg/mL; 6,25 µg/mL e 50 µg/mL, superaram os 100% do grupo controle, indicando maior presença de células viáveis. Quando novamente testados em monócitos de linhagem primária, nas concentrações de 100 µg/mL e 50 µg/mL, a viabilidade celular também foi mantida. Portanto, reforça que não há citotoxicidade sobre o metabolismo da célula,

relacionada principalmente a atividade do succinato desidrogenase, que é uma enzima mitocondrial.

Este perfil não citotóxico de extratos do *L.ferrea* já havia sido observado em diversos estudos na literatura, inclusive em diferentes tipos celulares, como em macrófagos murinos J774 (COMANDOLLI-WYREPKOWSKI *et al.*, 2017), células renais embrionárias HEK-293 (GUERRA *et al.*, 2017), e fibroblastos embrionários de ratos 3T3 (FALCÃO *et al.*, 2019b), e em todos houve a manutenção da viabilidade celular. Destaca-se ainda que dentre os estudos citados, Falcão *et al.*, 2019b o tempo de incubação na realização do ensaio foi de até 72h, e houve a manutenção da viabilidade celular, enquanto que em nossa pesquisa o período foi de 24h, portanto, reforça o perfil não citotóxico desta espécie vegetal. Entretanto, estudos como o de Marreiro *et al.*, 2014 contrastaram com o presente estudo, uma vez que ao avaliarem a citotoxicidade de um enxaguatório bucal a base de *L.ferrea* diante de fibroblastos murinos NHI3T3, o enxaguatório apresentou elevada citotoxicidade, porém, este fator pode ser justificado devido a presença de Tween 80 na sua formulação, um surfactante não-iônico, considerado tóxico para as membranas biológicas, podendo desta forma ser o responsável pelo comprometimento da viabilidade celular.

Presente na maioria das plantas, o ácido gálico é um metabólito secundário conhecido por exibir uma série de bioatividades, incluindo antioxidantes, antimicrobianos, anti-inflamatório e anticâncer (FERNANDES; SALGADO, 2015). Estudos fitoquímicos na literatura destacam a presença deste composto fenólico no *L.ferrea*, fazendo-o ser considerado como um dos marcadores de estudos controle desta planta (UEDA *et al.*, 2001; NAKAMURA *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2016).

Diferentemente do extrato hidroalcolico de *L.ferrea*, as concentrações testadas do ácido gálico (100 µM; 50 µM; 25 µM; 12,5 µM; 6,25 µM; 3,125 µM) não obtiveram o mesmo resultado, no qual apenas duas concentrações (6,25 µM; 3,125 µM) conseguiram ter resultados satisfatórios com manutenção de mais de 50% das células viáveis em relação ao grupo controle, sendo as demais concentrações abaixo deste percentual, possuindo alta citotoxicidade. Além disso, assim como realizado com o extrato de *L.ferrea*, quando novamente testada nos monócitos, as concentrações 6,25 µM; 3,125 µM não comprometeram a viabilidade celular.

Yoon *et al.*, 2013 ao investigar os efeitos pró-apoptóticos e anti-inflamatórios do ácido gálico em fibroblastos sinoviócitos de cultura primária obtidos de pacientes com artrite reumatóide, realizou o ensaio de MTT para avaliar viabilidade celular no período de 24h. Houve a redução significativa da viabilidade celular pelo tratamento com ácido gálico nas concentrações acima de 10 μ M, enquanto que, nas concentrações 0,1 e 1 μ M não afetaram a viabilidade, sendo assim, concordante com os resultados descritos em nossa pesquisa. Há ainda trabalhos que corroboraram em partes com o nosso estudo, como o de Dormini *et al.*, 2012 que testou o ácido gálico em fibroblastos 3T3 por 72h, uma vez que em seu estudo, as concentrações testadas (0.47–30 μ g/mL), aquelas que eram acima de 12,5 μ M - concentração esta considerada tóxica em nosso trabalho - não apresentaram comprometimento da viabilidade celular. Assim como Tanaka *et al.*, 2018 que também realizou o mesmo ensaio em macrófagos RAW 264.7, e as células foram tratadas com 11,5-46 μ g/mL por 8h e também não apresentaram citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas. Nestas pesquisas, houve a manutenção da viabilidade celular em concentrações superiores a 12,5 μ M, considerada citotóxica em nosso estudo, porém, os resultados descritos podem ser advindos das diferentes condições experimentais, como tempo de incubação, presença ou ausência de estímulos tóxicos e concentração celular trabalhada.

6.2. Efeito sobre a inibição do óxido nítrico (NO) do extrato de *L.ferrea* e ácido gálico

A inflamação é uma resposta do sistema imunológico que pode ser desencadeada por uma variedade de fatores, incluindo patógenos, compostos tóxicos e células danificadas (CHEN *et al.*, 2018). Entre os principais componentes da inflamação, o NO é um dos que regulam as vias de sinalização da resposta inflamatória, auxiliando no processo de adesão celular, e juntamente com os fatores de crescimento, também é importante na regulação da resposta inflamatória assim como na promoção da formação de novos vasos (GHIMIRE *et al.*, 2017).

