



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

JAMYLLÉ NUNES DE SOUZA FERRO

**EFEITO FARMACOLÓGICO DA FRIEDELINA LIVRE E COMPLEXADA EM
HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO
EM ROEDORES**

ORIENTADOR: Prof. Dr. EMILIANO DE OLIVEIRA BARRETO

Maceió – AL,
2016

JAMYLLLE NUNES DE SOUZA FERRO

**EFEITO FARMACOLÓGICO DA FRIEDELINA LIVRE E COMPLEXADA EM
HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO
EM ROEDORES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde, sob orientação do Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto.

Maceió – AL,
2016

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Janaina Xisto de Barros Lima

F395e Ferro, Janylle Nunes de Souza.
Efeito farmacológico da friedelina livre e complexa em hidroxipropil- β -
ciclodextrina em modelos de inflamação em roedores / Janylle Nunes de
Souza Ferro.
– 2016.
143 f.: il.

Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.
Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de
Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2016.

Bibliografia: f. 121-141.
Anexos: f. 142

1. Friedelina. 2. Ciclodextrina. 3. Inflamação. 4. Asma.
I. Título.

CDU: 615.276:616.248



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL - Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, 500
Cidade Universitária - Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ufal@ufal.br
Fone: 52 3214 1800

Folha de Aprovação

Jamylle Nunes de Souza Ferro

Efeito farmacológico da friedelina livre e complexada em hidroxipropil- β -ciclodextrina em modelos de inflamação.

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 14 de dezembro de 2016.

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Salete Smaniotto – (UFAL)

Prof. Dr. Alexandre Urban Borbely - (UFAL)

Prof.^a Dr.^a Patricia Machado Rodrigues e Silva Martins – (FIOCRUZ-RJ)

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas (ICBS/Ufal), sob orientação do Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto. Para sua realização, contamos com a colaboração do Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais (LPqPN), sob a coordenação da Dra. Lúcia Maria Conserva, e do Laboratório de Eletroquímica, sob coordenação da Dra. Fabiane Caxico de Abreu, ambos pertencentes ao Instituto de Química e Biotecnologia da Ufal. Contamos ainda com a colaboração do Laboratório de Inflamação, sob a coordenação do Prof. Dr. Marco Aurélio Martins e da Dra. Magda Serra; do Laboratório de Investigação Cardiovascular, sob a coordenação do Dr. Marcos Adriano Lessa, e do Laboratório de Farmacologia Aplicada, sob a coordenação da Dra. Maria das Graças M. O. Henriques, todos na Fiocruz/RJ.

Dedico esta conquista a Deus e à Sagrada Família, pelo eterno amparo, por acalentarem meu coração nos momentos de dúvida e por guiarem meus passos para me fazer merecedora de todas as dádivas que recebo diariamente.

Aos meus pais, Ernando e Jane, e minhas irmãs, Jullyane e Júlyya, pelo incondicional apoio em todas as decisões e por adotarem os meus sonhos como seus.

À minha Vó Belia, Tia Alípia, Vô Duva, Vô Ozório e Tio Basto, todos *in memoriam*, pelo exemplo e amor de cada um de vocês.

A vocês, dedico o cumprimento de mais esta etapa, com todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Sagrada Família, por me darem sonhos, a força e a coragem necessárias para realizá-los.

Ao meu orientador, chefe e conselheiro, Prof. Emiliano Barreto, pela competência com que exerce seu trabalho, pela compreensão com os obstáculos do dia a dia e pela paciência que sempre me dedicou, em muitos momentos tendo que me ensinar a “conter” meu entusiasmo. Obrigada pela amizade e respeito que teve comigo ao longo desses anos, por me oferecer oportunidades e pelo referencial de profissional que representas em minha vida. Obrigada por ser mais que um professor, por ser amigo, e às vezes até meio pai. Obrigada pelo presente de me dar condições de ter um pouco dos meus sonhos realizados e por me motivar a sonhar e buscar a realização da melhor maneira possível.

À família do Laboratório de Biologia Celular, desde aqueles que estiveram juntos no início da minha caminhada científica e não estão mais no cotidiano de bancada, mas que permaneceram na minha vida. Obrigada a estes profissionais e amigos maravilhosos: Renato Rodarte (Renatinho), Betijane Barros (Beti), Rafael Vital (Rafa), Paulo Carvalho (Paulinho), Almair Ferreira (Miau), Alex Farias e Anderson (Brogodó) pela colaboração, ensinamentos e amizade que levarei por toda a minha vida. Obrigada à minha chefinha do coração, Juliane Pereira (Ju), por todo o carinho, paciência e ensinamentos que muito me ajudam até hoje.

Obrigada a todos os que acompanharam mais de perto a execução deste trabalho, uns desde o início e outros que foram somando no decorrer da caminhada e me permitiram acompanhar o desenvolvimento dos seus projetos profissionais e pessoais: João Noé (Noel), Samário Lino (Sam), Fernanda Aquino (Nanda), Polyane Rocha (Poly) e Lilian Mariane (Lilika).

Aos colegas e amigos do LBC, pelos inúmeros e incansáveis experimentos e pela confiança em mim depositada: Ana Carolina (Carol), Julianderson (Ju), Tácio Cartaxo, Flávio Martins (Coisinho), Lylyan Emanuely, Jordana Rodrigues, Abraão José e Polliane Araújo. Muito obrigada, meus queridos!

Obrigada a todos os integrantes do LBC, pela paciência e compreensão em muitos momentos e pela troca de aprendizados que levarei sempre comigo. Obrigada, Návylla (Nalvinha), Tales, Marvin, Larissa, Fagner, Alex Wanderley, Danielma Reis, Abraão e professores Salete Smaniotto, Silvana Martins e Alexandre Borbely, pela confiança. A todos vocês, família LBC, meus sinceros agradecimentos pela ajuda, pelos bons dias de trabalho, por toda a contribuição e por constituírem uma família à parte dentro da Universidade. E aos que estão somando ao final desta trajetória, obrigada por sua compreensão e ajuda.

Aos mestres que compartilharam comigo suas experiências e com os quais pude aprender, muito além dos livros e artigos, a importância de fazer bem aquilo a que nos propomos.

Ao Laboratório de Pesquisa em Química dos Produtos Naturais do Instituto de Química e Biotecnologia da Ufal, nas pessoas da Profa. Lúcia Conserva e do amigo Anderson Marques, pelos préstimos na realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Eletroquímica do Instituto de Química e Biotecnologia da Ufal, nas pessoas da Profa. Dra. Fabiane Caxico e Fabrícia Ferreira, o meu muito obrigada pelos ensinamentos na execução de parte deste trabalho.

Ao Laboratório de Inflamação do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, nas pessoas do Prof. Dr. Marco Aurélio Martins e Magda Serra, muito obrigada pela colaboração na execução da minha pesquisa.

Ao Laboratório de Farmacologia Aplicada do Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos), nas pessoas da Profa. Dra. Maria das Graças Muller Oliveira Henriques e Dra. Elaine Cruz Rosas, muito obrigada por toda a contribuição durante a minha formação.

Ao Laboratório de Investigação Cardiovascular, sob a coordenação do Dr. Marcos Adriano Lessa, obrigada por possibilitar a realização de ensaios em seu laboratório.

À coordenação e a todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em

Ciências da Saúde, pelo aprendizado e apoio durante toda essa trajetória. Aos técnicos e servidores da Universidade Federal de Alagoas, pelo apoio técnico.

Aos colegas da turma de doutoramento de 2013, a primeira turma do PPGCS da Ufal, e aos demais colegas e discentes do PPGCS, pela troca de experiências e disposição durante todo esse tempo.

Aos demais funcionários de empresas que prestam serviço à Ufal, representados aqui por Dona Cida e Seu Jovem, que nos ajudam a manter um local adequado para a realização do nosso trabalho.

Às agências financiadoras do projeto, CNPq/Capes e Fapeal, pelo apoio financeiro que proporcionaram à concretização deste estudo.

Aos meus pais, meus amores, por acreditarem nos meus sonhos, fazendo o possível para torná-los realidade. Às minhas irmãs, Jully (Jullyane) e Pitoco (Júlyya), por dividirem comigo momentos únicos, aceitando minhas imperfeições, me ajudando a crescer, e por acreditarem em mim. A vocês, amores da minha vida, meu eterno amor e gratidão.

Agradeço à minha família, avós, tios e primos, por todo o apoio dado aos meus pais, às minhas irmãs e a mim durante toda a nossa vida. Por todo o incentivo e ajuda na realização dos meus sonhos, sempre acompanhados de união, torcida e amor confortantes. Mesmo nos momentos em que “levei falta” nas reuniões em família, que não foram poucos, me senti presente nos gestos e no amor de vocês.

Aos amigos que fiz ao longo da minha existência, aos amigos que cresceram comigo brincando, aos amigos que fiz desde o início da vida escolar e que até hoje permanecem compartilhando momentos únicos comigo; aos amigos da faculdade; aos amigos que fiz no trabalho e que foram, ao longo dos anos, somando felicidades e aprendizados. Muito obrigada pela torcida, amizade e compreensão, sem as quais não saberia viver. Saibam o quanto são especiais em minha vida. Obrigada por todo o incentivo!

Aos membros da banca examinadora da qualificação e defesa, pela disponibilidade

em contribuir com esta importante etapa da minha formação.

A todos que, direta ou indiretamente, participaram da realização deste trabalho, o meu sincero muito obrigada!

“Toda ação de Deus é sempre um gesto de amor, mesmo quando não o compreendemos”.

(Autor desconhecido)

RESUMO

Produtos naturais são comumente usados para o tratamento de diferentes patologias, incluindo inflamação. Dentre as moléculas obtidas a partir de espécies vegetais, os terpenos exibem diferentes atividades biológicas, como anti-inflamatória e antioxidante. No presente estudo, buscou-se investigar o efeito da friedelina sobre a resposta inflamatória *in vivo*, bem como caracterizar a formação do seu complexo de inclusão em hidroxipropil- β -ciclodextrina, avaliando ainda seu potencial em inibir a inflamação alérgica no modelo de asma experimental em camundongos. Para este propósito, diferentes metodologias foram utilizadas. Inicialmente, demonstrou-se que a friedelina inibiu o extravasamento plasmático no modelo de edema de pata induzido por carragenina, histamina e PGE₂, mas não por serotonina. Em seguida, com o propósito de avaliar se as ações da friedelina se estendiam sobre os fenômenos celulares da inflamação, avaliou-se o efeito deste triterpeno na resposta inflamatória induzida por LPS, utilizando o modelo de pleurisia. Neste grupo de experimentos, constatou-se que a friedelina inibiu o influxo de neutrófilos, bem como a produção e/ou secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no efluente pleural. Para melhor avaliar o impacto da friedelina na mobilização de neutrófilos, demonstrou-se, *in vitro*, que o tratamento de neutrófilos humanos com friedelina resultou em uma menor adesão desta célula ao endotélio ativado, bem como em uma menor resposta quimiotática, fenômenos que não foram associados à redução na viabilidade deste tipo celular. Tais resultados sugerem um efeito direto da friedelina nos neutrófilos. Com propósito de confirmar se estes efeitos teriam repercussões *in vivo*, avaliaram-se os eventos de motilidade de leucócitos, usando a metodologia de microscopia intravital. Neste modelo, confirmou-se que a friedelina reduz fenômenos de rolamento e adesão, característica que parece estar associada ao menor influxo de leucócitos para o sítio inflamatório. Em continuidade, confirmou-se que a friedelina mostrou-se capaz de formar complexo com ciclodextrina, fenômeno que foi caracterizado por metodologias espectroscópicas, tais como análise no ultravioleta visível e infravermelho. Por fim, os efeitos da friedelina e de seu complexo com ciclodextrina foram avaliados frente à inflamação pulmonar alérgica induzida por ovalbumina. Neste modelo experimental, verificou-se que a friedelina, bem como seu complexo em ciclodextrina, inibiu parâmetros da mecânica respiratória, como a resistência e elastância das vias aéreas. Verificou-se ainda que tanto o recrutamento de leucócitos quanto a produção de citocinas e quimiocinas no lavado broncoalveolar mostraram-se inibidos pelo tratamento com friedelina e pelo complexo friedelina:ciclodextrina. Cabe destacar que o tratamento com friedelina:ciclodextrina aumentou a quantidade de IL-10 no lavado broncoalveolar. Estendendo as análises para o pulmão, constatou-se que as alterações histopatológicas, como deposição de colágeno e produção de muco, foram também inibidas. Além disso, o tratamento com friedelina:ciclodextrina restaurou a atividade da enzima catalase no pulmão de animais asmáticos. Assim, concluiu-se que o carregamento da friedelina com hidroxipropil-beta-ciclodextrina incrementa os efeitos anti-inflamatórios da friedelina, por prevenir a instalação da inflamação do quadro de asma aguda.

Palavras-chave: Friedelina. Ciclodextrina. Inflamação. Asma.

ABSTRACT

Natural products are commonly used for the treatment of different pathologies, including inflammation. Among the molecules present in plants, the triterpenes exhibit a wide range of pharmacological effects, including anti-inflammatory and antioxidant actions. In the present study we sought to investigate the effect of friedelin at the inflammatory response *in vivo*. The study also looked to characterize the formation of inclusion complex between friedelin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin, and to evaluate its potential to inhibit allergic inflammation in experimental asthma model mice. Initially, we demonstrated that friedelin is able to inhibit the plasma extravasation at the edema model induced by carrageenan, histamine and PGE₂, but not by serotonin. Then, with the purpose of evaluating with the actions of friedelin extend on the cellular events of inflammation; we assessed the effect of this triterpene on the inflammatory response induced by LPS using the pleurisy model. In this experimental model, friedelin inhibited the influx of neutrophils as well as the amount of cytokines and inflammatory chemokines in the pleural effluent. Furthermore, in assessing the effect of friedelin on mobilization of human neutrophils, we demonstrated, *in vitro*, that friedelin induced a lower adherence of neutrophils to activated endothelium, as well as a lower chemotactic response which were not associated with reduction in viability. These results suggest a direct effect of friedelin in neutrophils. Subsequently, to confirm whether these effects would be also observed *in vivo*, we decided to evaluate leukocyte motility events using intravital microscopy. In this model, we confirmed that friedelin was able of reducing rolling and adhesion of leukocytes, events that can be associated with lower influx of leukocytes to the inflammatory site. Additionally, we confirmed that friedelin allowed be attached to cyclodextrin, phenomenon that was demonstrated by using spectroscopic methods, such as analysis by ultraviolet-visible and infrared. Moreover, the effects of friedelin and its complex with cyclodextrin were evaluated against allergic pulmonary inflammation induced by ovalbumin. In this experimental model, both friedelin and friedelin:cyclodextrin inhibited the parameters of respiratory mechanics as resistance and airway elastance. We also verify that both leukocyte recruitment and the production of cytokines and chemokines in bronchoalveolar lavage were inhibited by the treatment with friedelin and friedelin:cyclodextrin. Additionally, treatment with friedelin:cyclodextrin increased the amount of cytokine IL-10 in bronchoalveolar lavage. Evaluation of lung tissue from asthmatic animals we noted that several histopathological changes, such as extracellular matrix deposition and mucus production, were also inhibited under friedelin and friedelin:cyclodextrin treatments. These treatments also restored the activity of catalase in lung from asthmatic animals. In conclusion, the data obtained in this study shows that the carrier system of friedelin with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin increases the anti-inflammatory effects of friedelin in preventing the onset of inflammation in acute asthma.

Keywords: Friedelin. Cyclodextrin. Inflammation. Asthma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição geográfica da asma no mundo.....	32
Figura 2 -	Desenvolvimento da reação inflamatória alérgica.....	34
Figura 3 -	Alterações histológicas no pulmão de indivíduos asmáticos.....	35
Figura 4 -	Células envolvidas na indução dos diferentes fenótipos na alergia.	37
Figura 5 -	Estrutura molecular do esqueleto base de triterpenos pentacíclicos.....	46
Figura 6 -	Estrutura molecular da friedelina.....	47
Figura 7 -	Estrutura molecular dos tipos de ciclodextrinas naturais.....	49
Figura 8 -	Modelo de formação de complexo entre ciclodextrinas e molécula hóspede.....	52
Figura 9 -	Esquema do protocolo utilizado no modelo experimental de edema de pata.....	57
Figura 10 -	Esquema do protocolo utilizado no modelo experimental de pleurisia induzida por lipopolissacarídeo em camundongos.....	59
Figura 11 -	Esquema do protocolo utilizado no modelo experimental de sepse induzida por lipopolissacarídeo em ratos.....	61
Figura 12 -	Esquema do protocolo utilizado para o isolamento de neutrófilos humanos obtidos do sangue periférico.....	62
Figura 13 -	Esquema do protocolo utilizado no ensaio de viabilidade celular por MTT.....	63
Figura 14 -	Esquema do protocolo utilizado no ensaio de adesão de neutrófilos a células endoteliais.....	64
Figura 15 -	Esquema do protocolo utilizado no ensaio de quimiotaxia de neutrófilos induzida por fMLP.....	65
Figura 16-	Coluna com gel de sílica utilizada para purificação da friedelina....	66
Figura 17-	Esquema representativo do método utilizado na formação do complexo por co-solubilização.....	67

Figura 18-	Esquema do protocolo utilizado no modelo experimental de asma alérgica induzida por ovalbumina.....	69
Figura 19-	Avaliação da atividade anti-inflamatória da friedelina no modelo de edema de pata por carragenina.....	74
Figura 20-	Avaliação da atividade anti-inflamatória da friedelina na formação do edema induzido por PGE2, histamina e serotonina em camundongos.....	76
Figura 21-	Efeito da friedelina sobre o influxo de leucócitos para o espaço pleural após estímulo com LPS em camundongos.....	78
Figura 22-	Efeito da friedelina sobre o conteúdo de citocinas presentes no efluente pleural de animais estimulados com lipopolissacarideo...	80
Figura 23-	Efeito da friedelina sobre a adesão de neutrófilos a células endoteliais.....	81
Figura 24-	Efeito da friedelina sobre a migração de neutrófilos humanos.....	82
Figura 25-	Efeito da friedelina na interação leucócito endotélio na microcirculação de ratos estimulados com lipopolissacarideo.....	84
Figura 26-	Efeito da friedelina sobre a viabilidade de neutrófilos <i>in vitro</i>	85
Figura 27-	Cinéticas de formação do complexo de FD em HP- β -CD na razão molar de 1:1 e 1:2.....	87
Figura 28-	Constante de formação e dissociação do complexo FD:HP- β -CD..	88
Figura 29-	Espectros de infra-vermelho na análise da formação do complexo FD:HP- β -CD.....	90
Figura 30-	Avaliação da atividade anti-inflamatória da friedelina e do seu complexo em ciclodextrina no modelo de edema de pata induzido por carragenina.....	91
Figura 31-	Efeito da friedelina e do seu complexo em ciclodextrina na viabilidade de macrófagos.....	92
Figura 32-	Efeito do tratamento com FD e FD:HP- β -CD sobre parâmetros da função pulmonar de camundongos asmáticos estimulados com ovalbumina.....	94

Figura 33-	Efeito do tratamento com FD e FD:HP- β -CD sobre a inflamação nas vias aéreas de camundongos asmáticos estimulados com ovalbumina.....	96
Figura 34-	Efeito do tratamento com FD e FD:HP- β -CD sobre os níveis de citocinas e quimiocinas presentes nas vias aéreas de camundongos asmáticos estimulados com ovalbumina.....	98
Figura 35-	Efeito do tratamento com FD e FD:HP- β -CD sobre os níveis de IL-10 no LBA de camundongos asmáticos estimulados com ovalbumina.....	99
Figura 36-	Efeito do tratamento com FD e FD:HP- β -CD sobre a deposição de colágeno no pulmão de camundongos asmáticos estimulados com ovalbumina.....	101
Figura 37-	Efeito do tratamento com FD e FD:HP- β -CD sobre a quantificação de colágeno no pulmão de camundongos asmáticos estimulados com ovalbumina.....	102
Figura 38-	Efeito do tratamento com FD e FD:HP- β -CD sobre a produção de muco no pulmão de camundongos asmáticos estimulados com ovalbumina.....	104
Figura 39-	Quantificação da produção de muco no pulmão de camundongos asmáticos estimulados com ovalbumina.....	105
Figura 40-	Efeito do tratamento com FD e FD:HP- β -CD na atividade da enzima catalase no pulmão de camundongos asmáticos estimulados com ovalbumina.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Indicadores relacionados a doenças respiratórias em indivíduos atendidos pelo SUS no Brasil entre os anos 2008 e 2016.....	30
Tabela 2 - Número de internações e óbitos por asma no Brasil de janeiro de 2008 a janeiro de 2016.....	33
Tabela 3 - Efeitos colaterais mais comuns associados ao uso de corticosteroides.....	40
Tabela 4 - Características das principais ciclodextrinas utilizadas pela indústria farmacêutica e de cosméticos.....	51
Tabela 5 - Medicamentos nanotecnológicos comercializados no Brasil até 2014	53
Tabela 6 - Grupos experimentais utilizados no modelo experimental de asma alérgica.....	69
Tabela 7 - Efeito da friedelina na mobilização de leucócitos pela medula óssea e sangue periférico.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
µm²	Micrômetro quadrado
µmol/Kg	Micromols por Kilograma
AA	Ácido Araquidônico
AINE	Anti-inflamatório não esteroide
Al(OH)₃	Hidróxido de Alumínio
ANOVA	Análise de Variância
BUD	Budesonida
Ca²⁺	Íon Cálcio
CaCl₂	Cloreto de Cálcio
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCL3	Quimiocina CC Ligante 3
CCL17	Quimiocina CC Ligante 17
CD	Ciclodextrina
cDNA	DNA complementar
Cm	Centímetro
cm²	Centímetro quadrado
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
CXCL2	Quimiocina C-X-C ligante 2
DEXA	Dexametasona
DFC	Densidade Funcional Capilar
DMEM	<i>“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxiribonucleotídeo trifosfato
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

DTT	Diclorodifeniltricloroetano
EAhy.926	Linhagem celular de endotélio umbilical humano
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	<i>“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”</i>
EPM	Erro Padrão da Média
Et	Etanol
FD	Friedelina
FD:HP-β-CD	Friedelina complexada com hidroxipropil-beta-ciclodextrina
FDA:	Food Drug Administration
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
fMLP	Formilmetionina-leucil-fenilalanina
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de fourrier
GC	Glicocorticoides
HP-β-CD	Hidroxipropil-beta-ciclodextrina
i.n.	Intranasal
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
i.t.	Intratraqueal
i.v	Intravenoso
ICAM	Molécula de Adesão Intercelular
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular 1
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-1β	Interleucina 1β
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-9	Interleucina 9
INF-γ	Interferon-γ
KBr	Brometo de Potássio

KCl	Cloreto de Potássio
K_D	Constante de dissociação
K_F	Constante de formação
Kg	Quilograma
LBA	Lavado Broncoalveolar
LT	Leucotrieno
LTB₄	Leucotrieno B ₄
M	Molar
Mg	Miligrama
mg/Kg	Miligrama por quilograma
mg/mL	Miligrama por mililitro
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MIP-1α	<i>"Macrophage Inflammatory Protein"</i> (Proteína Inflamatória de Macrófago 1 alfa)
MIP-2	<i>"Macrophage Inflammatory Protein"</i> (Proteína Inflamatória de Macrófago 2)
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
mm²	Milímetro quadrado
MPO	Enzima Mieloperoxidase
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
N₂	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de Sódio
NF-kB	Fator nuclear Kappa B
Ng	Nanograma
NH₄Cl	Cloreto de Amônio
nM	Nanomolar
NO	Óxido Nítrico
PAS	<i>"Periodic Acid Schiff"</i> (Ácido Periódico de Schiff)
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
PDE	Fosfodiesterase

PG	Prostaglandina
pg/mL	Picograma por mililitro
PGD	Prostaglandina D
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial hidrogeniônico
PMN	Leucócitos Polimorfonucleares
PNPIC-SUS	Política Nacional de Prática Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde
PNPMF	Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RNA_m	RNA mensageiro
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
RPMI	<i>“Roswell Park Memorial Institute”</i>
RT	Transcrição Reversa
s.c.	Subcutâneo
SAL	Salina (0,9 %)
SBF	<i>“Serum Bovine Fetal”</i> (Soro Bovino Fetal)
SUS	Sistema Único de Saúde
TARC	<i>“Thymus and activation regulated chemokine”</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Tris-HCl	Trizma hydrochloride
TXA2	Tromboxano A2
USA	<i>“United States of America”</i>
Uv-Vis	Ultravioleta Visível
v.o.	Via Oral
VCAM-1	Molécula 1 de Adesão à Célula Vascular
VE-caderina	Caderina Endotelial Vascular
VF	Volume Final
VI	Volume Inicial

NORMALIZAÇÃO

Esta tese está de acordo com os requisitos das normas em vigor no momento desta publicação:

- Referências bibliográficas: de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), 2011.
- Padrão Ufal de Normalização. Enildo Marinho Guedes, Lívia Aparecida Ferreira Lenzi, Helena Cristina Pimentel do Vale, Iuri Rocio Franco Rizzi. Maceió: Edufal, 2012.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1	Considerações gerais sobre a resposta inflamatória.....	27
2.2	Doenças respiratórias.....	29
2.2.1	Asma.....	31
2.2.2	Aspectos gerais no tratamento da asma.....	39
2.3	Recursos vegetais como fonte de medicamentos.....	42
2.4	Terpenos.....	44
2.5	Friedelina.....	47
2.6	Ciclodextrinas.....	48
3	OBJETIVOS.....	54
3.1	Objetivo geral.....	54
3.2	Objetivos específicos.....	54
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	55
4.1	Reagentes e soluções.....	55
4.2	Friedelina.....	55
4.3	Animais.....	56
4.3.1	Avaliação da formação de edema.....	56
4.3.2	Pleurisia induzida por lipopolissacarídeo (LPS).....	57
4.3.3	Quantificação de citocinas do lavado pleural.....	59
4.3.4	Microscopia intravital para avaliar microcirculação.....	59
4.4	Avaliação sobre neutrófilos humanos.....	61
4.4.1	Isolamento de neutrófilos.....	61
4.4.2	Avaliação na viabilidade celular de neutrófilos.....	62
4.4.3	Adesão de neutrófilos ao endotélio.....	63
4.4.4	Quimiotaxia de neutrófilos.....	64
4.5	Formação de complexo entre friedelina e hiroxipropil-β- ciclodextrina.....	65
4.5.1	Purificação da friedelina.....	65
4.5.2	Determinação da cinética de formação do complexo entre friedelina e hidroxipropil- β -ciclodextrina.....	66

4.5.3	Preparo do complexo de inclusão entre friedelina e hidroxipropil- β -ciclodextrina.....	67
4.5.4	Caracterização físico-química da formação do complexo.....	67
4.5.4.1	Determinação da constante de formação do complexo através da equação de Benesi-Hildebrand.....	67
4.5.4.2	Análise do complexo por espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	68
4.6	Modelo experimental de asma alérgica.....	68
4.6.1	Delineamento experimental.....	68
4.6.2	Avaliação da hiperreatividade das vias aéreas.....	70
4.6.3	Obtenção do Lavado broncoalveolar (LBA)	70
4.6.4	Quantificação de citocinas e quimiocinas no homogenato do pulmão.....	71
4.6.5	Análise histológica do pulmão.....	71
4.6.6	Quantificação da atividade da enzima catalase.....	72
4.7	Análise estatística.....	72
5	RESULTADOS.....	73
5.1	Avaliação do efeito anti-inflamatório da friedelina sobre a resposta inflamatória aguda.....	73
5.1.1	Efeito da friedelina no edema inflamatório induzido por carragenina..	75
5.1.2	Efeito da friedelina no edema inflamatório induzido por serotonina, histamina e PGE2.....	75
5.1.3	Efeito da friedelina na pleurisia induzida por LPS em camundongos..	77
5.1.4	Efeito da friedelina na quantificação de citocinas no lavado pleural de camundongos estimulados por lipopolissacarídeo.....	80
5.1.4	Efeito da friedelina sobre a adesão/quimiotaxia de neutrófilos.....	81
5.1.5	Efeito da friedelina sobre a viabilidade de células <i>in vitro</i>	85
5.2	Caracterização físico-química da formação do complexo entre friedelina e hidroxipropil-β-ciclodextrina.....	86
5.2.1	Formação do complexo FD:HP- β -CD por absorção no UV-Vis.....	87
5.2.2	Formação do complexo FD:HP- β -CD por FT-IR.....	89
5.3	Avaliação da atividade biológica do complexo entre friedelina e hidroxipropil-β-ciclodextrina.....	91

5.4	Efeito da friedelina livre e na forma de complexo com hidroxipropil-beta-ciclodextrina (FD:HP-β-CD) sobre a inflamação alérgica no modelo de asma experimental em camundongos.....	93
5.4.1	Efeito da FD e FD:HP- β -CD sobre parâmetros da função pulmonar em animais asmáticos estimulados com ovalbumina.....	93
5.4.2	Efeito da FD e FD:HP- β -CD na inflamação das vias aéreas de animais asmáticos estimulados com ovalbumina.....	95
5.4.3	Efeito da FD e FD:HP- β -CD sobre a deposição de matriz extracelular induzida em animais asmáticos estimulados com ovalbumina.....	100
5.4.4	Efeito da FD e FD:HP- β -CD sobre a produção de muco induzida por OVA em animais asmáticos.....	103
5.4.6	Efeito da FD e FD:HP- β -CD sobre a atividade da catalase no pulmão de animais asmáticos estimulados com ovalbumina.....	106
6	DISCUSSÃO.....	107
7	CONCLUSÃO.....	119
	REFERÊNCIAS.....	120
	ANEXOS	141

1 INTRODUÇÃO

A resposta inflamatória é um processo fisiopatológico que ocorre em tecidos vascularizados como resultado de agressões físicas, químicas ou biológicas, com o objetivo de eliminar a agressão, confinar a lesão a uma área limitada e restaurar a homeostase (MEDZHITOV, 2008). Dentre as modificações observadas durante a resposta inflamatória destacam-se as alterações na microcirculação, extravasamento plasmático, migração de células do sangue periférico para o sítio da injúria e secreção de diferentes classes de mediadores inflamatórios (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012). Como consequência destes eventos, ocorrem mudanças teciduais que passam a apresentar um ou mais sinais típicos da inflamação, conhecidos como sinais cardinais: calor, dor, rubor, edema e perda funcional (GILROY et al., 2004).

As desordens inflamatórias das vias respiratórias geram grande preocupação no cenário de saúde mundial, por estarem relacionadas a altos índices de morbimortalidade (OMS, 2010). Dentre essas desordens inclui-se a asma, uma inflamação alérgica crônica caracterizada por obstrução do fluxo de ar, hiperreatividade brônquica e intensa resposta inflamatória das vias aéreas (GINA, 2014).

Na asma, há um forte envolvimento de diferentes tipos celulares, como mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, macrófagos e células epiteliais. Estas células estão envolvidas com a síntese/secreção de diferentes mediadores químicos, que incluem prostaglandinas, quimiocinas e interleucinas (IL) 4, IL-5 e IL-13 que contribuem para exacerbação dos sintomas frequentes associados à doença, como tosse, chiado no peito e falta de ar (NIH, 2007). Como terapia de primeira escolha para o tratamento da asma, os glicocorticoides mostram-se úteis para o controle da doença em uma parcela dos pacientes asmáticos. Porém, atualmente, há um crescente número de indivíduos que não respondem a esta terapia, resultando em agravamento do quadro clínico e repercutindo no aumento do número de internações, aumento na frequência de ausência no trabalho e gastos com medicamentos, o que leva a uma baixa qualidade de vida destes indivíduos (BARNES et al., 2015).

Nos últimos anos, um grande esforço científico e tecnológico vem sendo empreendido para identificar e/ou desenvolver novas substâncias com potencial para tratamento de desordens com base inflamatória. Neste cenário, princípios ativos de origem vegetal ainda despontam como uma fonte promissora para o

desenvolvimento de novos fármacos. Até o momento, a prospecção a partir de produtos naturais contribuiu para o tratamento da asma, pois quatro (β 2-agonistas, anticolinérgicos, metilxantinas e cromonas) das seis classes de fármacos usados para o tratamento desta doença têm origem no uso de plantas com propriedades medicinais (TAUR; PATIL, 2011).

Dentre a vasta gama de metabólitos secundários obtidos de plantas com propriedades medicinais destaca-se o triterpeno friedelina. A friedelina é classificada como um triterpeno pentacíclico e pode ser encontrada em diferentes espécies vegetais. Além disso, mostra-se possuidora de relevantes efeitos farmacológicos, que incluem ações antinociceptivas, antipiréticas e anti-inflamatórias (ANTONISAMY et al., 2011; SUNIL et al., 2013; ANTONISAMY et al., 2015). No entanto, até o momento, ainda não foram investigados os efeitos da friedelina sobre a resposta inflamatória alérgica. Cabe destacar também que os triterpenos possuem baixa solubilidade em água e propensão para a oxidação, o que restringe sua biodisponibilidade e impede que atinjam seus efeitos terapêuticos desejáveis (ADER et al., 2000). Logo, faz-se necessária a busca por estratégias capazes de garantir a adequada disponibilidade desta substância no sítio inflamatório.

Pesquisas recentes demonstram que os complexos de inclusão envolvendo ciclodextrinas e substâncias farmacologicamente ativas vêm contribuindo para revelar propriedades terapêuticas de substâncias com limitações físico-químicas (ZHU; TAN, 2014). Devido ao impacto positivo desta estratégia, a agência Food and Drug Administration (FDA) já autorizou o uso de formulações medicamentosas com ciclodextrinas como carreador de fármacos no mercado norte-americano (LAKKAKULA; KRAUSE, 2014).

Portanto, considerando todas as informações mencionadas anteriormente, este estudo objetivou investigar o efeito anti-inflamatório da friedelina e caracterizar a formação do seu complexo de inclusão em ciclodextrina. Em seguida, buscou-se avaliar o efeito da friedelina e do seu complexo com ciclodextrina sobre a inflamação alérgica no modelo de asma experimental.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Considerações gerais sobre a resposta inflamatória

A inflamação é uma resposta do organismo às agressões teciduais visando confinar a lesão e restaurar a homeostase do tecido. No entanto, ao ocorrer de maneira persistente e ultrapassando os limites fisiológicos do organismo, torna-se responsável por danos teciduais que estão envolvidos na patogênese de um grande número de doenças (HENSON, 2005; MEDZHITOV, 2008).

A inflamação pode ser avaliada a partir de vários aspectos que incluem o perfil de células e mediadores envolvidos, a área do organismo afetada, intensidade, evolução e tempo de duração. Quanto ao tempo de duração, a resposta inflamatória divide-se em aguda ou crônica. A inflamação aguda caracteriza-se por ser uma resposta de curta duração, enquanto a inflamação crônica evidencia-se pela constante exposição ao agente agressor ou quando o processo inflamatório agudo não foi capaz de limitar sua ação e eliminá-lo (FULLERTON; GILROY, 2016). Cabe mencionar que o perfil da resposta inflamatória também varia de acordo com as características do agente agressor (MEDZHITOV, 2008).

Componentes da resposta inflamatória mostram-se presentes na patogênese de diversas doenças, incluindo infecções, artrite reumatoide, gota, câncer, esclerose múltipla, enfisema, Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) e asma (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012; DONATE et al., 2012; GRANOT; JABLONSKA, 2015; CHAVAKIS, 2012; CHUNG, 2015; EDWARDS et al., 2015; FISHER; VOYNOW; GHIO, 2015).

A inflamação induz nas células residentes (como mastócitos, macrófagos e células epiteliais) ou emigrantes (neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos) a liberação de mediadores pré-formados, incluindo as proteases e aminas vasoativas, ou mediadores neo-sintetizados, como eicosanoides, citocinas e quimiocinas. Estes e outros mediadores contribuem para a ativação de diferentes tipos celulares e determinam o curso da inflamação (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012; FULLERTON; GILROY, 2016). No desenvolvimento dessas patologias, a mobilização de leucócitos para o sítio da lesão é um fator determinante para o curso da doença. Precusores de leucócitos localizados na medula óssea (MO) sofrem diferenciação e, posteriormente, norteados por quimiocinas, mobilizam-se para o local da agressão

utilizando moléculas de adesão expressas na superfície de leucócitos e células endoteliais e aumentam a expressão dos seus receptores na superfície celular (GRIFFITH; SOKOL; LUSTER, 2014).

Dentre os mediadores que participam do estabelecimento da resposta inflamatória, os lipídicos apresentam significativa contribuição. Nesta classe de moléculas, os mediadores derivados do ácido araquidônico são formados por duas vias distintas: a via de atuação da enzima ciclooxigenase (COX), que produz prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano, e a via da enzima lipoxigenase (LO), que leva à produção de leucotrienos (LTs) e lipoxinas. Os mediadores formados pela ação da COX e LO atuam em receptores acoplados à proteína G e desempenham inúmeras funções fisiológicas e patológicas (HAEGGSTROM et al., 2010; UMAR et al., 2016).

A enzima ciclooxigenase apresenta duas principais isoformas, nomeadas COX-1 e COX-2. A COX-1 está presente em processos fisiológicos, como na proteção renal e gastrointestinal, diferenciação de macrófagos e no processo de agregação de plaquetas. Já a COX-2 mostra-se como a isoforma ativada após estímulos inflamatórios, culminando na geração de prostaglandinas (PGD₂ e PGE₂) e efeitos na alteração da permeabilidade vascular. Já a lipoxigenase, outra enzima que atua no metabolismo do ácido araquidônico, promove a geração de leucotrienos que exercem intenso efeito sobre o músculo liso, levando à contração e ao aumento da permeabilidade vascular. Além disso, exercem efeitos sobre a migração de leucócitos e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-8) (GOSH et al., 2016; HADLEY et al., 2016; PERGOLA et al., 2016).

Citocinas e quimiocinas são moléculas que estão envolvidas com a regulação de diversas outras funções celulares, que incluem ativação, proliferação e diferenciação, e mostram-se diretamente associadas ao recrutamento de células para o sítio inflamatório (BORISH; STEINKE, 2003; GRIFFITH; SOKOL; LUSTER, 2014; ANDERSON; SOLARI; PEASE, 2015). Estas moléculas compartilham muitas semelhanças de ações, bem como ações pleiotrópicas, ou seja, uma mesma citocina pode atuar em diferentes tipos celulares, bem como uma mesma célula pode expressar receptores para mais de um tipo de citocina (ZHANG; JIANXIONG, 2007). O perfil destes mediadores durante a inflamação será definido pelo tipo de estímulo que desencadeou a resposta e a ativação dos linfócitos T helper (Th), que

poderão direcionar a produção de quimiocinas e citocinas para um perfil Th1 ou Th2, mais comumente descritos (BORISH; STEINKE, 2003).

Diferentes tipos celulares, como neutrófilos, macrófagos, fibroblastos e células epiteliais, expressam receptores para quimiocinas. Dentre estas, CCL3 (MIP-1 α), CXCL2 (MIP-2 α) e CXCL8 (IL-8) são importantes quimioatratantes em processos inflamatórios, sendo CCL3 mais comumente descrita como quimioatraente de linfócitos, neutrófilos e monócitos. CXCL2 e CXCL8 estão mais associadas ao recrutamento de neutrófilos e envolvidos na fisiopatologia de inflamações pulmonares (DRISCOLL, 1994; DRISCOLL, 2000; KONRAD; REUTERSHAN, 2012; SHEN; WANG; WANG, 2011). Além disso, níveis aumentados de IL-8 têm sido correlacionados com a gravidade de inúmeras doenças inflamatórias, como artrite e inflamação pulmonar aguda (BRENNAN et al., 2008; SHEN; WANG; WANG, 2011).

Ainda dentre estes mediadores destacam-se: TNF- α , IL-1 β e IL-6, que contribuem para a ativação e migração de leucócitos e células residentes nos tecidos que estão envolvidas em doenças inflamatórias, como artrite reumatoide (HIRANO, 2010). Junto com as quimiocinas, estas moléculas estão divididas de acordo com o tipo de respostas em que participam, sendo algumas descritas como mediadores de perfil Th1, Th2, Th17 e T regulatórias (T reg) (LLOYD; HESSEL, 2010).

2.2 Doenças respiratórias

As doenças respiratórias compreendem um grupo de patologias infecciosas e não infecciosas que comprometem as vias aéreas. São caracterizadas por provocarem limitação do fluxo de ar e reação inflamatória de intensidade variável. Neste contexto, as doenças pulmonares crônicas, como DPOC, fibrose pulmonar idiopática (FPI) e asma, estão entre as patologias que apresentam alta incidência e prevalência no mundo, apresentando alta mortalidade. Estima-se que 1,15 bilhões de pessoas no mundo sejam acometidas por alguma doença respiratória crônica, o que representa 16,4% da população mundial (SORIANO; CAMPOS, 2012). Além disso, mais de 50% dos casos ocorrem em pessoas que vivem em países de baixos ou médios rendimentos (OMS, 2007).

No Brasil, nos últimos oito anos as doenças respiratórias acometeram um grande número de indivíduos, causando elevados índices de internações e óbitos

(Tabela 1). Neste mesmo período, apenas no Estado de Alagoas foram registrados cerca de 150 mil internações, o que gera elevados custos para o Sistema Único de Saúde (SUS) (DataSUS, 2016). Além disso, no Brasil, o número de óbitos em indivíduos com doenças respiratórias crônicas tem crescido desde a década de 1980, principalmente na região Nordeste (SORIANO; CAMPOS, 2012). Cabe mencionar que este aumento ocorre mesmo havendo disponibilidade de medicamentos para o tratamento da asma, pois alguns pacientes não respondem ao tratamento com glicocorticoides e broncodilatadores de longa duração, indicando a necessidade de desenvolvimento de fármacos e estratégias terapêuticas mais eficientes (PRASAD, 2016).

Tabela 1 – Indicadores relacionados a doenças respiratórias em indivíduos atendidos pelo SUS no Brasil entre os anos 2008 e 2016.

Região	Custos (R\$)	Nº de Internações	Nº de Óbitos	Taxa Mortalidade
Norte	701.339.186,02	1.021.141	29.299	2,91
Nordeste	2.310.746.122,24	2.965.274	129.818	4,38
Sudeste	3.781.441.848,17	3.802.698	318.008	8,36
Sul	2.075.994.376,08	2.260.338	137.382	6,08
Centro-Oeste	767.223.028,22	915.006	42.418	4,64
TOTAL	9.636.754.561,02	10.964.457	657.299	5,99

Dados relacionados ao número de internações, óbitos, taxa de mortalidade e custos com doenças respiratórias no Sistema Único de Saúde no Brasil entre janeiro de 2008 e janeiro de 2016 (DataSUS, 2016).