Contudo, durante este processo de resposta, quando as citocinas pró-inflamatórias estimulam a produção de NO em neutrófilos, monócitos e macrófagos, sua produção excessiva pode levar à destruição do tecido. Assim sendo, a inibição das vias de NO é considerada benéfica no tratamento de doenças inflamatórias (LO FARO *et al.*, 2014; SPROSTON *et al.*, 2018).

A sua detecção e quantificação precisa são essenciais para entender o comportamento de doenças de caráter inflamatório (BRIAN; GRISHAM, 2007). Todavia, a metodologia do NO é complexa, especialmente por se tratar de um radical livre gasoso, que possui meia-vida extremamente curta. O nitrito e o nitrato por representarem os produtos finais das vias de oxidação do NO, suas concentrações são frequentemente avaliadas como um índice da produção sistêmica de NO. Diferentes métodos foram aplicados para a detecção de nitrito/nitrato, sendo o mais comum o ensaio espectrofotométrico baseado no reagente de Griess, amplamente utilizado para quantificação indireta destes produtos nos sobrenadantes da cultura de células (GIUSTARINI *et al.*, 2008; SCHMÖLZ; WALLERT; LORKOWSKI, 2017).

No presente trabalho, ao realizarmos a quantificação indireta de NO em macrófagos RAW 264.7, o extrato de *L.ferrea* conseguiu inibir a produção de óxido nítrico principalmente nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, resultado este persistiu nos monócitos de sangue periférico humano. Além disso, em ambas as linhagens celulares testadas, os valores atingidos foram superiores ao da droga padrão (dexametasona). Estes resultados foram concordantes com Freitas *et al.*, 2012, que ao avaliarem as atividades biológicas do extrato bruto e de uma fração parcialmente purificada (F80) obtida de suas vagens da *L.ferrea* diante de células NCI-H292 (carcinoma mucoepidermóide do pulmão humano) e HEp-2 (carcinoma laringo epidermóide humano), realizaram a quantificação indireta do NO pelo método de Griess, e tanto extrato bruto como o F80 promoveram uma alta redução no conteúdo de nitrito, especialmente o extrato bruto, que o diminuiu para um nível menor do que o apresentado pelos medicamentos padrão (piroxicam e dexametasona).

Além disso, pesquisas como o de Dias *et al.*, 2013 que incorporaram um extrato obtido das vagens da *L.ferrea* em matrizes/curativos poliméricos de N-Carboxibutil quitosano, colágeno/celulose (Promogran®) e à base de ácido hialurônico (Hyalofill®) estimulados por LPS em macrófagos RAW 267.4, reiteram o potencial do *L.ferra* na inibição da produção de NO, uma vez que ao realizar o ensaio pelo período de 24 e 72h, todos os materiais não carregados e carregados pelo extrato, diminuíram significativamente a produção de óxido nítrico após 24 h de exposição das células, ocorrendo apenas um ligeiro aumento do NO produzido após 72 h que

pode ser devido ao estresse causado pelas células submetido após grandes períodos de exposição.

Deve-se ressaltar que na literatura, diversos estudos sobre a atividade anti-inflamatória de extratos da *L.ferrea* vão além da sua capacidade de inibir o NO, destacando sua capacidade de redução do número de células inflamatórias no local da inflamação (ARAÚJO *et al.*, 2014; FALCÃO *et al.*, 2019a). Em Falcão *et al.*, 2019b obteve até mesmo resultados semelhantes ao diclofenaco, potente anti-inflamatório comumente usado nas escolhas terapêuticas atuais. Foram observados ainda, pesquisas que relataram a redução dos níveis das citocinas pró-inflamatória 11L-1 β , TNF- α , NO e TGF- β (FERREIRA, *et al.*, 2015; FALCÃO *et al.*, 2019b).

Os taninos são considerados como um dos principais constituintes da *L. ferrea*, e entre eles gálico e ácidos elágicos estão fortemente presentes e são considerados como marcadores e os principais componentes responsáveis por esses efeitos, sendo capazes de atuar em vias de sinalização que são desregulados durante dor, inflamação e estresse oxidativo (SILVA *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2016; FALCÃO *et al.*, 2019a e b).

Nos resultados alcançados pelo ácido gálico, ao serem testados nos macrófagos RAW 264.7 quanto a inibição da produção de NO, todas as concentrações atingiram resultados estatísticos (3,125-100 μ M), porém a concentração inibitória ideal e menos citotóxica foi a de 6,25 μ M. Esta concentração quando replicada em monócitos de sangue periférico humano sustentaram o resultado. Deve-se destacar ainda que, assim como no extrato de *L.ferrea*, as concentrações de ácido gálico atingiram resultados superiores ao da dexametasona, considerada a droga padrão ouro.

São diversos os estudos que tem evidenciado a capacidade do ácido gálico de atuar como anti-inflamatório, entre eles BenSaad *et al.*, 2017 que avaliaram o efeito anti-inflamatório do ácido gálico em macrófagos RAW264.7 estimulados por LPS. No ensaio de mensuração do NO após o tratamento de 24h, a produção de nitrito foi inibida pelo ácido gálico de maneira dose-dependente. Desta maneira, concernindo com os resultados obtidos em nossa pesquisa. Assim como em Liu *et al.*, 2019, também houve a inibição na produção de NO dia diante de células microgliais BV-2 estimulados com LPS e tratados com ácido gálico por 24h.