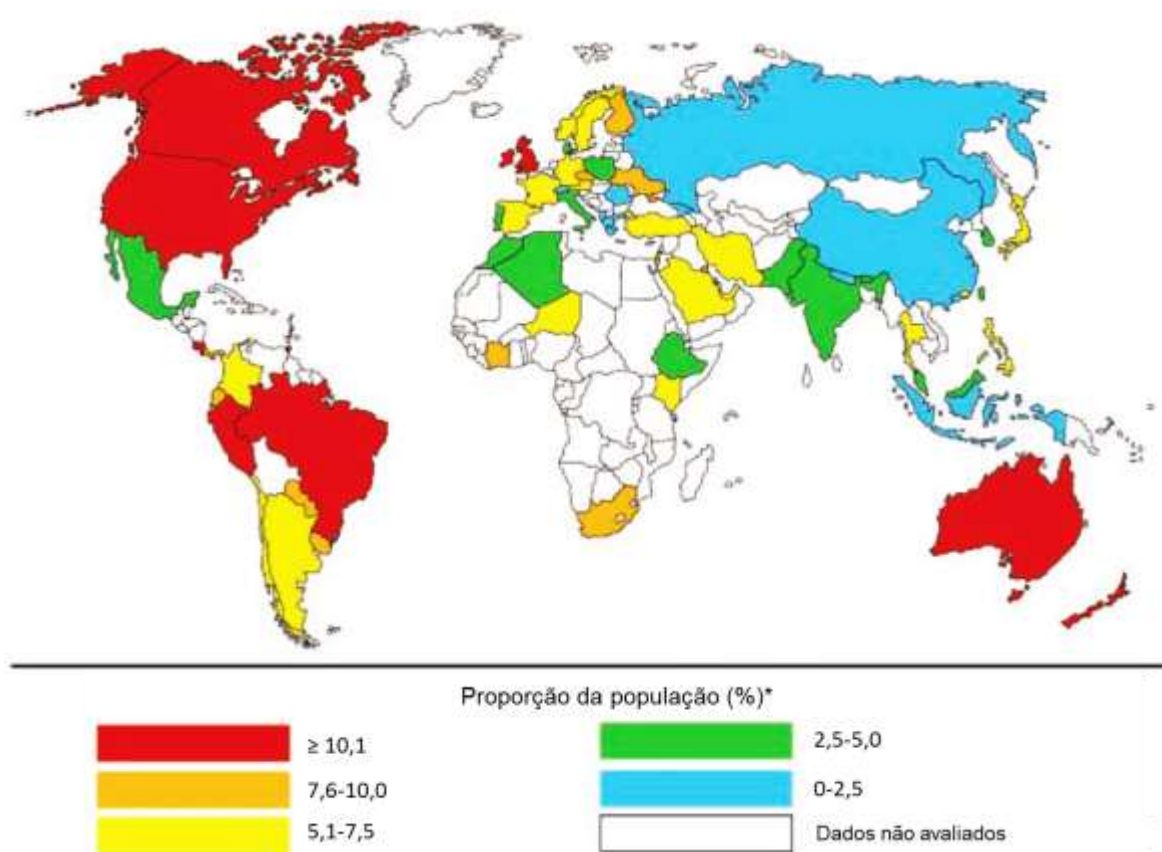
2.2.1 Asma

Segundo a Global Initiative for Asthma (GINA), a asma é caracterizada como uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, acompanhada de sintomas respiratórios como sibilo (chiado no peito), falta de ar, sensação de aperto no peito e tosse, associados à limitação do fluxo de ar de intensidade variável (GINA, 2015).

A asma apresenta-se como uma doença heterogênea que acarreta uma responsividade variável à terapêutica atual (BARNES et al., 2016). Considerando a diversidade de manifestação clínica da doença, a asma pode apresentar fenótipos distintos, sendo o mais comum a asma alérgica, que envolve um componente genético correlacionado à predisposição à alta produção de imunoglobulina tipo E (IgE). Além disso, mostra-se como o tipo mais comum em que os sintomas têm início na infância. Estes pacientes, em geral, apresentam boa resposta à terapêutica com corticoides inalatórios (CIs) (GINA, 2015).

Independente do tipo clínico da asma, esta patologia encontra-se entre as doenças inflamatórias crônicas que representam um grave problema de saúde pública da atualidade. Estudos têm demonstrado que a asma acomete cerca de 300 milhões de pessoas em todo o mundo, correspondendo a 4,1% da população mundial, e que em 2025 haverá um aumento de cerca de 100 milhões de indivíduos asmáticos (MASOLI; FABIAN; BEASLEY, 2004; ONU, 2015). Os países que possuem maior prevalência da doença são: Estados Unidos, Canadá, Brasil, Peru, Irlanda, Reino Unido e Austrália (Figura 1, p. 32).

Figura 1 – Distribuição geográfica da asma no mundo.



Proporção de indivíduos acometidos por asma nas diferentes regiões do planeta. Em vermelho, regiões onde mais de 10% da população possui asma. Em laranja, entre 7,6-10% da população. Em amarelo, cerca de 5,1-7,5% da população possui asma. Em verde, entre 2,5 e 5 % da população. Em azul, até 2,5% da população possui asma, e em branco, regiões que não possuem estudos epidemiológicos sobre a problemática (adaptado de MASOLI; FABIAN; BEASLEY, 2004).

No Brasil, estima-se que cerca de 20 milhões de pessoas tenham asma (SBPT, 2012). Nos últimos oito anos, as internações por asma atingiram o número de 1.298.239 internações, correspondendo a cerca de 445 internações/dia. Neste mesmo período, a taxa de mortalidade foi de aproximadamente 6%. Dentre as regiões do país o Nordeste desponta como possuidor do maior número de internações e maior mortalidade por asma (Tabela 2, p. 33). Nesta região, o Estado de Alagoas apresenta uma maior taxa de mortalidade: 0,82 (DataSUS, 2016).

Tabela 2 – Número de internações e óbitos por asma no Brasil de janeiro de 2008 a janeiro de 2016.

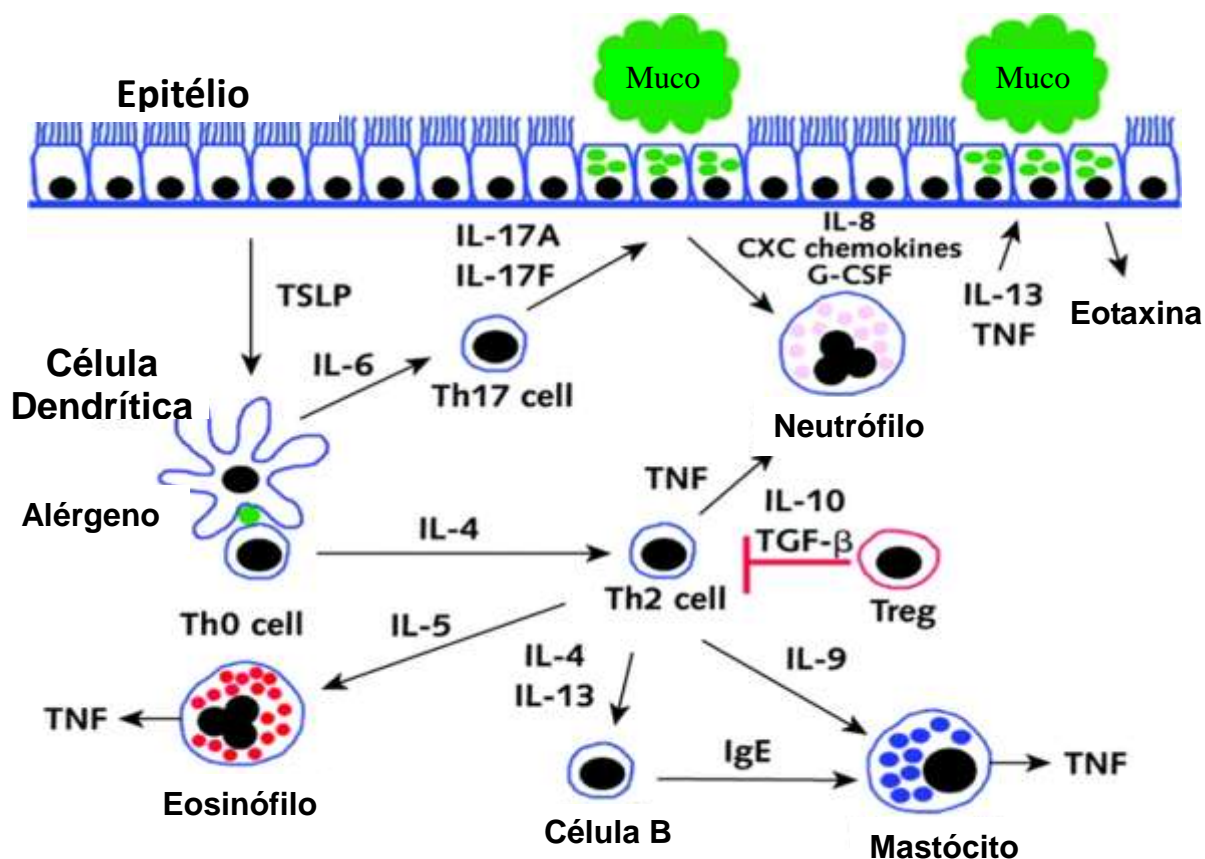
Região	Nº de Internações	Nº de Óbitos	Valor total (R\$)
Região Norte	141.130	266	701.339.186,31
Região Nordeste	582.620	2293	2.310.756.122,24
Região Sudeste	287.914	1.971	3.781.441.848,17
Região Sul	192.567	939	2.075.994.376,08
Região Centro-Oeste	94.008	498	767.223.028,22
TOTAL	1.298.239	5967	9.636.754.561,02

Números relacionados a internações, óbitos e custos ao sistema de saúde por asma registrados no Brasil no período de janeiro de 2008 a janeiro de 2016 (dados obtidos do DataSUS, 2016).

A asma é caracterizada por uma resposta imune exacerbada a agentes ambientais, normalmente inócuos, como ácaros, fungos e pólen (ZEYFIZADEH et al., 2015). O processo de sensibilização de indivíduos inicia quando alérgenos penetram no organismo e são captados por células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas (DC), e na presença de citocinas, como a IL-4 e IL-13, são apresentadas aos linfócitos T. Esta apresentação resulta na ativação de linfócito T, que passa a expressar o perfil Th2 e induzirá a produção de IgE. Estas IgEs, por serem citotrópicas, passarão a interagir com seus receptores de alta afinidade (FcεRI) na superfície de células-alvo, como mastócitos e basófilos. A partir de uma segunda exposição ao alérgeno, inicia-se a fase precoce da resposta alérgica que envolve a ativação e a desgranulação de mastócitos, liberando mediadores pré-formados e estimulando a produção/secreção de outra classe de mediadores, denominados neo-sintetizados (COCHRANE et al., 2015; HOLGATE et al., 2015).

Na fase tardia, 2-4 h após a exposição ao alérgeno, a liberação aumentada de mediadores pró-inflamatórios contribuirá para o aumento do infiltrado celular e geração de edema (Figura 2, p. 35) (GALLI; TSAI, 2012; MULLOL et al., 2008).

Figura 2 – Desenvolvimento da reação inflamatória alérgica.



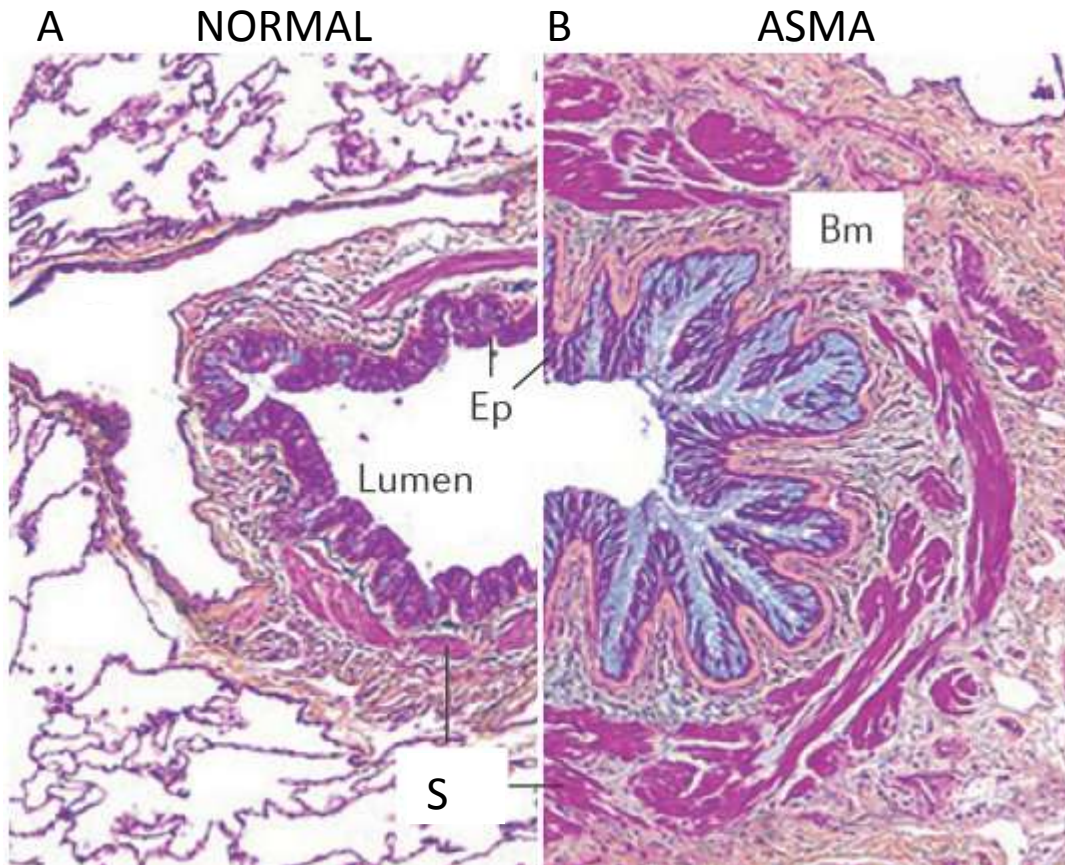
Ativação celular em reações alérgicas contribuindo para o estabelecimento da resposta inflamatória, característica em muitas desordens alérgicas (adaptado de LEVINE; WENZEL, 2010).

Na asma, os efeitos das citocinas IL-4 e IL-13 têm sido bastante estudados, visto que estas citocinas atuam em linfócitos B, contribuindo para a produção de IgE, bem como a ativação de células caliciformes produtoras de muco, que contribuirá para a obstrução do fluxo de ar das vias aéreas. Além disso, juntamente com IL-9, estas citocinas contribuem para a ativação de mastócitos e basófilos, que se ligarão a receptores de alta afinidade na superfície de linfócitos B (ZEYFIZADEH et al., 2015).

Em resposta à exposição ao antígeno, as vias aéreas de indivíduos asmáticos exibem alterações em decorrência do intenso infiltrado celular que inclui eosinófilos, mononucleares, mastócitos e, em casos mais graves, neutrófilos (KUDO; ISHIGATSUBO; AOKI, 2013). A presença destas células e dos mediadores liberados por elas e por células estruturais contribuem para alterações na microarquitetura das vias respiratórias. Diversas alterações podem ser visualizadas nas vias respiratórias de pacientes asmáticos, como espessamento da parede das vias aéreas, diminuição do lúmen dos brônquios, produção de muco por células caliciformes, colapso

alveolar, produção excessiva de componentes de matriz extracelular e remodelamento das vias aéreas, que levam à fibrose tecidual. Todas estas alterações (Figura 3) contribuem para o agravamento da doença (HOLGATE et al., 2015).

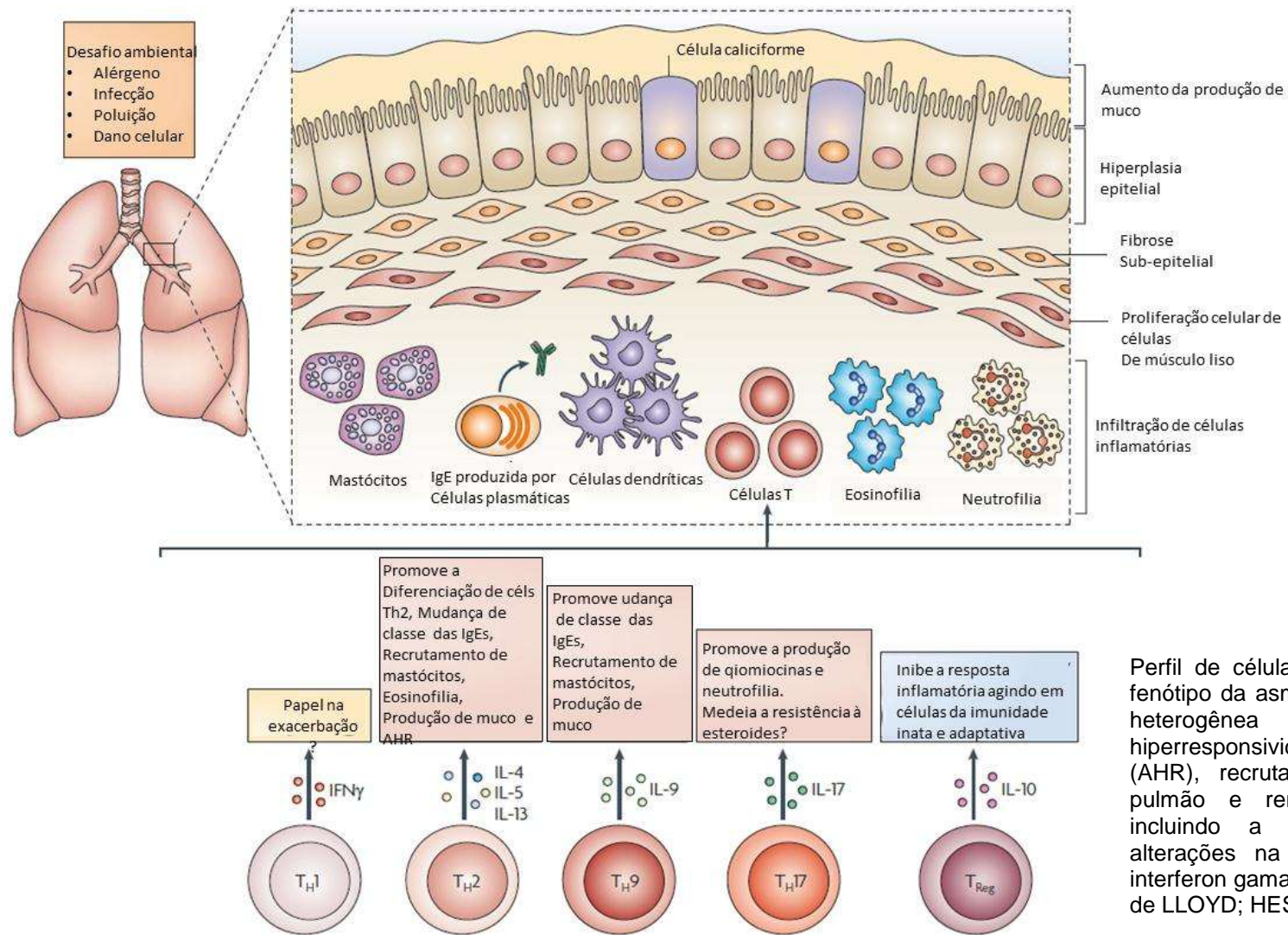
Figura 3 - Alteração histológica do pulmão de indivíduos asmáticos.



Corte histológico de um pulmão de indivíduo saudável (imagem A, NORMAL) e de um indivíduo asmático (Imagem B, ASMA). Em A, observa-se a preservação da microarquitetura do pulmão, exibindo alvéolos com paredes delimitadas e livres de infiltrado inflamatório. Além disso, observamos um bronquíolo, músculo liso (S), células epiteliais preservadas (Ep) e o lúmen de um bronquíolo (lúmen). Já em B, observa-se as alterações na microarquitetura do pulmão de um indivíduo com asma: intenso infiltrado celular, presença de fibrose tecidual, inflamação de células epiteliais com estreitamento da luz do brônquio, diminuindo o lúmen. Bm= Membrana basal (adaptado de WADSWORTH, 2013).

Os diferentes tipos de células T são necessários para influenciar a natureza e a magnitude da resposta inflamatória alérgica e as citocinas que elas secretam. As células Th2 são necessárias para promover o recrutamento de eosinófilos em conjunto com células Natural Killer (NK) e CD8⁺. Corroborando com a fisiopatologia da asma, células Th1 e Th17 estão associadas com a severidade da doença e asma resistente a corticoides, que é marcada por um maior infiltrado neutrofílico e presença de citocinas e quimiocinas de perfil Th1 e Th17. Além disso, a presença de células T regulatórias e subtipos gama-delta são hábeis em diminuir a resposta imune pulmonar, importantes para a manutenção da homeostase no pulmão. A natureza e a magnitude da inflamação alérgica no pulmão são influenciadas por estímulos do ambiente, tais como a exposição a alérgenos e poluentes, bem como infecções a patógenos (Figura 4, p. 38) (LLOYD; HESSEL, 2010).

Figura 4 – Células envolvidas na indução dos diferentes fenótipos na alergia.



A elevação dos níveis de IL-6 e IL-17 no fluido do lavado broncoalveolar tem sido observada em pacientes portadores do tipo grave da doença. Adicionalmente, os asmáticos também exibem níveis elevados de IL-4, IL-5 e IL-13, o que favorece a gravidade e a hiperresponsividade das vias aéreas (LAMBRECTH; HAMMAD, 2012; PETERS et al., 2016a; PETERS et al., 2016b).