Ahn *et al.*, 2016 avaliaram o potencial anti-inflamatório da quitosana enxertada com ácido gálico em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. No ensaio de inibição do NO as células RAW264.7 foram pré-tratadas com quitosona-ácido gálico por 1 h e estimulados por 24h, e como resultado, o tratamento suprimiu a produção de NO em 2 vezes em comparação com o grupo controle positivo (LPS sozinho). Portanto, reiteraram com os resultados obtidos em nossa pesquisa. Estas pesquisas evidenciaram ainda a diminuição de citocinas pró-inflamatórias como a TNF- α , IL-1 β , PGE-2 e IL-6 (AHN *et al.*, 2016; BENSADAD *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2019).

Os monócitos e macrófagos desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro diante dos processos inflamatórios e infecções que levam a exposição de endotoxinas. A ocorrência de produção excessiva de mediadores inflamatórios pelas células inflamatórias, assim como a produção do NO que é sintetizado a partir da L-arginina pelo iNOS, encontram-se envolvidos na citotoxicidade e dano tecidual no processo inflamatório.

O desencadear da resposta inflamatória assim como os seus produtos, estão associadas a várias patogêneses de doenças inflamatórias. Portanto, a prevenção de respostas inflamatórias excessivas nos monócitos e macrófagos reitera-se como uma boa estratégia para o desenvolvimento de agentes anti-inflamatórios (LO FARO *et al.*, 2014; SPROSTON *et al.*, 2018).

O presente trabalho demonstrou que o extrato da *L.ferrea* é promissor no desenvolvimento de futuras formulações com ação terapêutica diante de enfermidades inflamatórias que afetam a cavidade oral, como por exemplo as periodontites e as gengivites, uma vez que as concentrações não citotóxicas apresentaram efeito inibitório em uma das vertentes inflamatórias avaliadas.

Além disso, deve-se destacar que o um de seus marcadores, o ácido gálico - que apesar de não ter sido isolado diretamente planta que foi utilizada no estudo - foi analisado separadamente na sua forma isolada pura, e apresentou potencial de atividade anti-inflamatória no nosso estudo, assim como em outros estudos supracitados neste tópico, fator este que nos permite salientar o ácido gálico como um dos possíveis responsáveis por esta propriedade terapêutica na planta da *Libidibia ferrea* L.

Entretanto, este estudo atuou de forma complementar, uma vez que diversos estudos na literatura, têm salientado a atuação destes componentes em outras vertentes do processo inflamatório. Portanto, destaca-se a necessidade da realização de mais pesquisas voltadas para um maior entendimento acerca dos efeitos e mecanismos anti-inflamatórios da *L. ferrea*.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir:

- O extrato da *L.ferrea* não apresenta citotoxicidade, uma vez que em nenhuma das concentrações testadas de 6,25-100 µg/mL nos macrófagos RAW 264.7, assim como nos monócitos de sangue periférico humano não houve comprometimento da viabilidade celular;
- As concentrações 50 e 100 µg/mL do extrato da *L.ferrea* alcançaram os melhores resultados na inibição na produção de NO, sendo capazes de inibir também nos monócitos, logo, tais concentrações apresentam promissora atividade anti-inflamatória;
- O seu marcador, o ácido gálico, obteve apenas duas concentrações não citotóxicas (3,125 e 6,25 µM), resultado este que se manteve nos monócitos, porém, apresentou um perfil citotóxico quando testado em concentrações maiores;
- Todas as concentrações testadas do ácido gálico inibiram a produção de NO, porém, apenas a de 6,25 µM obteve maior potencial de inibição e não apresentou citotoxicidade, havendo a manutenção deste resultado quando testado nos monócitos, apresentando desta forma, atividade anti-inflamatória;

Portanto, pode-se concluir que em nosso estudo, a formulação do extrato da *Libidibia ferrea* L. e do ácido gálico apresentaram concentrações não citotóxicas e que foram capazes de inibirem a produção de óxido nítrico (NO) quando testadas em duas linhagens celulares diferentes – células de cultura primárias (monócitos) e em células de linhagem contínua (RAW 267.4) demonstrando assim, atividade anti-inflamatória.

Entretanto, outros ensaios *in vitro* em cultura de células, podem ser feitos para melhor compreensão do mecanismo anti-inflamatório destes componentes, através da realização de testes mais específicos como o ELISA (Ensaio Enzima-ligado da Imunoabsorção) que possibilita a dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias, RT-PCR (Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase) que

consegue analisar a expressão gênica, o *Western Blotting*, que permite a análise de proteínas presentes nas membranas celulares.

Além disso, este estudo agregou pesquisas anteriores, buscando posteriormente o desenvolvimento de maiores estudos *in vivo*, bem como sua ampliação para estudos clínicos, e futuramente o emprego de um produto na área odontológica para o tratamento de doenças inflamatórias que acometem a cavidade oral.

REFERÊNCIAS

AHN, C.B et al. Gallic Acid-g-Chitosan Modulates Inflammatory Responses in LPS-Stimulated RAW264.7 Cells Via NF- κ B, AP-1, and MAPK Pathways. **Inflammation**, v. 39, n. 1, p. 366-374, 2016.