Além das citocinas descritas, a eotaxina possui participação importante no recrutamento de eosinófilos para o sítio inflamatório. Juntamente com a IL-5, mantém a ativação e a sobrevivência de eosinófilos nas vias aéreas e, por consequência, a severidade das manifestações clínicas da asma (SHIMIZU et al., 2012). Considerando estas ações, o impedimento na síntese e/ou ação destes mediadores no sítio inflamatório constitui uma importante estratégia para o desenvolvimento de fármacos (XUE-MEI; HAN-XIAO, 2015).

Apesar de a maioria dos mediadores mencionados anteriormente estarem relacionados com o estabelecimento e a manutenção da resposta inflamatória, há citocinas cujas ações resultam em atenuação da inflamação, como é o caso da IL-10. Esta interleucina inibe a ativação e a secreção de citocinas por mastócitos e eosinófilos, suprime a apresentação de antígenos por células dendríticas, bem como reduz a ativação de linfócitos de perfil Th2 (LLOYD; HESSEL, 2010). Diferentes subtipos de células T estão envolvidos na heterogeneidade da asma e contribuem para a ativação de células epiteliais, proliferação de células do músculo liso e leucócitos que participam das alterações que ocorrem nas vias aéreas em doenças respiratórias (BORISH; STEINKE, 2003, LLOYD; HESSEL, 2010).

Cabe mencionar que as citocinas pró-inflamatórias podem incrementar a intensidade da resposta inflamatória por vários mecanismos, dos quais o estímulo à produção de radicais livres é importante na gravidade de desordens respiratórias. As espécies reativas são um importante componente com funções relevantes para a defesa contra patógenos. Os macrófagos, por exemplo, ao fagocitarem microrganismos, contam com a ajuda destas moléculas para neutralizar o agente agressor. Nas situações patológicas, a contínua ativação celular e a produção aumentada de espécies reativas contribuem para a lesão tecidual e a progressão de desordens inflamatórias (RAHMAN et al., 2006). Em contrapartida, o organismo dispõe de mecanismos capazes de garantir a eliminação destas espécies reativas através de agentes antioxidantes endógenos enzimáticos. Dentre as enzimas capazes de agir como antioxidantes têm-se: heme-oxigenase-1 (HO-1), superóxido

desmutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GSHPX) e redutase (GR). Estas enzimas têm sua síntese iniciada através da ativação do fator transcricional relacionado a eritrócitos (Nrf2). Quando há um desequilíbrio na geração de espécies reativas, o Nrf2 sofre uma translocação para o núcleo da célula e promove a transcrição de genes-alvo no processo antioxidante (KINNULA, 2005; RAHMAN et al., 2006; CHENG et al., 2016).

2.2.2 Aspectos gerais no tratamento da asma

O tratamento das doenças respiratórias, em especial a asma, é sintomático e há décadas feito com uso de anti-inflamatórios (glicocorticoides - GC) e broncodilatadores (agonistas adrenérgicos ou antagonistas colinérgicos). Além destes, ainda são utilizados os estabilizadores de mastócitos (cromonas), inibidores de fosfodiesterases (PDE) e inibidores da ação de leucotrienos, sendo esta última classe a mais recente aprovada para o tratamento da asma (BARNES, 2015).

Os GC são os fármacos mais usados para tratamento da asma. Foram descobertos na década de 1950 e passaram a ser uma importante ferramenta para o controle das crises alérgicas e de muitas outras desordens inflamatórias. Esta classe de fármaco sofreu inúmeras modificações químicas que possibilitaram ampliar o leque disponível de formulações, com o propósito de minimizar seus efeitos adversos e aperfeiçoar as ações farmacológicas de interesse (DERENDORF; MELTZER, 2008).

Em geral, os GC reduzem o número de eosinófilos, linfócitos T, monócitos, mastócitos e células dendríticas nas vias aéreas, por atuarem em receptores intracelulares que, ao serem ativados, são translocados para o núcleo da célula, onde se ligam a sequências específicas de ácido desoxirribonucléico (DNA) e promovem a inibição da transcrição gênica de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (BARNES, 2013b).

Os GC inibem, ainda, a liberação de mediadores lipídicos, sendo bastante eficazes no tratamento da maioria das condições inflamatórias. No entanto, devido à inibição de diversos mediadores com importância fisiológica, apresentam efeitos adversos graves, como alteração no metabolismo lipídico, proteico, retenção hídrica e imunossupressão (Tabela 3, p. 40) (BARNES; ADCOCK, 2003; PELAIA et al., 2003; DERENDORF; MELTZER, 2008). Devido aos vários efeitos adversos dos GC e

ao elevado número de pacientes que apresentam resistência à corticoterapia, situações que comprometem a qualidade de vida destes pacientes, há um esforço na atualidade para ampliar as terapias capazes de controlar esta doença (BARNES, 2016).

Tabela 3 – Efeitos colaterais mais comuns associados ao uso de corticosteroides.

Curto prazo	Longo prazo	
Intolerância gastrointestinal	Sistema muscular/ósseo	Retardo no crescimento, osteoporose, Miopatia
Predisposição à infecção	Sistema hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA)	Síndrome de Cushing e diabetes
Comprometimento na cicatrização, insônia	Sistema gastrointestinal	Gastrite, úlcera péptica e pancreatite
Retenção de fluidos, acne	Oftalmológica	Catarata e glaucoma
Alterações no humor, fraqueza	Metabolismo	Hiperglicemia, hiperlipidemia, hipocalcemia e hipocloremia

(adaptado de BARNES; ADCOCK, 2003; PELAIA et al., 2003; DERENDORF; MELTER, 2008).

Outro grupo de medicamentos utilizado no tratamento da asma que exibe efeito satisfatório na maioria dos pacientes quando em associação com os GC são os broncodilatadores (DUCHARME et al., 2010). Os broncodilatadores atuam de duas formas: os agonistas beta-adrenérgicos mostram-se seletivos para receptores β_2 -adrenérgicos na musculatura lisa das vias aéreas, enquanto os antagonistas colinérgicos ligam-se a receptores colinérgicos muscarínicos na musculatura lisa das vias aéreas, impedindo sua ativação. O efeito final de ambas as classes é a broncodilatação, promovendo uma melhora do fluxo de ar e diminuição da secreção de muco nos pacientes (NELSON, 1995; WASILEWSKI; LOUGHEED; FISHER, 2014). Porém, apesar da eficácia em grande parte dos pacientes, os broncodilatadores apresentam efeitos adversos importantes, incluindo palpitações, irritabilidade e dores de estômago (NELSON, 2006).

Dentre os fármacos broncodilatadores amplamente utilizados na clínica para o tratamento da asma tem-se a teofilina (WOOD, 1996). A teofilina foi bastante empregada para aliviar os sintomas da asma até a década de 1990, mas devido a limitações farmacocinéticas e à disponibilidade de outras classes de broncodilatadores, passou a ser indicada apenas em pacientes não responsivos a

combinações de GC e agonistas beta-adrenérgicos (WOOD, 1996; BARNES, 2013a). Atualmente, com a disponibilidade de novas formulações farmacêuticas, este fármaco voltou a ser alvo de estudos clínicos (BARNES, 2010; BARNES, 2013a).

As cromonas (cromolina sódica e nedocromil sódico) mostram-se como fármacos capazes de estabilizar a membrana de mastócitos e prevenir a ativação deste tipo celular na condição asmática. Estes foram os primeiros medicamentos utilizados exclusivamente para o controle da asma. No entanto, devido ao advento das outras classes terapêuticas, as cromonas são usadas com menor frequência nos dias atuais (WOOD, 1996; SULAIMAN et al., 2016).

A classe de medicamentos mais recentemente aprovada para o tratamento da asma é a dos fármacos que interferem na ação dos leucotrienos. Duas vias mecánísticas são usadas para este propósito: os inibidores da enzima 5-LO (Zileuton) e os antagonistas de receptores de CysLT1 (Montelukast, Pranlukast e Zafilukast). Tais medicamentos diminuem os efeitos dos leucotrienos, que, durante o processo inflamatório, contribuem para o recrutamento de células e alterações na musculatura lisa, levando, assim, à broncoconstricção. Porém, seus benefícios em doenças alérgicas são restritos a grupos reduzidos e específicos de pacientes (NIALS; UDIN, 2008; GOSH et al., 2016).

Apesar das classes de medicamentos mencionadas, ainda há poucas opções de fármacos para oferecer estratégias terapêuticas eficazes e seguras aos pacientes asmáticos. Por isso, a identificação de princípios ativos que sejam seguros e mais eficazes que a terapêutica atual continua a ser estimulada para proporcionar um melhor controle da asma (BARNES, 2015; SULAIMAN et al., 2016).

2.3 Recursos vegetais como fonte de medicamentos

O uso dos recursos naturais é feito pelo homem há milhares de anos e continua amplamente empregado em várias partes do mundo, como fontes de alimento ou para sanar enfermidades (SKIRYCZ et al., 2016).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define plantas medicinais como “espécies vegetais a partir das quais produtos de interesse terapêutico podem ser obtidos e usados na espécie humana como medicamento”. Assim, há a necessidade da realização de estudos com o propósito de comprovar a eficácia e a segurança de produtos oriundos de espécies vegetais para que seus benefícios sejam úteis à sociedade (BRASIL, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) reuniu conhecimentos científicos sobre o uso de recursos naturais na terapêutica e disponibilizou a publicação de compêndios sobre diversas espécies vegetais, nos anos 1999, 2002, 2007 e 2009, totalizando informações sobre 117 espécies (WHO, 2009). Nestes documentos, a OMS buscou proporcionar o conhecimento científico sobre a eficácia e a qualidade de plantas medicinais comumente usadas, servindo de base para que os países possam desenvolver seus próprios compêndios sobre as espécies de maior interesse para a sua população (WHO, 2003).

No Brasil, com a regulamentação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (PNPIC-SUS), por meio do decreto Federal 5.813, de 22 de junho de 2006 (BRASIL, 2006), houve uma valorização das plantas medicinais como fonte de princípios ativos para fins terapêuticos. Tanto que, anos mais tarde, em 2009, o Ministério da Saúde divulgou o livro denominado Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), com o objetivo de “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (BRASIL, 2009). Estas ações têm garantido a difusão ordenada do conhecimento sobre plantas medicinais, além de impulsionar o desenvolvimento científico e tecnológico por meio da inovação com base na biodiversidade brasileira e de acordo com as necessidades da população (BRASIL, 2009).

No ano 2010, ainda com o objetivo de orientar pesquisas e ampliar a lista de medicamentos fitoterápicos disponíveis na assistência farmacêutica básica em todo

o país, o Ministério da Saúde divulgou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (ReniSUS). Esta lista com nomes de plantas foi composta inicialmente por 71 espécies vegetais elencadas a partir de dados etnobotânicos e estudos pré-clínicos e clínicos sobre seus efeitos farmacológicos e terapêuticos (BRASIL, 2010).

Apesar do esforço do Ministério da Saúde em listar e organizar os conhecimentos sobre as propriedades terapêuticas de espécies vegetais e considerando toda a diversidade existente no Brasil, poucas espécies foram adicionadas a lista da ReniSUS, uma vez que as espécies utilizadas pela população brasileira não se limitam às contidas na lista. Esta discrepância pode ser explicada em parte, pois apenas cerca de 5-15% das espécies vegetais que ocorrem no território brasileiro foram estudadas sob aspectos fitoquímicos ou farmacológicos (McCHESNEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007).

Mesmo assim, diversos são os exemplos de princípios ativos vegetais isolados de plantas com propriedades terapêuticas. Muitas destas substâncias serviram como protótipo para o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de uma grande variedade de doenças (VALENÇA; SILVA; BERDINI, 2015). Como exemplo, pode ser mencionada a salicilina, um glicosídeo natural isolado da espécie *Salix alba* (Salicilaceae), que serviu de base para o desenvolvimento da classe de medicamento mais prescrita no mundo, os anti-inflamatórios não esteroidais (Aines) (SHARA; STOHS, 2015). Outros exemplos são as cromonas e a teofilina, que foram isoladas inicialmente das espécies *Asmi visnaga* e *Camellia sinensis*, respectivamente, e que são utilizadas no tratamento de doenças alérgicas (EDWARDS, 2014; ITO; CROZIER; ASHIHARA, 1997).

Nas últimas décadas, ocorreram muitos investimentos no Brasil com o propósito de incrementar a aproximação entre pesquisadores e a indústria farmacêutica. Estes esforços propiciaram não apenas a elucidação química de princípios ativos, mas também a caracterização das propriedades farmacológicas de diversas substâncias. Como resultados desta ação, houve um significativo aumento no número de patentes depositadas por pesquisadores brasileiros, no Brasil e no exterior, sobre extração de princípios ativos vegetais para fins terapêuticos. Como exemplo de sucesso, pode ser mencionado o medicamento Acheflan[®], desenvolvido pelo Laboratório Farmacêutico Aché e indicado para o tratamento de doenças inflamatórias, que tem como princípio ativo o α -humuleno, um terpeno da classe

sesquiterpeno isolado da espécie *Cordia verbanacea* DC. (Boraginaceae) (MEDEIROS et al., 2007).

Vários estudos reforçam que outras classes de terpenos, obtidos de diferentes espécies vegetais, apresentam efeitos farmacológicos relevantes e que podem ser utilizados para o tratamento de distúrbios inflamatórios. A espécie *Carapa guianensis*, por exemplo, conhecida popularmente como andiroba, possui uma grande quantidade de tetraterpenoides responsáveis por efeitos anti-inflamatórios em modelos de inflamação não alérgica e alérgica (PENIDO et al., 2005; FERRARIS et al., 2011).

Estudos fitoquímicos com a espécie vegetal *Clusia nemorosa* Mey, utilizada para fins medicinais no Nordeste brasileiro, demonstraram a presença do triterpeno pentacíclico friedelina como metabólito secundário majoritário em diferentes partes da planta (ANDRADE et al., 1998). Reforçando a propriedade desta planta para fins medicinais, em estudos recentes, realizados pelo nosso grupo de pesquisa na Ufal, demonstrou-se que os extratos obtidos das folhas de *C. nemorosa* foram capazes de apresentar significativos efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos (FARIAS et al., 2012; FERRO et al., 2013).

2.4 Terpenos

Os terpenos mostram-se como uma grande classe de metabólitos secundários formada por mais de 50.000 compostos identificados em diversas espécies vegetais. Estes compostos estão relacionados com uma grande variedade de efeitos farmacológicos relevantes, que incluem ação antiplaquetária, antioxidante, antitumoral, analgésica e anti-inflamatória (PATERAKI; HESKES; HAMBERGER, 2015).

Frequentemente utilizados de forma imprópria para descrever o mesmo composto, os termos terpeno e terpenoide possuem uma diferenciação que é importante mencionar. Enquanto o termo terpeno é um coletivo para descrever substâncias naturais, o termo terpenoide inclui não apenas os produtos de metabolismo natural, mas também seus derivados sintéticos.

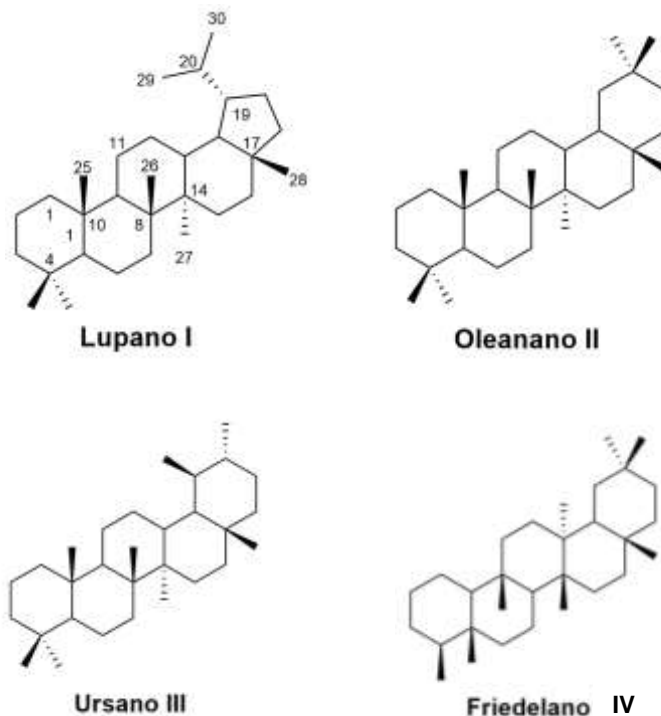
Os terpenos apresentam estrutura química bastante variada, sendo formados e classificados de acordo com o número de unidades isoprênicas (C_5H_8) de hidrocarbonetos, como hemiterpenos (1 unidade isoprênica), monoterpenos (2

unidades), sesquiterpenos (3 unidades), diterpenos (4 unidades), sesterpenos (5 unidades), triterpenos (6 unidades) e tetranoterpenos (8 unidades) (JANOCHA; SCHIMITZ; BERNAHARDT, 2015).

Os terpenos mostram-se presentes em nosso cotidiano, seja de forma natural, como nas frutas, alimentos ricos em monoterpenos, ou de forma industrializada, funcionando como base para a síntese de cosméticos e medicamentos (AMORIM et al., 2016). Como exemplo, podem-se mencionar o timol e o eucaliptol, utilizados na indústria de medicamentos devido a suas ações expectorantes, descongestionantes e anti-inflamatórias. Outro terpeno bastante conhecido é o betacaroteno (tetraterpeno), precursor da vitamina A, que possui funções fisiológicas importantes, como o desenvolvimento da retina e do sistema respiratório (HORIGUCHI et al., 2016).

Os triterpenos de forma molecular ($C_{30}H_n$) podem apresentar esqueleto de carbono acíclico ou conter estruturas mono-, bi-, tri-, tetra- e pentacíclicas. Além disso, podem ocorrer de forma livre ou como ésteres ou glicosilados (triterpenos saponinas). Na perspectiva de atividades farmacológicas, as estruturas triterpênicas relevantes são aquelas que possuem os esqueletos de carbono do oleanano, ursano, lupano e friedelano (triterpeno pentacíclico). O esqueleto oleanano é o mais amplamente descrito, cerca de 50% dos triterpenos, e é amplamente presente em espécies dos gêneros *Glycyrrhiza*, *Aralia*, *Panax* e *Liguticum*, com diferentes utilizações farmacológicas, como diurético, cardiotônico e hipogliceminate. Os triterpenos de esqueleto ursano estão distribuídos em espécies com efeitos farmacológicos importantes, como as espécies dos gêneros *Cornus*, *Boswellia*, *Centella*, *Glycyrrhiza* e *Terminalia*, usadas pela medicina tradicional como anti-inflamatórias e quimioprotetoras contra o câncer. Já os triterpenos de esqueleto lupano estão presentes em espécies dos gêneros *Virburnum*, *Acacia* e *Acanthopanax*, usadas popularmente como anti-inflamatórias, anti-proliferativas e inibidoras de topoisomerasas I e II (Figura 5, p. 47) (ALQAHTANI et al., 2013; KVASNICA et al., 2015).

Figura 5 – Estrutura molecular do esqueleto-base de triterpenos pentacíclicos



Estrutura química dos tipos de triterpenos descritos. Esqueleto lupano (I), oleanano (II), ursano (III) e friedelano (IV) (Fonte: KVASNICA et al., 2015).

As propriedades farmacológicas dos triterpenos são muito diversificadas, pois podem apresentar efeitos anti-inflamatórios, hepatoprotetores, antidiabéticos, antinociceptivos, antimicrobianos e cicatrizantes (MUCENIECE et al., 2016; HILL; CONNOLLY, 2013; JESUS et al., 2015; AGRA et al., 2015).

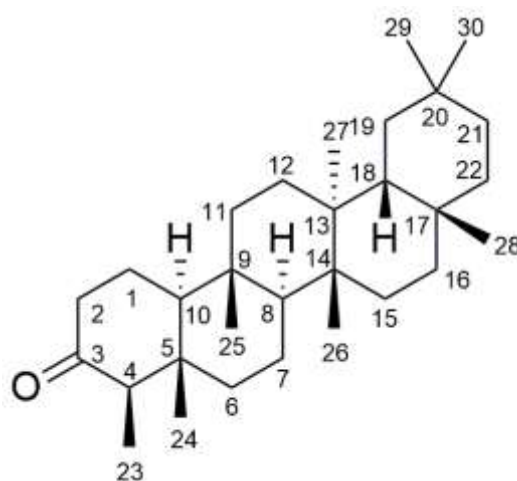
Ácido ursólico, ácido oleanoico e lupeol, triterpenos com esqueleto ursano, oleanano e lupano, respectivamente, possuem diversos efeitos biológicos descritos na literatura, como a capacidade de inibir a migração celular, induzir a apoptose de células e reduzir a angiogênese, que contribuem para suas propriedades anti-inflamatórias, anti-proliferativas e antitumorais (PATOLLA; RAO, 2012).

Dentre os efeitos farmacológicos descritos para compostos da classe friedelano destacam-se os potenciais vasorelaxante, antihipertensivo, antinociceptivo, anti-edematosos e antimicrobianos (JIAO et al., 2007; ANTONISAMY et al., 2011; SUNIL et al., 2013; CHINSEMBU, 2016).

2.5 Friedelina

No grupo dos triterpenos pentacíclicos, destaca-se a friedelina. Este triterpeno está presente em diferentes espécies vegetais, como espécies do gênero *Callophyllum*, *Maytenus*, *Azima*, *Vismia* e *Clusia* (TAMOKOU et al., 2009; RIBEIRO et al., 2011). A friedelina é formada por três unidades isoprênicas distribuídas em cinco anéis de carbono formados apenas por ligações saturadas. Analisando sua estrutura química, observa-se a presença de uma carbonila no carbono 3, seguida da presença de um grupamento CH₃ nos carbonos 4, 5, 9, 13, 14 e 17, e dois grupamentos CH₃ no carbono 20, sendo comum a presença de grupamentos metil em estrutura com esqueleto triterpênico (Figura 6).