ARA, T. et al. Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. **Journal of Periodontal Research**, v. 44, n. 1, p. 21 – 27, 2009.

ARAUJO, A.A et al. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 156, p. 88-96, 2014.

AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M. H.; GEISSMANN, F. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 669 – 692, January 2009.

BARBOSA, B.S et al. Histórico do desenvolvimento do cultivo de células animais. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.9, n.2, 334-347, 2015.

BEDRAN, T. B. L.; SPOLIDORIO, D. P.; GRENIER, D. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate and cranberry proanthocyanidins act in synergy with cathelicidin (LL-37) to reduce the LPS-induced inflammatory response in a three-dimensional co-culture model of gingival epithelial cells and fibroblasts. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 6, p. 845 – 853, 2015.

BENSAAD, L.A et al. Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 47, p. 1-10, 2017

BOZKURT, S. B. et al. Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide Induces a Proinflammatory Human Gingival Fibroblast Phenotype. **Inflammation**, v. 40, n. 1 2017.

BRYAN, N.S.; GRISHAM, M.B. Methods to Detect Nitric Oxide and Its Metabolites in Biological Samples. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 5, p. 645-57, 2007.

BUGNO, A. et al. Enxaguatórios bucais: avaliação da eficácia antimicrobiana de produtos comercialmente disponíveis. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 65, n. 1, p. 40 – 45, 2006.

CALCERRADA, P.; PELUFFO, G.; RADI, R. Nitric Oxide-Derived Oxidants with a Focus on Peroxynitrite: Molecular Targets, Cellular Responses and Therapeutic Implications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 36, p. 3905-3932, 2011.

CARVALHO, F.G. et al. Assessment of the healing activity of jucá pods [*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz] in cutaneous lesions of rats. **Acta Scientiarum Technology**, v. 38, n. 2, p. 137 – 143, 2016.

CARVALHO, J.C. et al. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, n. 3, p. 175 – 178, 1996.

CASAROTO, A.R. **Resposta imune inata na estomatite protética: interação in vitro células epiteliais de palato humano e *Candida Albicans***. 2013. Tese (Doutorado).

CAVALHEIRO, M.G. et al. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 586 – 591, 2009.

CHEN, G et al. Microglia in Pain: Detrimental and Protective **Roles in Pathogenesis and Resolution of Pain**. **Neuron**, v. 100, n. 6, p. 1292-1311, 2018.

CHOUBEY, S et al. Medicinal importance of gallic acid and its ester derivatives: a patent review. **Pharmaceutical Patent Analyst**, v. 4, n. 4, p. 305–315, 2015.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI1, C.D et al. Antileishmanial activity of extracts from *Libidibia ferrea*: development of in vitro and in vivo tests. **Acta Amazonica**, v. 47, n. 4, p. 331 – 340, 2017.

CONDE, N.C.O et al. In vitro antimicrobial activity of plants the Amazon on oral biofilm micro-organisms. **Journal of Dental Science**, v.30, n.4, p. 179-187.

CZERWINSKA, M.E. et al. The influence of procyanidins isolated from small-leaved lime flowers (*Tilia cordata* Mill.) on human neutrophils. **Fitoterapia**, v. 127, p. 115-122, 2018.

DIAS, A.M.A et al. Wound dressings loaded with an anti-inflammatory jucá (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 74, p. 34-45, 2013.

DLUDLA, P.V et al. Inflammation and Oxidative Stress in an Obese State and the Protective Effects of Gallic Acid. **Nutrients**, v.11, n. 27, p. 1-29, 2019.

DONG, L. et al. In Vivo and In Vitro Anti-inflammatory Effects of Ethanol Fraction from *Periploca forrestii* Schltr. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 23, n. 27, p. 528-534, 2016.

DORNIANI, D et al. Preparation of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles coated with gallic acid for drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5745-5756, 2012.

EVANGELISTA, S. S. et al. Fitoterápicos na odontologia: estudo etnobotânico na cidade de Manaus. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 513 – 519, 2013.

FALCÃO, T. R. et al. Crude extract from *Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz leaves decreased intra articular inflammation induced by zymosan in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 47, p. 1 – 10, 2019.

FALCÃO, T. R. et al. *Libidibia ferrea* Fruit Crude Extract and Fractions Show Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antinociceptive Effect In Vivo and Increase Cell Viability In Vitro. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, p. 1-14, 2019

FARHOOSH, R., NYSTROM, L. Antioxidant potency of gallic acid, methyl gallate and their combinations in sunflower oil triacylglycerols at high temperature. **Food Chemistry**, v. 244, n. 1, p. 29-35, 2018.

FARIA, P. F. **Produção de citocinas pelos monócitos de idosos com estomatite protética associada a Candida**. 2011. 159 p. Tese (Odontologia) — Universidade de São Paulo (Doutorado).

FARMACOPEIA Brasileira, 5ª edição. Brasília, 2010.

FERNANDES, F.H.A.; SALGAGO, H.R.N. Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 1-40, 2015.

FERREIRA, D. Q. et al. Libidibia ferrea (jucá), a Traditional Anti-inflammatory: A Study of Acute Toxicity in Adult and Embryos Zebrafish (Danio rerio). **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 175, p. 1 – 15, 2019.

FERREIRA, L. C. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of Campomanesia adamantium. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 100 – 108, 2013.

FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L. Libidibia ferrea (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz: A review of the biological activities and phytochemical composition. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 2, p. 140 – 150, 2015

FERREIRA, M.R.A et al. Chromatographic and Spectrophotometric Analysis of Phenolic Compounds from Fruits of Libidibia ferrea Martius. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, n. 46, p. 285-291, 2016.

FRANKEN, L.; SCHIWON, M.; KURTS, C. Macrophages: sentinels and regulators of the immune system. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 475-487, 2016.

FREITAS, A et al. Biological Activities of Libidibia (Caesalpinia) ferrea var. parvifolia (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz Pod Preparations. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1– 7, 2012.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic front Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature reviews : drug discovery**, v. 15, n. 8, p. 551 – 567, August 2016.

GALDINO, G.; MESQUITA, M. R.; FERRAZ, I. D. K. Descrição morfológica da plântula e diásporos de *Caesalpinia ferrea* Mart. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 747 – 749, 2007

GARCIA-ORTIZ, A.; SERRADOR, J.M. Nitric Oxide Signaling in T Cell-Mediated Immunity. **Trend in Molecular Medicine**, v. 24, n. 4, p. 412-427, 2018.

GHIMIRE, K et al. Nitric oxide: what's new to NO?. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v. 312, n. 3, p. 254-262, 2017.

GILROY, D.; MAEYER, R. D. New insights into the resolution of inflammation. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 3, p. 161-168, 2015.

GIUSTARINI, D et al. Nitrite and Nitrate Measurement by Griess Reagent in Human Plasma: Evaluation of Interferences and Standardization. **Methods in Enzymology**, v. 440, n. 23, p. 361-80, 2008.

GONZALEZ, F.G.; BARROS, S.B.M.; BACCHI, E.M. Atividade Antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* Mart.. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.40, n. 1. p.79, 2004

GREEN, L.C et al. Analysis of Nitrate, Nitrite, and [¹⁵N] Nitrate in Biological Fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131- 138, 1982.

GUERRA, A.C.V.A et al. *Libidibia ferrea* presents antiproliferative, apoptotic and antioxidant effects in a colorectal cancer cell line. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 696-706, 2017.

HAMIDZADEH, K et al. Macrophages and the Recovery from Acute and Chronic Inflammation. **Annual Review of Physiology**, v. 10, n. 79, p. 567-592, 2017.

HEADLAND, S. E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 3, p. 149-160, 2015.

JIA, T. et al. Anti-Inflammatory Effects of Licochalcone A on IL-1-Stimulated Human Osteoarthritis Chondrocytes. **Inflammation**, v. 40, n. 6, p. 1894-1902, 2017.

KARATAS, O., GEVREK, F. 3,4,5-Trihydroxybenzoic Acid Attenuates Ligature-Induced Periodontal Disease in Wistar Rats. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v.19, n. 1, p. 1-10, 2020.

KIM, S.J., KIM, H.M. Dynamic lipopolysaccharide transfer cascade to TLR4/MD2 complex via LBP and CD14. **BMB Reports**, v. 50, n. 2, p. 55-57, 2017.

KOBAYASHI, Y. T. da S. et al. Avaliação fitoquímica e potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos de Jucá (*Libidibia ferrea*) em ratos Wistar. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 52, n. 1, p. 34 – 40, 2015

KRATOFIL, R. M.; KUBES, P.; DENISET, J. F. Monocyte Conversion During Inflammation and Injury. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 37, n. 1 p. 35-42, 2017

KRUGER, P. et al. Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLoS Pathogens*, **Public Library of Science**, v. 11, n. 3, p. 1 – 23, 2015.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.K; ASTER, J.C. **Robbins Patologia Básica**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2013.

LI, Z.J et al. Antifungal Activity of Gallic Acid In Vitro and In Vivo. **Phytotherapy Research**, v.31, n. 7, p. 1-7, 2017.

LIANG, C.Z et al. Gallic Acid Induces the Apoptosis of Human Osteosarcoma Cells In Vitro and In Vivo via the Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 27, n. 10, p. 701-710, 2012.

LIU, G.; YANG, H. Modulation of Macrophage Activation and Programming in Immunity. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 3, p.502-512, 2012.

LIU, Y.L et al. Gallic Acid Attenuated LPS-Induced Neuroinflammation: Protein Aggregation and Necroptosis. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 96-104, 2019.

LO FARO, M.L et al. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. **Nitric Oxide**, v. 15, n. 41, p. 38-47, 2014.

LOCATI, M., MANTOVANI, A., SICA, A. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. *Advances in Immunology* v. 120, p. 163-167, 2013.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature reviews immunology**, v. 11, n. 8, p. 519-531, 2011.

MARREIRO, R. O. et al. Evaluation of the stability and antimicrobial activity of an ethanolic extract of *Libidibia ferrea*. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry**, v. 6, p. 9 – 13, 2014.