Figura 6 – Estrutura molecular da friedelina.



Fonte: Sigma-aldrich

A friedelina está presente em plantas com diferentes propriedades medicinais, como *Clusia nemorosa* Mey e *Maytenus illicifolia*, que possuem efeitos antinociceptivos, anti-inflamatórios e anti-ulcerogênicos, respectivamente (FERRO et al., 2013; FARIAS et al., 2012; JIAO et al., 2007). Cabe destacar, ainda, a friedelina como um importante triterpeno pentacíclico da classe friedelano, devido às suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Em particular, estudos recentes reportam a capacidade da friedelina em reduzir a formação do edema de pata induzido por carragenina em ratos. Além disso, acarreta em uma redução da

inflamação gástrica em camundongos, por interferir com os níveis locais de IL-6 e TNF- α (ANTONISAMY et al., 2015).

Apesar dos vastos e relevantes efeitos farmacológicos da friedelina, as propriedades físico-químicas deste triterpeno impõem restrições às suas ações farmacológicas, devido à baixa solubilidade em meio aquoso, o que certamente impede de explorar ainda mais seus efeitos em sistemas biológicos. Por isso, muitas estratégias são propostas para favorecer a solubilidade de terpenos, com o propósito de melhorar suas propriedades físico-químicas e expandir suas aplicações (LIMA et al., 2016). Dentre as estratégias utilizadas para atingir tais melhorias, podem ser mencionadas as modificações na estrutura química do princípio ativo e o uso de substâncias carreadoras. Considerando estes dois exemplos, o emprego de moléculas carreadoras mostra-se mais interessante, pois, com este método, evitam-se modificações químicas na estrutura do princípio ativo que possam comprometer suas propriedades farmacológicas (GOMES et al., 2015).

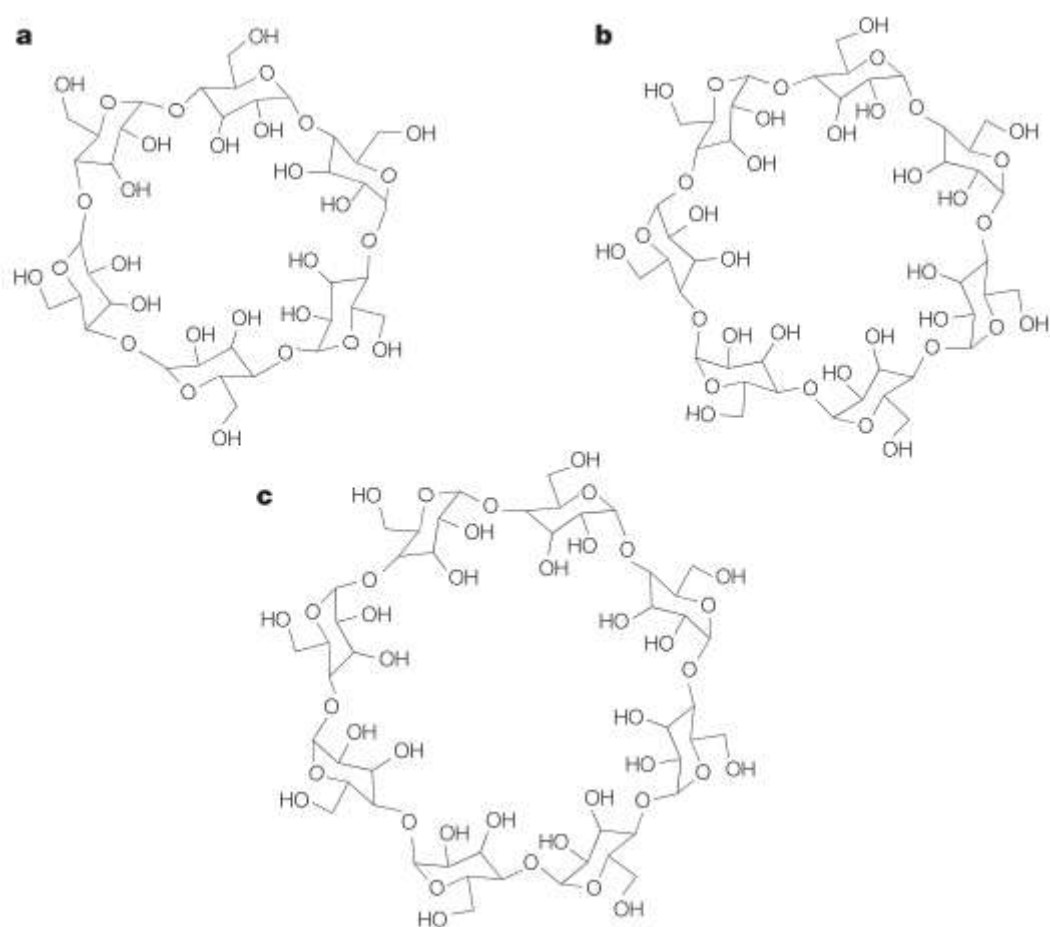
Diferentes autores têm mostrado que o uso de estratégias carreadoras de fármacos apresenta-se como uma importante ferramenta na melhora da solubilidade de metabólitos obtidos de plantas medicinais, bem como na otimização de seus efeitos farmacológicos. Com isso, o uso de sistemas nanométricos baseados em lipossomas e ciclodextrinas têm sido largamente aplicado, promovendo incremento nos efeitos farmacológicos de substâncias com potencial anti-inflamatório e anticancerígeno (AKTHAR; KHAN, 2016; LIMA et al., 2016).

2.6 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos formados por unidades de glicopirranose unidas por ligações glicosídicas α -1,4. Estas moléculas podem ter origem natural ou sintética. As CDs naturais apresentam 6, 7 ou 8 ligações glicosídicas, sendo denominadas, respectivamente, de alfa, beta e gama ciclodextrinas (Figura 7, p. 49). As CDs apresentam estrutura tronco de formato cônico, onde a face externa é hidrofílica e sua cavidade interna é lipofílica, acomodando com facilidade substâncias com baixa solubilidade em meio aquoso. Sua estrutura ocorre devido à falta de livre rotação das ligações glicosídicas e da conformação em cadeia das unidades de glicose (SZEJTLI, 1998; CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007). Os grupamentos hidroxílicos (OH) presentes nas

extremidades das CDs contribuem para o tamanho de suas extremidades: as hidroxilas presentes nos carbonos C2 e C3 são secundárias, constituem uma cadeia relativamente rígida, com pouca rotação, e estão localizadas na extremidade mais larga. Já as hidroxilas presentes no carbono C6 são primárias, e estão localizadas na extremidade mais estreita na CD (BEKERS; UITENDAAL; BEIJNEN, 1991).

Figura 7 – Estrutura molecular dos tipos de ciclodextrinas naturais.



Os três tipos de ciclodextrinas de ocorrência natural: (a) α -ciclodextrina, (b) β -ciclodextrina e (c) γ -ciclodextrina (Fonte: DAVIS; BREWSTER, 2004.).

Após sua caracterização e reconhecimento das suas propriedades, passaram a ser avaliadas quanto à sua principal característica: a capacidade de hospedar outras moléculas no interior da sua cavidade. Além disso, são intensamente estudadas na complexação de fármacos que apresentam baixa solubilidade em meio aquoso (GUEDES et al., 2008).

Atualmente, há disponível no mercado um número variável de ciclodextrinas naturais e sintéticas, com propriedades físico-químicas distintas, permitindo aperfeiçoar a sua aplicação. A diversidade de tipos de CDs disponíveis, aliada ao fato de serem produtos seminaturais obtidos por reação enzimática relativamente simples, a produção em escala industrial com uso de tecnologia que não agride o meio ambiente, custos que compensam a sua utilização e sua característica de *host-guest* são fatores que fazem com que a ciclodextrina seja amplamente usada por diversos setores da indústria para aplicação e consumo por seres humanos (SZEJTLI, 1998).

A solubilidade das ciclodextrinas se dá pela presença de grupos hidroxilas nas extremidades da molécula. No entanto, as ciclodextrinas naturais possuem limitação quanto à sua solubilidade em água. Por isso, diferentes derivados de ciclodextrinas foram formulados para melhorar as propriedades físico-químicas das CDs naturais, principalmente das β -CD (BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

Atualmente, as CDs sintéticas ganharam importância no cenário de desenvolvimento farmacotécnico de formulações, principalmente pela possibilidade de aumentar a solubilidade e diminuir a toxicidade das CDs naturais, sendo as CDs hidroxiladas bastante utilizadas por apresentarem elevada solubilidade e baixa toxicidade (Tabela 4, p. 51).

Tabela 4 – Características das principais ciclodextrinas utilizadas pela indústria farmacêutica e de cosméticos.

Tipo de CD	Solubilidade em água (g/L a 25°C)	PM (g/mol)	Metabolismo	DL₅₀ (g/Kg) (i.v.)
α-CD	14,5	972	Cólon	0,5-0,8
β-CD	1,85	1135	Cólon, cecum	1
γ-CD	23,2	1297	TGI superior	4
DM- β-CD	570	1331	Não metabolizada	1,5-2,5
HP-β-CD	>600	1396	Cólon	10

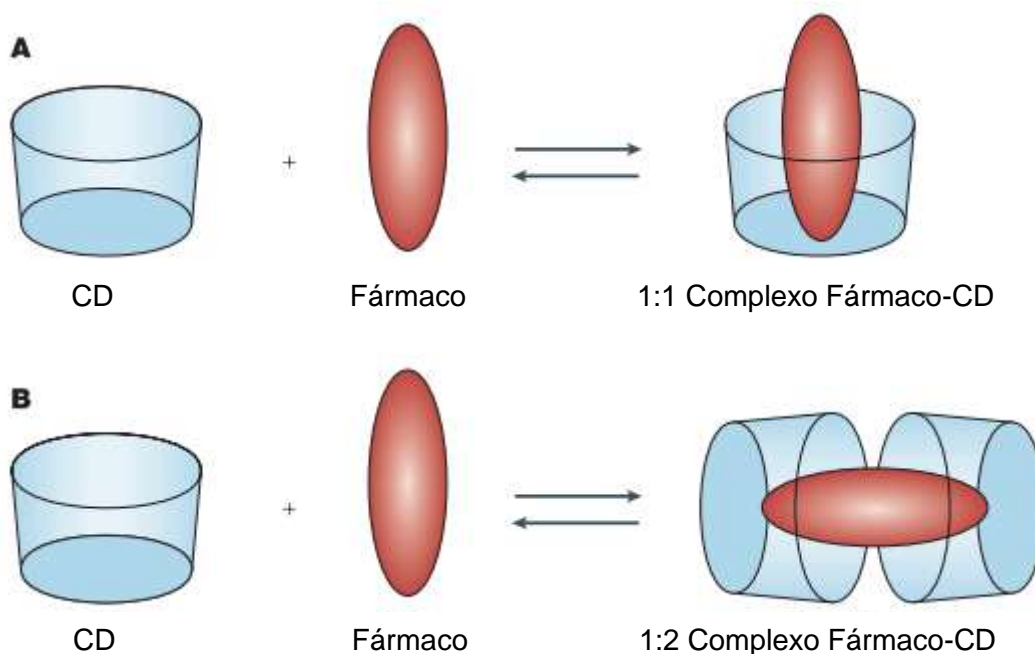
PM: Peso molecular. DL₅₀: Dose letal para 50% dos animais avaliados. Fonte: Adaptado de (SALTÃO; VEIGA, 2001; RAMA et al., 2005; BREWSTER; LOFTSSON, 2007; HARESH; AMIT, 2013).

As alterações nas moléculas de ciclodextrinas naturais dão-se, geralmente, em substituição aos grupos de OH primárias e/ou secundárias. Tais substituições são feitas pela adição de grupos funcionais, como metil (CH₃), hidroxipropil (CH₂CH(OH)CH₃), etil (C₂H₅) e acetil (-COCH₃), por exemplo. Tais modificações conferem maior solubilidade às ciclodextrinas sintéticas em detrimento das ciclodextrinas naturais, e menor toxicidade (VEIGA; PECORELLIC; RIBEIRO, 1996; CHALLA et al., 2005).

As principais características da molécula-hóspede que devem ser observadas na formação de complexos são a disposição geométrica e a polaridade da molécula de interesse, sendo favorecida a complexação de moléculas hidrofóbicas (LOFTSSON; BREWSTER, 2010).

Os métodos de co-solubilização e mistura física são os mais usados no preparo dos chamados complexos de inclusão, ou seja, da interação entre a molécula-hóspede e a molécula de CD, e são relativamente simples. De maneira geral, proporções molares determinadas são preparadas separadamente e em seguida misturadas para propiciar a formação do complexo. As estequiometrias mais comuns utilizadas para a obtenção dos complexos são a 1:1 e 1:2 (fármaco:ciclodextrina), como representado na figura 8 (DAVIS; BREWSTER, 2004) (p. 53).

Figura 8 – Modelo de formação de complexo entre ciclodextrinas e molécula hóspede.



Possibilidades mais comuns de formação de complexo entre uma substância (molécula hóspede) e os diferentes tipos de ciclodextrinas (molécula hospedeira). Neste esquema, em (A), evidencia-se a formação do complexo na proporção de uma molécula hóspede para uma molécula de ciclodextrina. Em (B), ilustração da formação com complexo na proporção de uma molécula hóspede para duas moléculas de ciclodextrina (Fonte: DAVIS; BREWSTER, 2004).

Atualmente, 35 formulações medicamentosas contendo diferentes tipos de ciclodextrinas foram aprovadas pela FDA e são comercializadas em todo o mundo, inclusive para melhorar as propriedades de fármacos anti-inflamatórios, como a dexametasona, piroxicam e diclofenaco de sódio, em formulações oral, oftálmica e tópica (LIMA et al., 2016). No Brasil, apesar de não haver legislação específica para fiscalizar produtos considerados nanotecnológicos, 16 medicamentos contendo formulações com nanomoléculas, já foram aprovados para comercialização, sendo duas destas formuladas com ciclodextrinas, para melhorar as propriedades de fármacos (Tabela 5, p. 53) (BATISTA; PEPE, 2014; COSTA et al., 2014).

Tabela 5 – Medicamentos nanotecnológicos comercializados no Brasil até 2014.

Medicamento	PA	Aplicação	Laboratório	Nanosistema
Ambisome [®]	Anfotericina B	Antifúngico	United Medical Ltda	Lipossoma
Caelyx [®]	Cloridrato de doxorubicina	Antineoplásico	Schering-plough	Lipossoma
Daunoxome [®]	Citrato de daunorrubicina	Antineoplásico	United Medical Ltda	Lipossoma
Doxil [®]	Cloridrato de doxorubicina	Antineoplásico	Ben Venue Laboratories	Lipossoma
Lupron depot [®]	Acetato de leuprolida	Antineoplásico	Abbott Laboratórios Brasil Ltda	Micropartícula de poli-ácido láctico
Neo decapeptyl [®]	Pamoato de triptorrelina	Antineoplásico	Aché Laboratórios Farmacêuticos	Micropartícula de poli-ácido láctico
Brexin [®]	Piroxicam	Anti-inflamatório	Laboratório Gross SA	β-CD
Maxsulid [®]	Nimesulida	Anti-inflamatório	Laboratório Americano de Farmacoterapia	β-CD
Amphocil [®]	Anfotericina B	Antifúngico	Zodiac	Disco lipídico SDS-AB
Albecet [®]	Anfotericina B	Antifúngico	Sigma Tau Pharmaceutical	Fita de lipídio DMPC-DMPG-AB
Rapamune [®]	Sirolimo	Imunossupressor	Wyeth	Nanocristais
Emend [®]	Aprepitant, MK869	Antiemético (associado a antineoplásicos)	Merck Sharp & Dohme	Nanocristais
TriCor [®]	Fenofibrato	Redutor do colesterol	Abbot Laboratories	Nanocristais
Megace ES [®]	Acetato de Megaestrol	Antineoplásico, Imunomodulador	Bristol-Myers Squibb Company	Nanocristais
Abraxane [®]	Paclitaxel	Antineoplásico	Celgene Europe Limited	Nanopartículas ligada a albumina
Elestrin [®]	Estradiol	Repositor hormonal (menopausa)	Meda Pharmaceutical Inc	Nanopartícula polimérica

PA: Princípio Ativo (Adaptado de BATISTA; PEPE, 2014; COSTA et al., 2014).

Assim, o uso de ciclodextrinas para melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade de substâncias com potencial terapêutico constitui-se em uma importante ferramenta a ser utilizada e explorada pela comunidade científica (PINHO et al., 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

No presente estudo, buscou-se investigar o efeito da friedelina livre e complexada sobre a resposta inflamatória em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito anti-inflamatório da friedelina sobre a resposta inflamatória aguda, verificando seu efeito sobre a formação de edema, migração de células e produção de citocinas.
2. Avaliar o efeito da friedelina sobre a adesão e a migração de neutrófilos.
3. Preparar, caracterizar e avaliar o efeito anti-inflamatório do complexo de inclusão friedelina/ciclodextrina (FD:HP- β -CD).
4. Avaliar o efeito da friedelina livre e em complexo com ciclodextrina (FD:HP- β -CD) sobre no modelo de asma experimental em camundongos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes e soluções

Friedelina, PBS (Tampão Fosfato Salina), meios de cultivo celular (RPMI-1640 e DMEM Advanced), Percoll, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), LPS (Lipopolissacarídeo, *E. coli* I0127:B8), carragenina, hidroxipropil-beta-cyclodextrina (HP- β -CD), fMLP (formil-metionil-leucil-fenilalanina), ovalbumina, dexametasona, histamina, serotonina, PGE₂, Triton X-100 foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, MO, USA). Diclorometano, corante Giemsa e Panótico rápido foram adquiridos da Vetec, enquanto o corante Diff-Quick foi adquirido da Baxter Traveno Laboratories, Canadá. O soro fetal bovino (SBF) e gentamicina foram adquiridos da Gibco (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A sílica (0,035-0,079 mm de diâmetro) com poro de 6 nm para fracionamento químico foi adquirido da Acrós Organic. Os kits para quantificação de IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, eotaxina e TARC foram adquiridos da eBioscience. Os kits para quantificação de KC, MIP-1 α , MIP-2 e IL-6 foram adquiridos da Merck-Millipore.

4.2 Friedelina

A friedelina (PubChem CID: 91472) foi adquirida comercialmente da Sigma-Aldrich. Como amostra padrão, foi utilizada friedelina isolada do extrato hexânico obtido da casca do caule da espécie *Clusia nemorosa* Mey, fornecida pelo Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, devidamente identificada e caracterizada por Andrade e colaboradores (1998).

Neste estudo foram utilizados diferentes ensaios *in vivo* e *in vitro* para investigar o efeito farmacológico da friedelina, bem como para caracterizar o complexo formado entre friedelina e hidroxipropil- β -cyclodextrina através de métodos físico-químicos. Para uma visão geral deste trabalho, o organograma experimental do estudo pode ser observado no ANEXO A – Organograma experimental do estudo (página 143).

4.3 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* (♂ e ♀, 20-25 gramas) provenientes do Biotério Central da Ufal, submetidos ao protocolo de inflamação deflagrado por LPS aprovado pelo CEUA-Ufal sob protocolo número 044/2013. Para o ensaio de microscopia intravital realizado no Laboratório de Reatividade Cardiovascular (IOC-Fiocruz), foram utilizados ratos (♂, 300-350 g) provenientes do Biotério da Fiocruz/RJ (CEUA nº 31/10-3 LW-21). Em outro conjunto de experimentos envolvendo o modelo experimental de asma foram utilizados camundongos A/J fornecidos pelo Biotério da Fiocruz/RJ (CEUA nº LW-23/10). Os animais foram mantidos respeitando o ciclo claro-escuro de 12h a temperatura de 22 ± 2 °C, com livre acesso a ração e água.

4.3.1 Avaliação da formação de edema

Para verificar o efeito da friedelina sobre a formação de edema foi utilizado o modelo de edema de pata em camundongos de acordo com a metodologia realizada por Barros e colaboradores (2011). Para análise da formação do edema na pata foi utilizado o equipamento pletismômetro (Panlab, Itália). O equipamento possui duas cubetas de acrílico ligadas através de sistema de vasos comunicantes preenchidas com uma solução contendo salina (0,1%) e triton X (1%). Para verificar o edema formado, a pata do camundongo foi imersa até a junção tíbio-tárcica em uma das cubetas e o volume deslocado para a segunda cubeta (proporcional ao volume da pata imersa) foi medido com auxílio de um sensor eletrônico de volume e registrado (Figura 9, p. 58).