MERLOO, J.; KASPERS, G.J.L.; CLOOS, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. **Methods in Molecular Biology**, v. 731, n. 20, p. 237-245, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Série B. Textos Básicos de Saúde**, Brasília, p. 1 – 60, 2006

MOLINARO, E.M; CAPUTO, L.F.G; AMENDOEIRA, M.R.R. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. v.2. Rio de Janeiro: **Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio**, p. 215-253, 2010.

MORTAZ, E et al. Update on neutrophil fuction in severe inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 2171, p. 1-14, 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunology Methods**. v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOTHANA, R.A.A. Anti-inflammatory, Antinociceptive and Antioxidant Activities of the Endemic Soqotraen *Boswellia Elongata* Balf. F. And *Jatropha Unicostata* Balf. F.

In Different Experimental Models. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 10, p. 2594-2599, 2011.

NAKAMURA, E.S et al. Cancer Chemopreventive Effects of Constituents of Caesalpinia Ferrea and Related Compounds. **Cancer Letters**, v. 177, n. 2, p. 119-24, 2002.

NARUISHI, K.; NAGATA, T. Biological effects of interleukin-6 on Gingival Fibroblasts: Cytokine regulation in periodontitis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 9, p. 6393-6400, 2018

NOZAKI, A.H et al. Pauferrol, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from Caesalpinia ferrea mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Letters**. v. 48, n. 47. p. 8290–8292, 2007.

OHIRA, S et al. New chalcone 53 dimers from Caesalpinia ferrea Mart act as potent inhibitors of DNA topoisomerase. **Tetrahedron Letters**, v.54, n. 37, p. 5052–5055, 2013.

OLIVEIRA, A. et al. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (Caesalpinia ferrea Mart. ex Tul. var. ferrea) em lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 302 – 310, 2010.

OLIVEIRA, G. P. et al. Atividade antimicrobiana in vitro de extratos da casca do caule e da vagem de Libidibia ferrea l. frente a micro-organismos da cavidade bucal. **Revista Fitos**, v. 8, n. 2, p. 73 – 160, 2013.

OLIVEIRA, R.G. et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of hydroethanolic extract of Dilodendron bipinnatum Radlk. **Journal of Ethnopharmacology**, v.155, n.1, p. 387 – 395, 2014.

PAIVA, W. et al. Atividade anti-bacteriana da casca do jucá (Libidibia férrea (mart. Ex tul.) L.P. Queiroz) frente a Staphylococcus spp. Isolados do leite de cabras com mastite. **Archives of Veterinary Science**, v. 20, n.2, p.141 -146, 2015.

PARK, B.S., LEE, J.O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 45, n. 12, p. 1-9, 2013.

PARK, J. et al. Amelioration of an LPS-induced inflammatory response using a methanolic extract of *Lagerstroemia ovalifolia* to suppress the activation of NF- κ B in RAW264.7 macrophages. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 38, n. 2, p. 482 – 490, 2016.

PAZ, S. M. la et al. Mitraphylline inhibits lipopolysaccharide-mediated activation of primary human neutrophils. **Phytomedicine**, v. 23, n. 2, p. 141 – 148, 2016.

PEREIRA, L. de P. et al. Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: Potential anti-inflammatory usage. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 642 – 648, 2012.

PHILIPPEOS, C et al. Introduction to cell culture. **Methods in molecular biology**, v.806, p. 1-13, 2012.

PIWOWARSKI, J. P.; KISS, A. K. Contribution of C-glucosidic ellagitannins to *Lythrum salicaria* L. influence on pro-inflammatory functions of human neutrophils. **Journal Natural Medicine**, v. 69, n. 1, p. 100 – 110, 2015.

PORT'S, P.S. The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. **Food Research International**, v. 53, n.2, p. 875-881, 2013.

REBELLO, M. A. Fundamentos da Cultura de Cultura de Tecido e das células Animais. 1th ed. Rio de Janeiro: **Rubio**, 2014. 208p.

ROUGERIE, P., MISKOLCI, V., COX, D. Generation of membrane structures during phagocytosis and chemotaxis of macrophages: role and regulation of the actin cytoskeleton. **Immunological Reviews**, v. 256, n. 1, p. 222–239, 2013.

SAMPAIO, F. C. et al. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 2, p. 289 – 294, 2009.

SANTOS, E.M.S et al. Gallic acid modulates phenotypic behavior and gene expression in oral squamous cell carcinoma cells by interfering with leptin pathway. **Pathology - Research and Practice**, v. 214, n. 1, p. 30-37,2018.

SCHMÖLZ, L.; WALLERT, M.; LORKOWISKI, S. Optimized Incubation Regime for Nitric Oxide Measurements in Murine Macrophages Using the Griess Assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 449, p. 68-70, 2017.

SHI, C.; PALMER, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 762 – 774, 2011.

SILVA, A.C.C. **Avaliação das atividades citotóxica, antitumoral, anti-inflamatória e analgésica do extrato bruto e de uma fração parcialmente purificada da vagem de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. Var. *ferrea***. 2008. 87f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SILVA, F.A et al. Arbuscular mycorrhizal fungi increase gallic acid production in leaves of field grown *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 8, n. 36, 2014.

SILVA, L.C.N et al. Evaluation of combinatory effects of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits extracts and erythromycin against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.7, n. 32, p. 2358-2364, 2013.