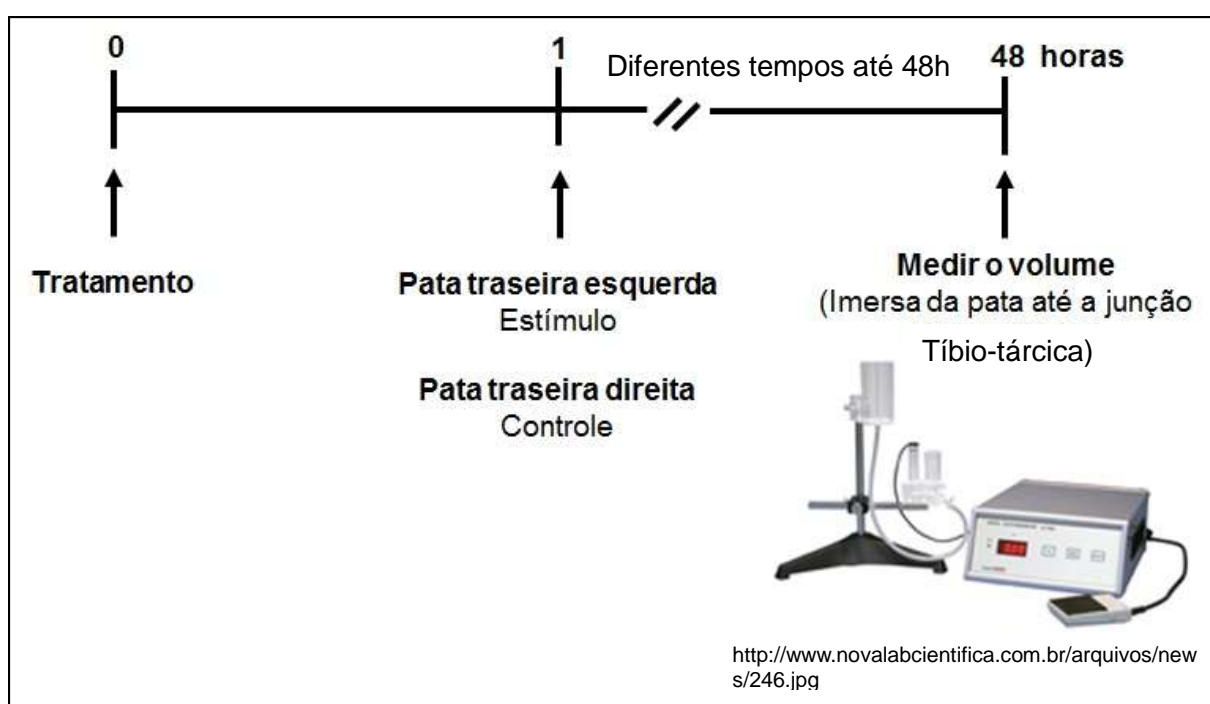
Para verificar o efeito da friedelina sobre a geração de edema induzido por carragenina (300 µg/pata esquerda), PGE₂ (100 ng/pata esquerda), serotonina (100 µg/pata esquerda) ou histamina (100 ng/pata esquerda), os animais (n=7) receberam 1h antes do estímulo por via intraperitoneal friedelina (0,1; 1 ou 10 mg/Kg) ou salina (0,9%). O volume de cada pata foi avaliado por até 48 h após o estímulo. A pata traseira direita recebeu o mesmo volume de solução salina (0,9%) como controle.

Em um segundo conjunto de experimentos foi avaliado o efeito da friedelina livre (FD) ou em complexo com hidroxipropil-β-ciclodextrina (FD:HP-β-CD). Para tal, os animais foram tratados por via intraperitoneal com FD (0,1; 1 ou 10 mg/Kg),

FD:HP- β -CD (0,1; 1 ou 10 mg/Kg) ou HP- β -CD (10 mg/Kg) 1h antes da administração de carragenina (300 μ g/pata; 0,05 mL na pata traseira esquerda) e avaliado no tempo de 2h após o estímulo. Nos dois grupos de experimentos, os valores foram expressos em microlitros (μ L), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\Delta \text{Volume } (\mu\text{L}) = (\text{volume da pata esquerda}) - (\text{volume da pata direita})$$

Figura 9 – Esquema do protocolo utilizado no modelo experimental de edema de pata.



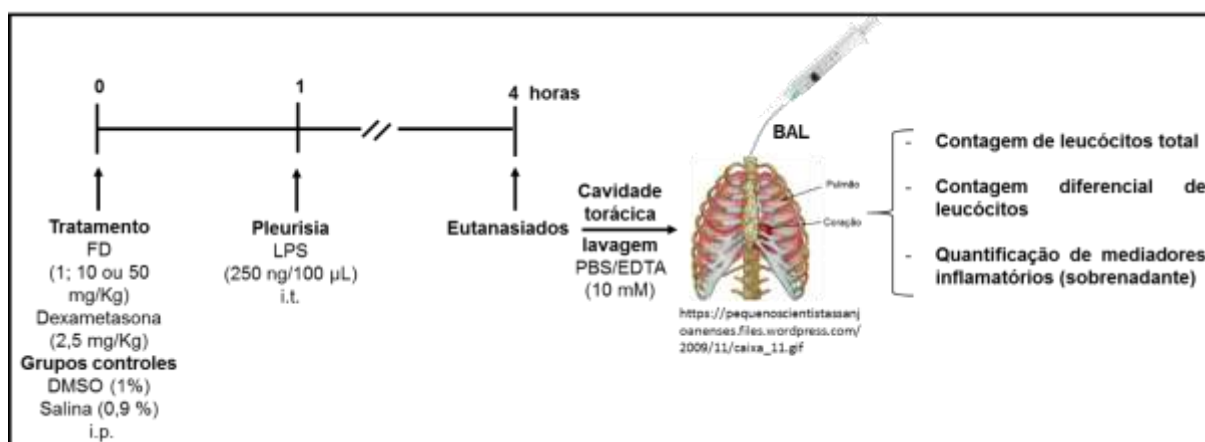
Esquema do protocolo experimental utilizado no modelo de edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos em camundongos. Os animais foram tratados com FD (0,1, 1 ou 10 mg/Kg, i.p.) ou salina (NaCl 0,9%, i.p.) ou indometacina (10 mg/Kg, i.p.) 1h antes do desafio com carragenina (300 μ g/pata traseira esquerda, 50 μ L) ou PGE2 (100 ng/pata traseira esquerda, 50 μ L) ou histamina (100 ng/pata traseira esquerda, 50 μ L) ou serotonina (100 μ g/pata traseira esquerda, 50 μ L) e o volume do edema formado foi mensurado em diferentes tempos. Em outro grupo experimental, os animais foram pré-tratados com FD (0,1, 1 ou 10 mg/Kg, i.p.) ou HP- β -CD (10 mg/Kg, i.p.) ou FD:HP- β -CD (0,1, 1 ou 10 mg/Kg, i.p.) 1h antes do desafio com carragenina. FD= friedelina, HP- β -CD= hidroxipropil-beta-ciclodextrina, FD:HP- β -CD= friedelina complexada.

4.3.2 Pleurisia induzida por lipopolissacarídeo (LPS)

A inflamação no espaço pleural, pleurisia, foi induzida pela injeção intratorácica (i.t.) de 100 μ L de solução de LPS (250 ng/cavidade) com uma agulha (13 x 5 mm) adaptada com um redutor de tamanho para ser introduzida na cavidade torácica, com propósito de atingir o espaço pleural do animal (AMENDOEIRA et al.,

2005). Camundongos Swiss (n=7) foram tratados por via intraperitoneal com FD (1; 10 ou 50 mg/Kg) ou dexametasona (2,5 mg/Kg) 1h antes da indução da inflamação. Animais injetados com 100 µL de DMSO (1%, veículo) ou solução salina (0,9%, NaCl) foram usados como grupo controle. Após 4 horas do estímulo com LPS, os animais foram mortos através de aprofundamento da anestesia com injeção intraperitoneal de tiopental (200 mg/Kg) (Thiopentax, Cristália) e tiveram a cavidade torácica exposta para lavagem com solução de PBS/EDTA (10 mM), procedimento realizado por 5 vezes. Uma alíquota do lavado pleural foi diluída em solução de Turk (2% de ácido acético e Azul de Metileno) para contagem do número total de leucócitos em câmara de Neubauer. Em seguida, outra alíquota deste lavado foi utilizada para confecção de citocentrifugados que posteriormente foram corados com May-Grunwald-Giemsa para identificação e contagem dos diferentes tipos de leucócitos utilizando microscópio óptico (Nikon, aumento de 100x). Ao final, o sobrenadante restante do lavado pleural foi armazenado a -80 °C, para posterior quantificação de mediadores inflamatórios (Figura 10, p. 59). Neste mesmo grupo de animais foi realizada a coleta de sangue periférico através da punção realizada na cauda, retirada uma alíquota de sangue para contagem de leucócitos totais e esfregaço para contagem de leucócitos diferenciais. Em seguida, foi realizada a retirada do fêmur da pata traseira esquerda para posterior lavagem e obtenção do lavado de medula óssea. Deste lavado, foi realizada a contagem de leucócitos totais e o citocentrifugado para contagem de leucócitos diferenciais.

Figura 10 – Esquema do protocolo utilizado no modelo experimental de pleurisia induzida por LPS em camundongos.



Esquema do protocolo experimental utilizado no modelo de pleurisia induzida por LPS em camundongos. Os animais (n=7) foram tratados com FD (1, 10 ou 50 mg/Kg, i.p.) ou salina (NaCl 0,9%, i.p.) ou veículo (DMSO 1%) ou dexametasona (2,5 mg/Kg, i.p.) 1h antes do desafio com LPS (250 ng/cavidade, 100 µL, i.t.). LPS= lipopolissacarídeo, FD= friedelina. NaCl= salina.

4.3.3 Quantificação de citocinas do lavado pleural

Os níveis de citocinas e quimiocina, IL-6, IL-1 β , MIP-2 e KC, presentes no lavado pleural dos camundongos foram quantificados utilizando o kit comercial de citocinas MagPlex (Luminex: Magpix[®], Millipore[™]), seguindo as instruções do fabricante.

4.3.4 Microscopia intravital para avaliar microcirculação

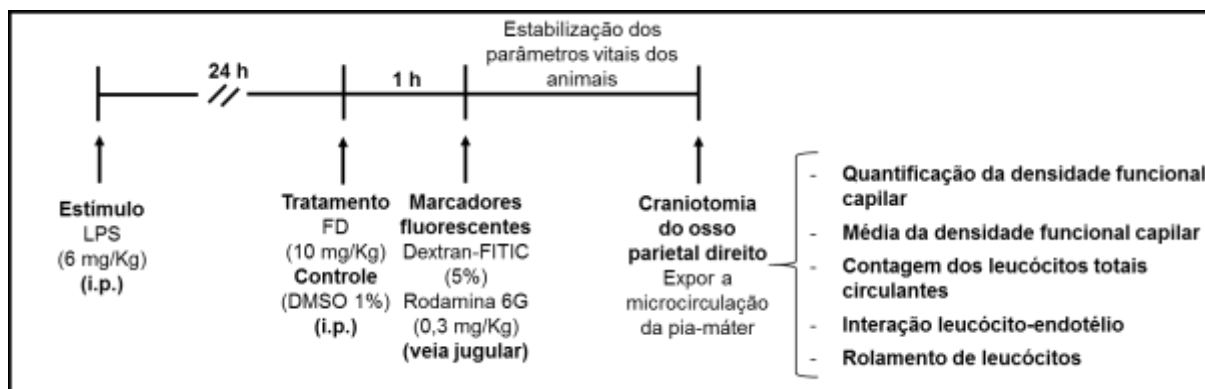
O efeito da friedelina sobre parâmetros de mobilidade leucocitária, rolamento e adesão de células no leito vascular *in vivo* foi realizado observando vasos da microcirculação cerebral de ratos Wistar submetidos ao estímulo com LPS (6 mg/Kg; i.p.) (RAMIREZ et al., 2012). Após 24 horas, os animais foram tratados com FD (10 mg/Kg, i.p.; n=8) ou veículo (DMSO 1%, i.p., n=8), e após 1h o leito vascular cerebral foi avaliado. Este procedimento foi realizado no Laboratório de Reatividade Cardiovascular do Instituto Oswaldo Cruz (IOC-Fiocruz, RJ), sob a supervisão do Dr. Marcos Adriano Lessa.

Para acesso ao leito vascular, os animais foram anestesiados com quetamina (75 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg, i.p.), traqueostomizados e ventilados artificialmente com ar ambiente. A veia jugular foi canulada e injetado marcador fluorescente

(Dextran-FITIC 5% e 0,3 mg/Kg de rodamina 6G). A temperatura dos animais foi monitorada com uma sonda retal e mantida a 37 °C com um cobertor homeotérmico (Harvard Apparatus, Boston, MA, EUA). Após garantida a estabilidade dos parâmetros vitais dos animais, foi realizada uma craniotomia do osso parietal direito para expor a microcirculação da pia-máter (vênulas com diâmetro que variam de 50 a 100 μm) (ARAÚJO et al., 2012). O campo exposto foi avaliado continuamente com fluido cérebro-espinhal artificial (NaCl 132 mM, KCl 2,95 mM, CaCl_2 1,71 mM, MgCl_2 0,64 mM, NaHCO_3 24,6 mM, dextrose 3,71 mM e ureia 6,7 mM) a 37 °C e pH 7,35. A superfície exposta foi mantida continuamente com 10% O_2 , 6% CO_2 e 84% N_2 , com o propósito de manter a tensão superficial e níveis de gases comparáveis ao pH fisiológico, evitando assim o estabelecimento de inflamação local durante a análise.

As imagens da microcirculação foram adquiridas usando o software Archimed 3.7.0 (Microvision, Evry, France) para quantificação da densidade funcional capilar, considerada como o número total de capilares perfundidos espontaneamente (vasos com diâmetro menor que 10 μm) por mm^2 de superfície (1 mm^2). Este parâmetro foi obtido após contagem de cada capilar por 4 minutos (SABINO et al., 2008). Para determinar a média da densidade funcional capilar, apenas os vasos continuamente perfundidos foram avaliados. Para a contagem dos leucócitos totais circulantes, leucócitos fluorescentes (marcados com rodamina 3G) foram visualizados por epi-iluminação (510-560 nm de excitação e filtro de emissão a 590 nm). A interação leucócito-endotélio foi avaliada pela contagem do número de leucócitos aderentes à parede vascular (100 μm de comprimento), durante 30 segundos, e expressa como número de células/min/100 μm . O rolamento de leucócitos foi definido como o movimento de leucócitos do sangue dentro do vaso a uma velocidade mais baixa do que os glóbulos vermelhos em circulação sendo expressa como o número de células/min (NASCIMENTO et al., 2010) (Figura 11, p. 61).

Figura 11 – Esquema do protocolo utilizado no modelo experimental de sepse induzida por LPS em ratos.



Esquema do protocolo experimental utilizado no modelo de sepse induzida por LPS em ratos. Os animais (n=8) foram tratados com FD (10 mg/Kg, i.p.) ou veículo (DMSO 1%, i.p.) 24h após o estímulo com LPS (6 mg/Kg, i.p.). 1h após o tratamento, os animais foram anestesiados, monitorados e canulados para administração de Dextran-FITIC-Rodamina 6G para visualização dos leucócitos na microcirculação da pia-máter. LPS= lipopolissacarídeo, FD= friedelina

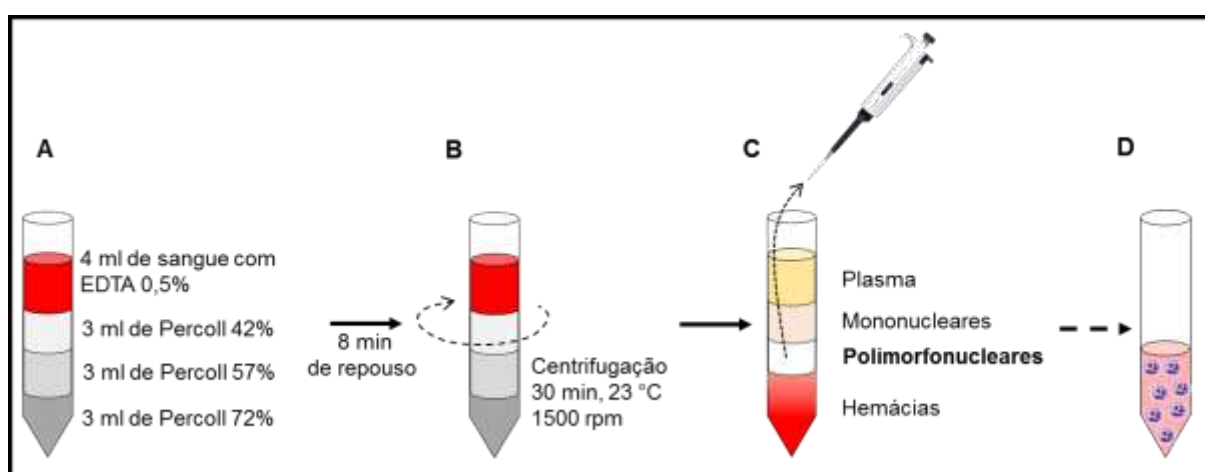
4.4 Efeito da friedelina sobre neutrófilos humanos

4.4.1 Isolamento de neutrófilos

O sangue periférico de doadores saudáveis foi coletado no Laboratório de Biologia Celular, respeitando os princípios éticos, práticos e de biossegurança estipulados pelo Ministério da Saúde e condizentes com as Comissões de Ética em Pesquisa com Seres Humanos. As considerações éticas levaram em consideração o uso do material para fins científicos e sem constrangimento da instituição e pessoal envolvidas. As coletas foram realizadas no início da manhã em indivíduos alimentados, sendo os doadores previamente informados sobre a data e condições da coleta. O sangue periférico foi coletado por punção venosa em tubo usando EDTA (0,5%) como anticoagulante, e imediatamente utilizado para isolamento de neutrófilos usando gradiente descontínuo de percoll. A preparação do gradiente de Percoll em um tubo Falcon de 15 mL foi iniciada pela adição sequencial de 3 mL de cada solução de percoll em concentração distinta, de 72%, 57% e 42%. Em seguida, 4 mL de sangue obtido por punção venosa foram gentilmente adicionados na parte superior dos gradientes. Após 8 min de repouso, o gradiente foi centrifugado por 30 minutos, a 23 °C (1500 rpm, aceleração e desaceleração 6). Ao final da centrifugação, o halo contendo células que foi formado entre os gradientes de 72% e 57% foi cuidadosamente retirado e transferido para outro tubo Falcon de 15 mL,

onde foram adicionados 12 mL de solução de lise (NH_4Cl , 8,56 mg/mL), homogenizados e mantidos em repouso por 2 minutos. Após este tempo, o material foi submetido à centrifugação por 8 minutos a 12 °C (1300 rpm, aceleração e desaceleração 6). Ao final, o pellet resultante foi ressuscitado em 1 mL de DMEM suplementado (contendo 100 mM L-glutamina e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina), e o pellet resultante foi ressuscitado e novamente centrifugado em 1 mL de DMEM suplementado, de onde foram obtidas alíquotas para avaliar o rendimento e a pureza do isolamento. Todos os experimentos foram realizados com pureza superior a 95% de neutrófilos (Figura 12). A análise de pureza foi realizada através de citocentrifugado e contagem de células em microscópio óptico (adaptado de DOOLEY; SIMPSON; MERYMAN, 1982; FARIAS et al., 2012).

Figura 12 – Esquema do protocolo utilizado para isolamento de neutrófilos humanos obtidos do sangue periférico.



Em (A), sequência do gradiente montado. Em (B), gradiente antes da centrifugação. Em (C), gradiente após a centrifugação, indicando o local de obtenção dos PMN. Em (D), PMN purificados para serem usados nos ensaios. PMN= polimorfonuclear (AUTOR, 2016).

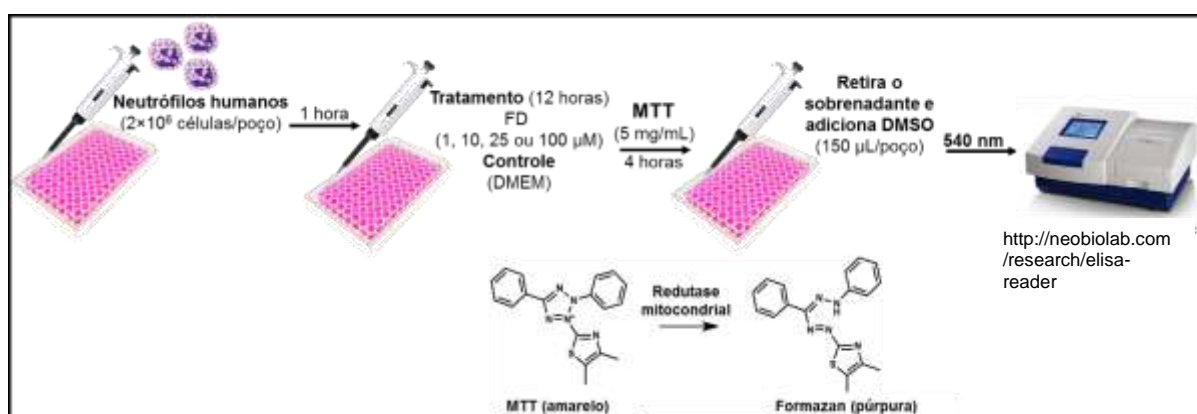
4.4.2 Avaliação na viabilidade celular de neutrófilos

A análise da viabilidade de neutrófilos humanos após exposição à friedelina foi realizada pelo método do brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) descrito por Mosman (1983). Neutrófilos humanos (2×10^6 células/poço) foram semeados em placa de 96 poços com meio de cultura DMEM Advanced (SBF 10%, L-glutamina 100 mM e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina) e mantidos em estufa de CO_2 (37 °C) por 1h. Em seguida, as células foram tratadas com FD (1, 10, 25 ou 100 μM) por

12 horas. Células mantidas em meio DMEM Advanced (SBF 10%, L-glutamina 100 mM e 40 µg/mL de gentamicina) foram utilizadas como controle. Após o tempo de exposição à friedelina, o sobrenadante da cultura foi removido por centrifugação e um novo meio de cultivo contendo MTT (5 mg/mL) foi adicionado para a manutenção das células por um período de 4 horas. Após este tempo, o sobrenadante foi descartado e adicionada solução de DMSO (150 µL/poço) para leitura em espectrofotômetro (540 nm) (Figura 13). A atividade de redução do MTT foi expressa como a porcentagem de células viáveis em relação ao controle:

$$\text{Células viáveis (\%)} = \left(x \frac{\text{Absorbância das células tratadas}}{\text{Absorbância das células não tratadas}} \right) \times 100$$

Figura 13 – Esquema do protocolo utilizado no ensaio de viabilidade celular por MTT.