SILVA, M. J. A. **Atividade anti-inflamatória de novos compostos sintéticos da classe dos nitroestirenos**. 2016. 117 p. Dissertação (Ciências Farmacêuticas) — Universidade Federal do Amazonas.

SOARES, D. J. et al. Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) fruit juice and two major constituents thereof exhibit anti-inflammatory properties in human gingival and oral gum epithelial cells. **The Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 2981 – 2988, 2014.

SOUZA; A. B. et al. No clastogenic activity of *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) extract on bone marrow cells of Wistar rats. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 380-383, 2006.

SPROSTON, N.R et al. The effect of C-reactive protein isoforms on nitric oxide production by U937 Monocytes/macrophages. **Frontiers Immunology**, v. 9, p. 1-14, 2018.

SUGIMOTO, M.A et al. Resolution of Inflammation: What controls its onset?. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 1-18, 2016.

TANAKA, M et al. Terminalia bellirica (Gaertn.) Roxb. Extract and Gallic Acid Attenuate LPS-Induced Inflammation and Oxidative Stress via MAPK/NF- κ B and Akt/AMPK/Nrf2 Pathways. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, n. 93, p. 1-15, 2018.

TANG, B et al. Effects of gallic acid on the morphology and growth of hydroxyapatite crystals. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 1, p. 167-173, 2014.

TOLOSA, L.; DONATO, M.T.; GOMEZ-LECHON, M.J. General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay. **Methods in Molecular Biology**, v. 1250, n. 26, p. 333-348, 2015.

UEDA, H et al. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* mart. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 377-381, 2001.

VENÂNCIO, G. N. et al. Herbal mouthwash based on *Libidibia ferrea*: microbiological control, sensory characteristics, sedimentation, pH and density. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 44, n. 2, p. 118 – 124, 2015.

VERMA, S., SINGH, A., MISHRA, A. Gallic acid: Molecular rivar of cancer. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 35, n. 3, p. 473-485, 2013.

YANG, J et al. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomarker Research**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2014

YOON, C.H et al. Gallic Acid, a Natural Polyphenolic Acid, Induces Apoptosis and Inhibits Proinflammatory Gene Expressions in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-Like Synoviocytes. **Joint Bone Spine**, v. 80, n. 3, p. 274-279, 2013.

ZHANG, L.; WANG, C.C. Inflammatory response of macrophages in infection. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v. 13, n. 2, p. 138-152, 2014.

ZHU, Y.P.; THOMAS, G.D.; HEDRICK, C.C. Transcriptional Control of Monocyte Development. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.36, n.9, p. 1722-1733, 2016.

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE**

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), do projeto de pesquisa intitulado '**CITOTOXICIDADE E AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA *in vitro* DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Libidibia ferrea* L. E DO ÁCIDO GÁLICO**, conduzida pela pesquisadora responsável, Mestranda Márcia Arruda Lins. Endereço: Av. Ayrão, 1539, Praça 14 de Janeiro, Manaus, AM CEP 69025-050. Fone: (92) 3305-4924. E-mail: linsmarcia95@gmail.com, onde será realizado sob orientação da Prof.Dra Carina Toda. Endereço: Av. Ayrão, 1539, Praça 14 de Janeiro, Manaus, AM CEP 69025-050. Fone: (92) 3305-4924. Email: carinatoda@yahoo.com.

Para tanto, pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte do material biológico humano de acordo com a resolução nº411/11 do Conselho Nacional de Saúde – referente ao armazenamento e utilização de material biológico humano com finalidade de pesquisa e a resolução nº466/12 sobre pesquisas em Seres Humanos - no caso da pesquisa em questão, o tipo de material a ser coletado, serão as células epiteliais de mucosa bucal e células inflamatórias humanas obtidas de sangue periférico.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houverem perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

Objetivos:

Este estudo tem por objetivo geral avaliar a atividade anti-inflamatória da *Libidibia ferrea* L. E como objetivos específicos, avaliar a citotoxicidade e a analisar *in vitro* da atividade anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de *L.ferrea* e ácido gálico sobre macrófagos RAW 264.7 e monócitos de sangue periférico humano, por meio da quantificação indireta de óxido nítrico (NO).

Procedimentos:

As amostras de sangue periférico serão coletadas também de cinco doadores voluntários, onde serão coletadas 10 mL de sangue periférico sob condições de assepsia e anti-sepsia, sendo estes pacientes das Clínicas de Cirurgia e Periodontia desta instituição.

Desconfortos e riscos:

A coleta do sangue periférico, haverá a existência de um desconforto, e de uma leve sensação dolorosa no momento da coleta de sangue por punção, previamente justificada para que se possa realizar o procedimento tal. Além disso,

tais riscos serão minimizados uma vez os procedimentos supracitados, vão ser realizados por profissionais devidamente capacitados, onde utilizarão materiais adequados de acordo com o procedimento proposto.

Benefícios:

Por se tratar de uma pesquisa de laboratório, não traz benefícios diretos e imediatos para o voluntário, entretanto, se trata de um benefício indireto com o intuito de fortalecer a coletividade em termos de conhecimento, e um futuro retorno social. Além disso, o voluntário terá o benefício, de ter o acesso aos dados da pesquisa e seus respectivos avanços científicos na área da Fitoterapia na Odontologia mediante a publicações e/ou acesso ao site da instituição.