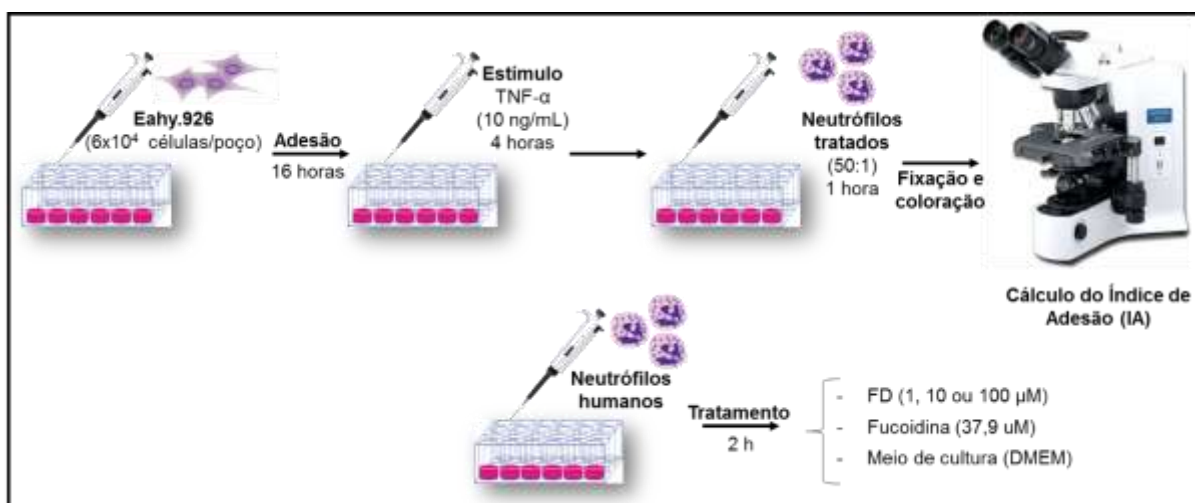
4.4.3 Adesão de neutrófilos ao endotélio

Para avaliar o efeito da friedelina sobre a capacidade adesiva de neutrófilos ao endotélio, neutrófilos humanos obtidos por punção venosa foram tratados com FD (1, 10 ou 100 µM), fucoidina (37,9 µM) ou meio de cultura por 2h. Em paralelo, a linhagem de células endoteliais humanas EAhy.926 foram semeadas em placas de 24 poços (6×10⁴ célula/poço) em meio de cultura DMEM Advanced (suplementado com 10% SBF, 100 mM L-glutamina e 40 µg/mL de gentamicina) e foram mantidas em cultivo para adesão por 16 horas em estufa de CO₂ (37 °C). Após esse tempo, as células endoteliais foram mantidas sob estímulo com TNF-α (10 ng/mL) por mais 4h. Em seguida, neutrófilos humanos tratados com friedelina, na proporção de 50

neutrófilos/célula endotelial, foram adicionados às células endoteliais por 1h. Após este tempo, a cultura foi gentilmente lavada com PBS para a retirada das células não aderidas. Em seguida, as células foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa (1:5) para posterior contagem em microscópio invertido (Olympus: IX70 aumento de 40 x) (LANNES-VIEIRA et al., 1993) (Figura 14, p. 63). O resultado foi expresso como índice de adesão de neutrófilos, calculado através da seguinte fórmula:

$$IA = \left(\frac{n^{\circ} \text{ de célula endotelial com neutrófilos}}{n^{\circ} \text{ total de célula endotelial}} \times \frac{n^{\circ} \text{ de neutrófilo por célula endotelial}}{n^{\circ} \text{ total de célula endotelial}} \right) \times 100$$

Figura 14 – Esquema do protocolo utilizado no ensaio de adesão de neutrófilos a células endoteliais.

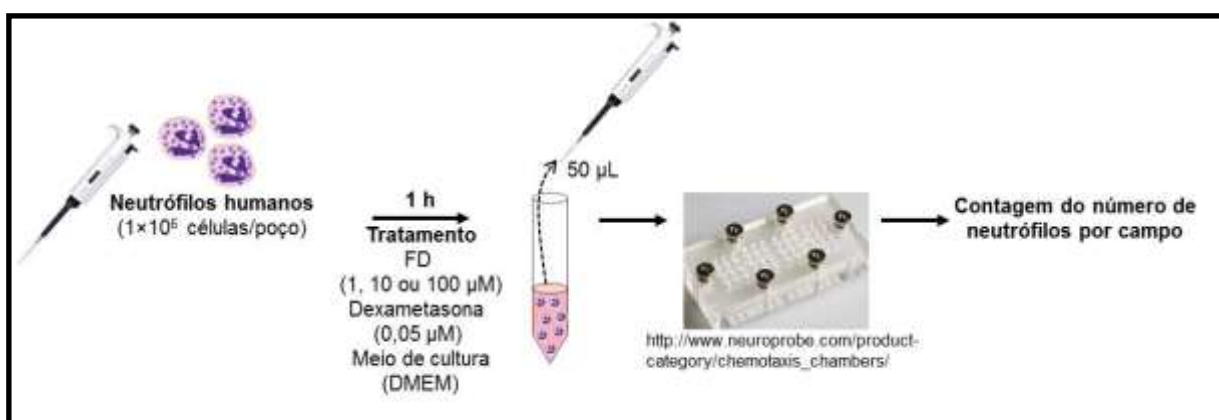


4.4.4 Quimiotaxia de neutrófilos

Neutrófilos humanos obtidos por punção venosa na densidade de 1×10⁶ célula/poço foram submetidos ao tratamento com FD (1, 10 ou 100 μM), dexametasona (0,05 μM) ou meio de cultura (DMEM Advanced) por 2h em estufa de CO₂ a 37 °C. Em seguida, 50 μL da suspensão de células foram adicionados na parte superior da câmara de Boyden contendo filtro de policarbonato de 5 μm. Na parte inferior da câmara, foi adicionada um solução de N-formilmetionina-leucil-fenilalanina (fMLP; 250 ng/mL) como agente quimioatraente. O sistema de cultivo foi mantido em estufa de CO₂ a 37 °C por 1h para permitir a migração de neutrófilos.

Como grupo controle indicando a migração basal, foram utilizadas células expostas apenas a meio de cultura. Após o período de migração, a membrana foi removida, fixada e corada com meio Diff-Quick. Os neutrófilos que migraram foram contados em microscópio óptico (100x) em 5 campos aleatórios. Os resultados foram expressos como o número de neutrófilos por campo (COELHO et al., 2001) (Figura 15).

Figura 15 – Esquema do protocolo utilizado no ensaio de quimiotaxia de neutrófilos induzida por fMLP.

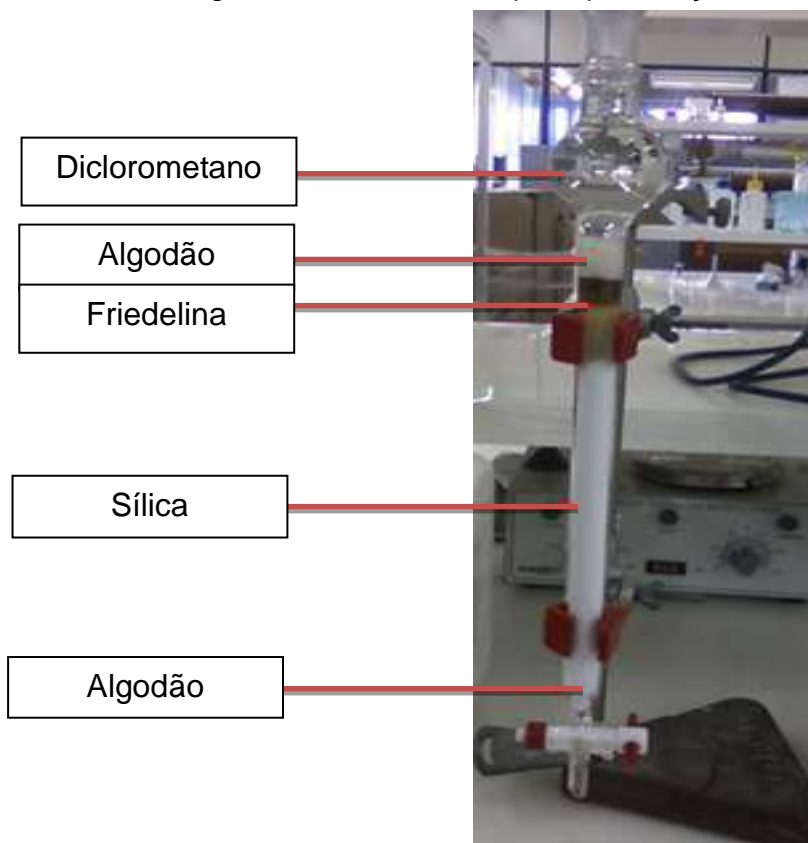


4.5 Formação de complexo entre friedelina e hirdoxipropil-β-ciclodextrina

4.5.1 Purificação da friedelina

A friedelina, adquirida comercialmente da Sigma-Aldrich[®], foi purificada por cromatografia em coluna com gel de sílica. Para isso, na parte inferior do funil de separação foi adicionada uma camada de algodão, seguida de uma camada de sílica (0,035-0,079 mm de diâmetro e poro de 6 nm, Acrós Organic). Confeccionado o funil de separação, 200 mg de friedelina previamente impregnada e macerada com sílica foi adicionada na parte superior do funil de separação. Como eluente, utilizou-se o diclometano que foi recuperado na parte inferior do funil após gotejamento em pequenos frascos de vidros previamente identificados (Figura 16). Para confirmação da purificação, foi realizada a comparação do tempo de retenção da friedelina em Cromatografia em Camada Delgada (CCD), comparada com a friedelina isolada da espécie *Clusia nemorosa* Mey (ANDRADE et al., 1998).

Figura 16 – Coluna com gel de sílica utilizada para purificação da friedelina.

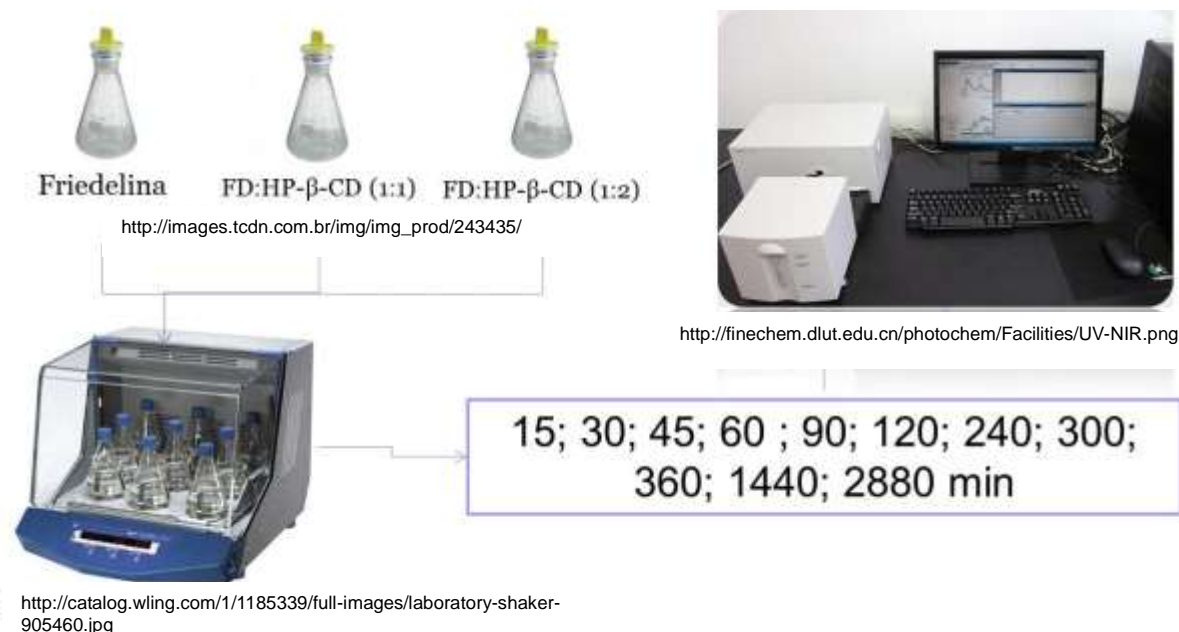


Coluna de separação usada para purificação de friedelina adquirida comercialmente da Sigma-Aldrich (Fonte: AUTOR, 2016).

4.5.2 Determinação da cinética de formação do complexo entre friedelina e hidroxipropil- β -ciclodextrina

Para verificar qual a melhor proporção de friedelina e hidroxipropil- β -ciclodextrina, bem como o melhor tempo de agitação da solução para formação do complexo, foi utilizado o método de co-solubilização (FERREIRA et al., 2013). Para avaliar a formação do complexo entre FD:HP- β -CD, foram preparadas soluções contendo friedelina dissolvida em 5% de etanol (117,1 μ M) e HP- β -CD dissolvida em água deionizada (na proporção molar de 1:1 ou 1:2 em relação à FD) e mantidas sob agitação por até 48h a 25 °C e 170 rpm (Figura 17). O acompanhamento por espectrofotometria (UV-Vis espectrofotômetro, Shimadzu) nos comprimentos de onda de 228 e 278 nm ocorreu em intervalos de 15 minutos durante a primeira hora e nos tempos de 2, 3, 4, 5, 6, 24 e 48h após o início da agitação. Alíquotas foram retiradas, filtradas em filtro de 0,22 μ m (membrana de acetato de celulose) e analisadas no UV-Vis (FERREIRA et al., 2010).

Figura 17 - Método utilizado na formação do complexo por co-solubilização.



4.5.3 Preparo do complexo de inclusão entre friedelina e hidroxipropil-β-ciclodextrina

O complexo entre friedelina e hidroxipropil-β-ciclodextrina foi preparado seguindo o protocolo descrito por Ferreira e colaboradores (2013). Para tal, uma solução contendo friedelina dissolvida em 5% de etanol (117,1 μM) e HP-β-CD dissolvida em água deionizada (na proporção molar de 1:2 em relação à FD) foi mantida sob agitação por 48h a 25 °C e 170 rpm. Em seguida, a solução foi filtrada (filtro de membrana de acetato de celulose 0,22 μm) e o pó obtido após secagem em rotaevaporador rotativo (Brucker) a temperatura de 40 °C.

4.5.4 Caracterização físico-química da formação do complexo

4.5.4.1 Determinação da constante de formação do complexo através da equação de Benesi-Hildebrand

Para determinar a constante de formação e dissociação do complexo formado entre FD e HP-β-CD, foi utilizada a equação proposta por Benesi-Hildebrand (FERREIRA et al., 2010) (Equação 1).

$$\frac{[C][S]_0}{\Delta A} = \frac{K_D}{\Delta \varepsilon} + \frac{[C]}{\Delta \varepsilon} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde [C] e [S]₀ são as concentrações de HP-β-CD e FD, respectivamente; K_D é a constante de dissociação, K_D=1/K_F refere-se à alteração da absorvância, Δ é alteração do coeficiente de absorção molar. O cálculo da constante de formação do complexo foi feito através da equação de Benesi-Hildebrand e realizado com auxílio do software OriginLab Origin 8.0.

4.5.4.2 Análise do complexo por espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros de infravermelho de cada amostra FD, HP-β-CD e FD:HP-β-CD foram obtidos individualmente utilizando o equipamento IRPrestige-21 (Shimadzu, Kyoto, Japan). Para isso, 3 mg de cada amostra foi triturada e prensada individualmente com brometo de potássio (KBr) na proporção de 1:100 para confecção de uma pastilha. A pastilha de KBr sem amostra foi utilizada como branco (controle). As análises foram realizadas a temperatura ambiente no intervalo de 4000 cm⁻¹ a 500 cm⁻¹ em espectrofotômetro de infravermelho (FERREIRA et al., 2013).

4.6 Modelo experimental de asma alérgica

4.6.1 Delineamento experimental

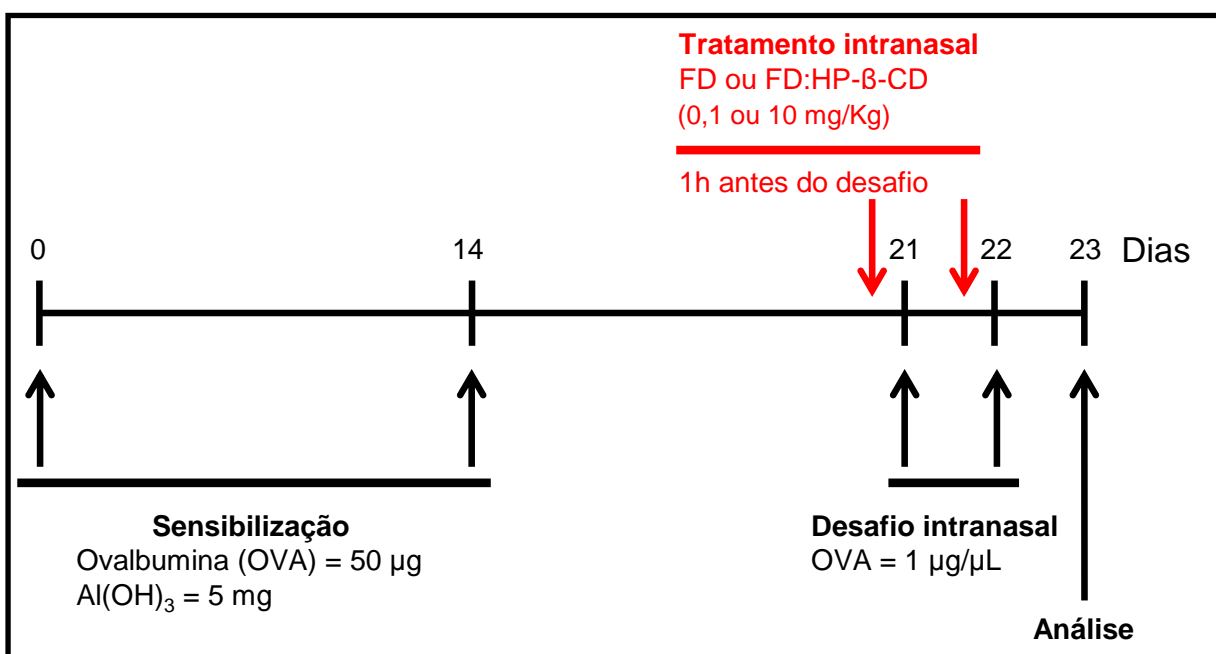
Para este conjunto de experimentos, foram utilizados camundongos A/J (18-25 g; n=10) sensibilizados nos dias 1 e 14 com uma injeção subcutânea de uma solução de 200 μL de ovalbumina (OVA, 50 μg) e 5 mg de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃). Nos dias 21 e 22, os animais foram anestesiados com isoflurano inalatório e submetidos aos tratamentos 1h antes do desafio com 25 μL de ovalbumina (1 μg/μL) ou salina por via intranasal, sendo distribuídos em 8 diferentes grupos experimentais (n=10), conforme a Tabela 6 (p. 70). Após 24 horas do último desafio, os animais foram eutanasiados para obtenção do material e realização das análises subsequentes (Figura 18, p. 69) (BARRETO et al., 2015).

Tabela 6 - Grupos experimentais utilizados no modelo experimental de asma alérgica.

Grupo	Desafio intranasal com OVA (1 µg/µL)	Tratamento intranasal
Sal	-	Salina
OVA	+	Salina
HP-β-CD	+	HP-β-CD
Bud	+	Budesonida (7,5 mg/Kg)
FD 0,1	+	FD (0,1 mg/Kg)
FD 10	+	FD (10 mg/Kg)
FD:HP-β-CD 0,1	+	FD:HP-β-CD (0,1 mg/Kg)
FD:HP-β-CD 10	+	FD:HP-β-CD (10 mg/Kg)

Os grupos experimentais foram compostos de camundongos A/J fêmeas (n=10, 18-25 g, 4 semanas). Sal, solução salina. OVA, solução de ovalbumina. Bud, solução de budesonida. FD, friedelina livre. FD:HP-β-CD, complexo friedelina:ciclodextrina.

Figura 18 – Esquema do protocolo utilizado no modelo experimental de asma alérgica induzida por ovalbumina.



Protocolo experimental utilizado no modelo de inflamação pulmonar alérgica induzido por ovalbumina em camundongos.

4.6.2 Avaliação da hiperreatividade das vias aéreas

O efeito da friedelina livre e do seu complexo em ciclodextrina sobre a reatividade das vias aéreas de animais asmáticos foi realizado conforme o delineamento experimental descrito por Serra e colaboradores (2012) utilizando a pletismografia barométrica invasiva de corpo inteiro (Buxsco Eletronics, Sharon, CT). Após 24h do último desafio, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódio (60 mg/kg, i.p.) e a traqueia exposta para introdução de uma cânula conectada ao respirador artificial para manter os parâmetros de fluxo e volumes constantes. Os parâmetros pulmonares de resistência (cm.H₂O/mL/s) e elastância (cm.H₂O/mL) foram registrados em intervalos de 5 min após a aerossolização de concentrações crescentes (3, 9 e 27 mg/mL) de metacolina. Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Inflamação do Instituto Oswaldo Cruz (IOC-Fiocruz, RJ), sob a supervisão do Dr. Marcos Aurélio Martins.