Garantia de esclarecimento, liberdade de recusa e garantia de sigilo:

Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

O(s) pesquisador (es) irá (ão) tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados obtidos dentro de laboratório de pesquisa serão guardados e poderão ser enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar desse estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada na Faculdade de Odontologia da UFAM e outra será fornecida a você.

Custos da participação, ressarcimento e indenização por eventuais danos:

A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional. Entretanto os gastos necessários para sua participação na pesquisa serão assumidos pelos pesquisadores (ressarcimento de despesas). Fica também garantida a indenização em caso de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Armazenamento das amostras em biorrepositório e biobanco:

As amostras colhidas nesse trabalho serão armazenadas em Biorrepositórios primeiramente, que se destina a ser um tipo de depósito ao qual suas amostras ficarão no tempo de realização deste projeto de pesquisa, cuja guarda ficará com o pesquisador principal Mestranda Márcia Arruda Lins e de responsabilidade institucional da Universidade Federal do Amazonas, este depósito permanecerá o tempo programado para realização do trabalho. Caso haja necessidade poderá ser prolongada mediante justificativa e aprovação do CEP (Comitê de Ética em Pesquisa). Este material poderá sofrer transferência para Biobanco institucional, pelo qual sua amostra fará parte de um banco de responsabilidade institucional

podendo se utilizado para pesquisas futuras, essas pesquisas também serão avaliadas por CEP's. Seu material biológico será armazenado sobre um sistema seguro de identificação, que garante o sigilo, o respeito à confidencialidade e à recuperação dos seus dados, para fornecimento de informações de seu interesse ou para a obtenção de consentimento específico para utilização em nova pesquisa;

É importante esclarecer que você participante desta pesquisa tem garantia expressa da possibilidade de acesso do conhecimento dos resultados obtidos com a utilização dos materiais biológicos e as orientações quanto as suas implicações, em qualquer tempo. Para isso ficará o contato da instituição responsável por seu armazenamento (FAO/UFAM – (92 - 3305-4924).

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o CEP/UFAM – Comitê de Ética em Pesquisa da UFAM:

Enderço: Escola de Enfermagem de Manaus - Sala 07 Rua Teresina, 495 –
Adrianópolis – Manaus – AM
CEP 36036-110
Telefone: 3305-1181, ramal 2004
E-mail: cep@ufam.edu.br

DECLARAÇÃO DO (A) PARTICIPANTE (A) OU DO SEU RESPONSÁVEL:

Eu, _____, fui informada(o) dos objetivos da pesquisa acima, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. O pesquisador responsável Márcia Arruda Lins certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar a pesquisadora responsável e/ou o professor (a) Orientador (a) Carina Toda, no telefone (92) 3305-4924, ou e-mail linsmarcia95@gmail.com e/ou carinatoda@yahoo.com.

Declaro que recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.



Impressão dactiloscópica

Assinatura do participante ou digital

Mestranda Márcia Arruda Lins
Assinatura do Pesquisador Responsável

Prof.Dra Carina Toda
Assinatura do Professor Orientador

APÊNDICE B – Formulário para a coleta de dados clínicos dos voluntários

1. FICHA CONTROLE DO VOLUNTÁRIO DA PESQUISA		
Voluntário da pesquisa:		
Data de Nascimento:	Idade:	Sexo: Masculino (<input type="checkbox"/>) Feminino (<input type="checkbox"/>)
Cor:	Profissão:	
Enfermidades agudas ou crônicas:		
Doenças Sistêmicas: (<input type="checkbox"/>) SIM (<input type="checkbox"/>) NÃO Quais?		
Medicamentos de uso terapêutico:		
Uso de fumo: (<input type="checkbox"/>) SIM (<input type="checkbox"/>) NÃO	Uso de álcool: (<input type="checkbox"/>) SIM (<input type="checkbox"/>) NÃO	
Drogas: (<input type="checkbox"/>) SIM (<input type="checkbox"/>) NÃO Especificar:		
Hábitos:		
Antecedentes familiares (câncer, enfermidades auto-imune):		
Observações:		

 Assinatura do Voluntário

 Assinatura do Autor da Pesquisa

APÊNDICE C - Instrumento de doação de material biológico

2. FICHA CONTROLE DO DOADOR – Identificação do Doador		
Nome:		
Data de Nascimento:	Local de Nascimento:	UF:
RG:	CPF:	
Endereço:		
Cidade:	UF:	CEP:
Telefones para contato:		

DECLARAÇÃO

Declaro ter sido esclarecido sobre quais os motivos que levaram a necessidade de coleta de sangue periférico e concordo que o mesmo seja utilizado no projeto de pesquisa intitulado: “**Citotoxicidade e ação anti-inflamatória *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Libidibia ferrea* L.**”, – que objetiva analisar e avaliar se o fitoterápico *Libidibia ferrea* L. possui atividade anti-inflamatória e imunomodulatória.

Fui ainda esclarecido pelo pesquisador que minha identidade não será divulgada por qualquer meio e que o material recolhido será utilizado unicamente para a presente pesquisa.

Manaus, de de 20 .

Assinatura do doador