4.6.3 Obtenção do lavado broncoalveolar (LBA)

Após a análise da função pulmonar, os camundongos foram eutanasiados através de aprofundamento da anestesia com injeção intraperitoneal de tiopental (200 mg/Kg) (Thiopentax, Cristália) e tiveram a traqueia dissecada e canulada para obtenção do lavado broncoalveolar (LBA). O LBA foi obtido por três lavagens consecutivas com 0,75 mL de PBS com EDTA (10 mM). Em seguida, o lavado obtido foi centrifugado a 1500 rpm, 4 °C por 10 minutos para recolher e estocar o sobrenadante, enquanto no pellet foi adicionado 1 mL de PBS contendo EDTA (10 mM) para contagem de células. A contagem de leucócitos totais foi realizada em câmara de Neubauer sob microscopia de luz, utilizando uma alíquota de células diluída em solução de Turk (1:10). A contagem diferencial foi realizada em citoesfregaços corados com May-Grunwald-Giemsa e avaliados por microscopia de luz na objetiva de 100X (BARRETO et al., 2015).

4.6.4 Quantificação de citocinas e quimiocinas no homogenato de pulmão

Os níveis de citocinas e quimiocinas IL-4, IL-13, IL-10, IL-17, KC, MIP-1 α , eotaxina e TARC presentes no pulmão direito dos camundongos asmáticos tratados com friedelina ou com o complexo friedelina:ciclodextrina. Primeiro, os tecidos removidos foram homogeneizados em solução de PBS-Triton X-100 0,05% e coquetel inibidor de protease (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) e então quantificados utilizando o ensaio imunoenzimático ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) com o kit comercializado pela empresa eBioscience (Ready-Ste-Go[®], ELISA, eBioscience), seguindo as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos como pg de citocinas/pulmão.

4.6.5 Análise histológica do pulmão

As análises histológicas foram realizadas em animais que seguiram o protocolo experimental, mas que não foram submetidos ao LBA, com propósito de preservar a integridade estrutural do pulmão. Sendo assim, após 24h do último desafio, os camundongos foram eutanasiados e o pulmão esquerdo foi retirado e fixado em solução de paraformaldeído (10%) por 12h. Em seguida, o pulmão foi submetido ao processamento histológico, incluindo etapas de desidratação em gradientes crescentes de etanol, clarificação em xilol, para posterior embocamento em parafina. Os cortes foram realizados em micrótomo com espessura de 5 μ m e corados com ácido periódico reativo de Schiff (PAS) para avaliar a deposição de muco no epitélio respiratório. Para as análises, foram fotografados seis brônquios por lâmina, sendo as imagens (aumento 400 X) digitalizadas e processadas no software Image J (1.50i). Os dados foram representados como média \pm E.P.M. dos pixels das áreas com a presença de muco.

A quantificação de deposição de colágeno no pulmão foi realizada utilizando a coloração com tricrômico de Gomori, que permite identificar a deposição de fibras de colágeno entre o septo alveolar e o epitélio das vias aéreas. Após aquisição das imagens em microscópio óptico (aumento 400X) realizaram-se as análises com o software Image J, sendo os dados representados como área de deposição de matriz extracelular (μ m²). Para tal, 10 campos aleatórios representativos de cada lâmina foram fotografadas e tiveram sua área de análise mensurada.

Para quantificação das imagens, foram fotografados dez campos aleatórios e representativos em três cortes de cada animal por coloração, totalizando 27 cortes por grupos, e quantificado a área de deposição de colágeno corado em azul, para a coloração de tricrômico de Gomori, e a área de deposição de muco, corado em rosa magenta, para a coloração de ácido periódico reativo de Schiff, através do software Image J (AGRA et al., 2016).

4.6.6 Quantificação da atividade da enzima catalase

Após a eutanásia, o lobo direito do pulmão dos camundongos foi retirado e armazenado no -80. Em seguida, a amostra foi descongelada e homogenizada com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (IKA T10 basic) em 500 μ L de tampão fosfato de potássio + EDTA (KPE) (PH 7,5). Em seguida as amostras foram centrifugadas a 600 g por 10 minutos, a 4^o C, o sobrenadante recolhido e o *pellet* descartado. Ao final, as amostras foram armazenadas a -20^o C até o momento das análises bioquímicas.

A atividade da enzima foi determinada pela taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em concentrações conhecidas a partir do primeiro minuto de reação (1 minuto). Para este ensaio, foi preparado um “MIX” contendo 25 mL de água destilada e 40 μ L de peróxido de hidrogênio. Em seguida, adicionou-se 1 μ L de amostra para cada 99 μ L de MIX. Após homogeneização, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (*SpectraMax M5* – Molecular Devices) em absorvância de 240 nm, utilizando-se placa UV. Os valores foram expressos por U/mg de proteína.

4.7 Análise estatística

Os resultados foram representados como média \pm Erro Padrão da Média (E.P.M.) e avaliados estatisticamente por meio da análise de variância e do teste t de Student, seguido do teste de comparações múltiplas ANOVA e Newman-Kewls-Student com um nível de significância selecionado para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

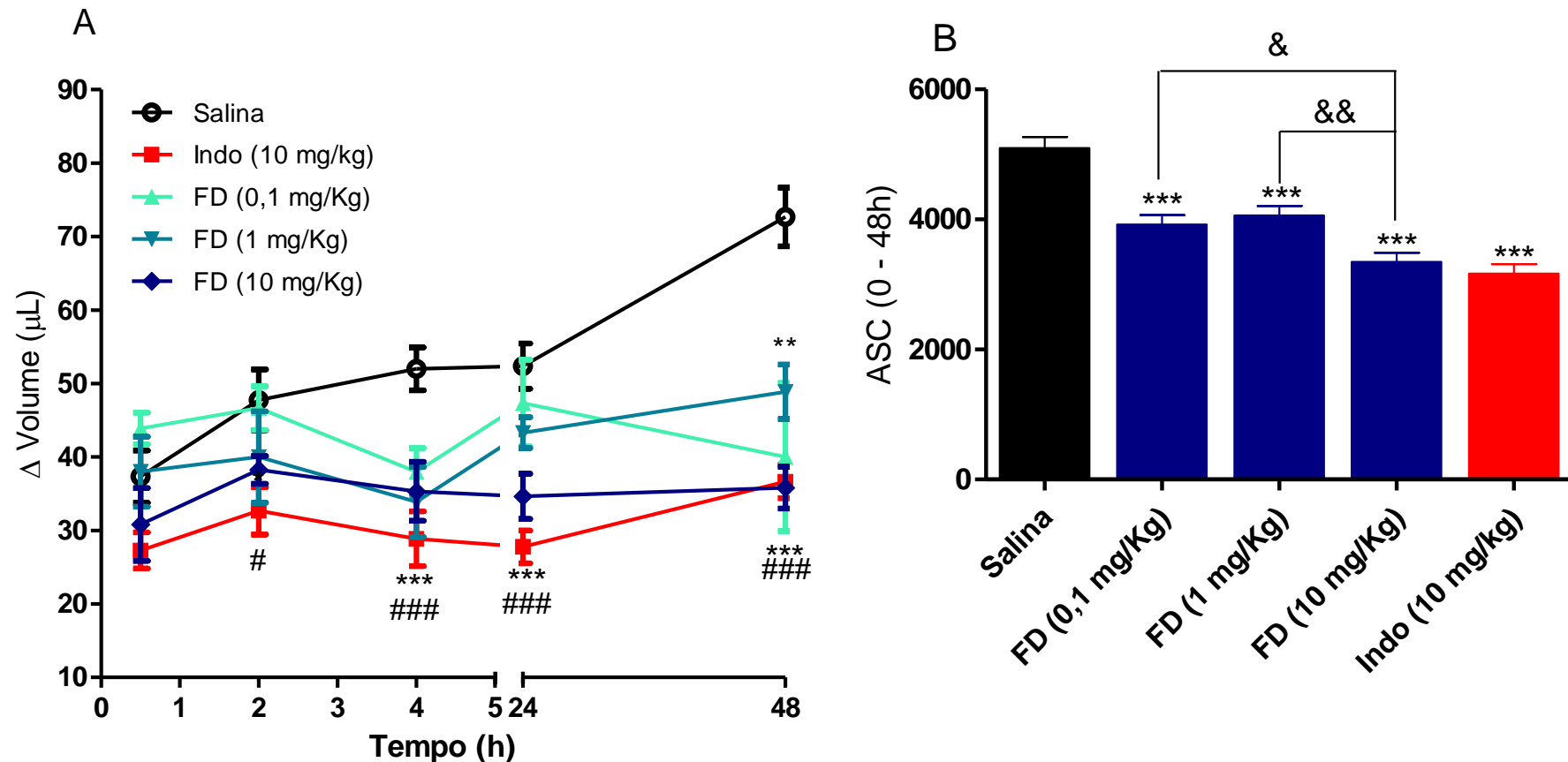
5.1 Avaliação do efeito anti-inflamatório da friedelina sobre a resposta inflamatória aguda

5.1.1. Efeito da friedelina no edema inflamatório induzido por carragenina

Com propósito de caracterizar o efeito anti-inflamatório da friedelina, avaliaram-se parâmetros da resposta inflamatória aguda, tais como a resposta edematogênica e o recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório.

Inicialmente, utilizando o modelo de edema de pata induzido por carragenina, verificou-se que o tratamento com FD, em todas as doses testadas (0,1; 1 ou 10 mg/Kg), interferiu na formação do edema induzido pela carragenina (Figuras 19 A, B e C, p. 74) até 48 horas após o estímulo. Na Figura 19 C, pode ser observado que apenas a maior dose de friedelina (10 mg/Kg) inibiu a formação do edema após 2h da administração do estímulo. De maneira semelhante, a indometacina (10 mg/Kg), um anti-inflamatório não esteroide usado como fármaco de referência, reduziu de forma significativa o edema a partir do tempo de 2h da administração do estímulo.

Figura 19 - Avaliação da atividade anti-inflamatória da friedelina no modelo de edema de pata por carragenina.

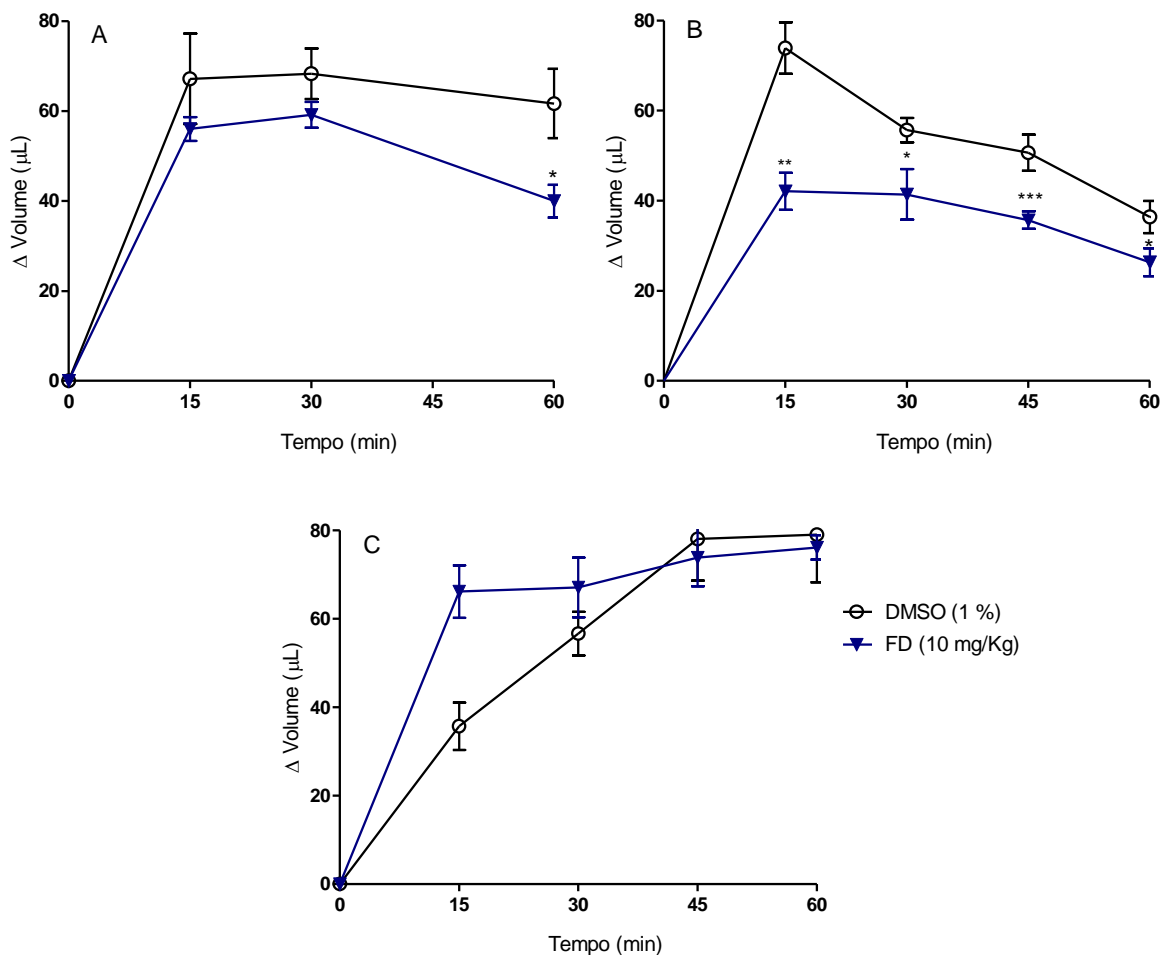


A friedelina foi injetada (i.p.) 60 minutos antes do estímulo. No gráfico A, as linhas representam a média \pm E.P.M. da variação do volume entre a pata estimulada, subtraído o volume da pata não estimulada. O gráfico B representa a área sob a curva (ASC) ao longo do tempo (0-48 h) de formação do edema pela injeção de carragenina sob tratamento de salina (barra preta), friedelina (barras azuis) ou indometacina (barra vermelha). A ASC (área sob a curva) foi calculada individualmente pelo método da somatória das áreas, obtendo a média e o seu erro padrão para cada grupo (n=6). As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguida com o teste de Newman-Keuls. (*), (**) e (***) representam, respectivamente, $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ quando comparados ao grupo tratado com salina. (&) e (&&) representam, respectivamente, $p < 0,05$, $p < 0,001$ quando comparados entre os grupos que receberam friedelina.

5.1.2 Efeito da friedelina no edema inflamatório induzido por serotonina, histamina e PGE2

Considerando que no edema evocado pela carragenina há a participação de diferentes mediadores inflamatórios, sejam pré-formados ou neo-sintetizados, decidiu-se avaliar se o tratamento com friedelina inibe a formação do edema induzido por tais mediadores. Como observado na figura 20 A (p. 76), o estímulo com PGE2 (100 ng/pata esquerda) na pata traseira esquerda dos animais induziu a formação de edema crescente a partir de 15 min, evoluiu até 45 minutos e manteve-se constante até o tempo de 60 min. O tratamento com friedelina, na dose de 10 mg/Kg, impediu a formação do edema 60 minutos após a indução do mesmo. Além disso, ao avaliar o efeito da friedelina na formação do edema induzido por histamina (100 ng/pata esquerda), mensurado nos tempos de 15 a 60 min, a injeção de histamina induziu um rápido e intenso edema 15 minutos após sua administração, havendo uma gradativa redução deste edema até o tempo de 60 min. O tratamento com friedelina (10 mg/Kg, i.p.) induziu uma redução de 43,05%, 25,65% e 29,60% na formação do edema nos tempos de 15, 30 e 45 minutos, respectivamente, que se manteve estável até o tempo de 60 min (Figura 20 B, p. 76). Por fim, ao avaliar o efeito da friedelina sobre a formação do edema induzido por serotonina (100 µg/para esquerda), observa-se que a friedelina (10 mg/Kg, i.p.) não reduziu a formação do edema em todos os tempos avaliados (Figura 20 C, p. 76).

Figura 20 - Avaliação da atividade anti-inflamatória da friedelina na formação do edema induzido por PGE2, histamina e serotonina em camundongos.

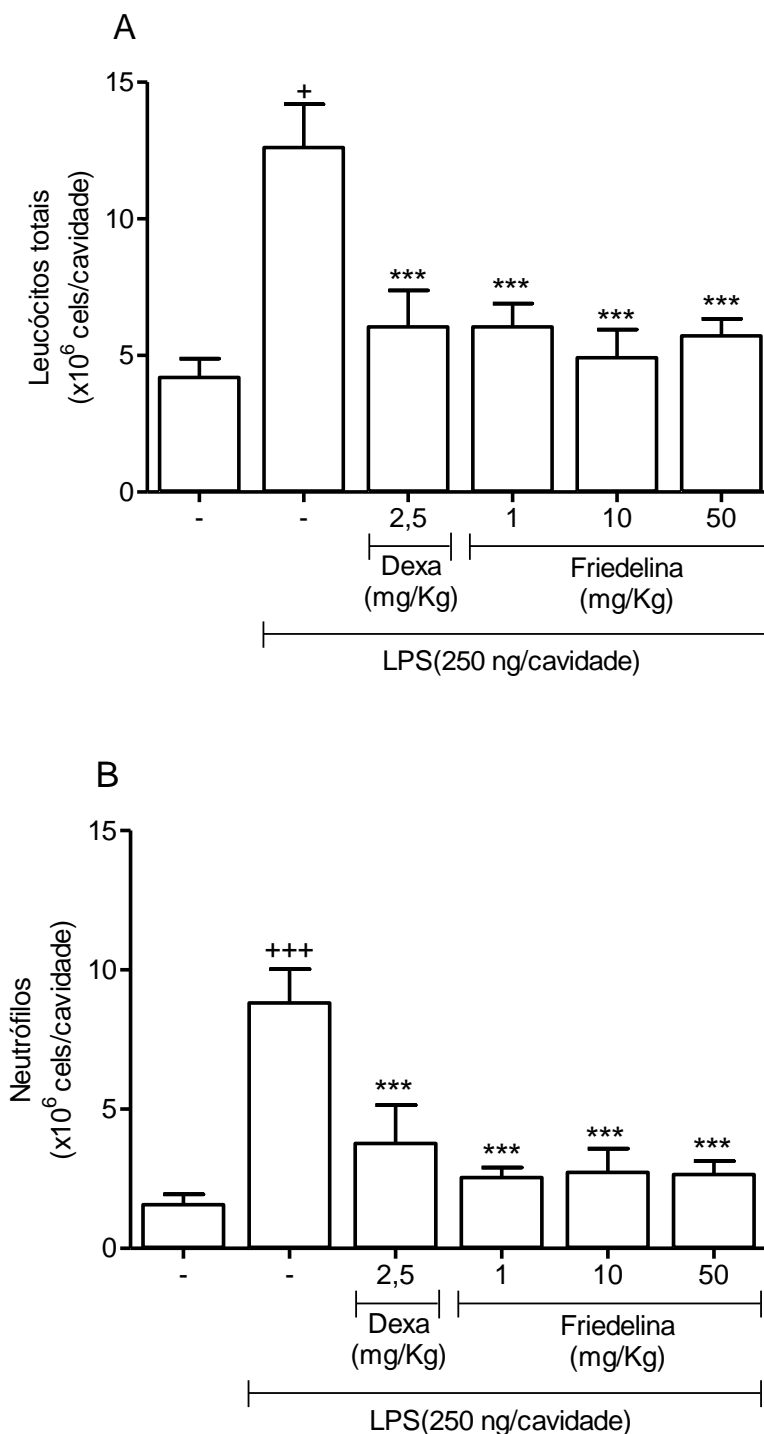


Em (A), edema induzido por PGE2; em (B), edema induzido por histamina e em (C), edema induzido por serotonina 60 minutos depois da administração de friedelina (10 mg/Kg, i.p.). As linhas representam a média \pm E.P.M. da variação do volume da pata estimulada – a pata não estimulada. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguida com o teste de Newman-Keuls. (*), (**) e (***) representam $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente, quando comparados ao grupo tratado com salina.

5.1.3 Efeito da friedelina na pleurisia induzida por LPS em camundongos

Em outro grupo de experimentos, o efeito anti-inflamatório da friedelina foi avaliado utilizando o modelo de pleurisia induzida por LPS. A administração de LPS na cavidade torácica promove um forte infiltrado celular no local da injeção. Como mostrado na figura 21 A (p. 78), 4 horas após o estímulo com LPS, houve um aumento no número de leucócitos na cavidade torácica quando comparado ao grupo de animais estimulados com salina. Entretanto, o pré-tratamento com friedelina, em todas as doses testadas, foi capaz de reduzir o influxo leucocitário para a cavidade torácica. Marcadamente, os neutrófilos mostram-se como o tipo celular presente em maior quantidade no infiltrado inflamatório induzido por LPS (Figura 21 B, p. 78). O tratamento prévio com FD, nas três doses testadas, foi capaz de reduzir a neutrofilia presente nos animais estimulados com LPS. Além disso, vale mencionar que o pré-tratamento com dexametasona (2,5 mg/Kg) por via intraperitoneal reduziu o acúmulo de leucócitos totais e neutrófilos induzidos por LPS (Figuras 21 A e 21 B, respectivamente, p. 78).

Figura 21 - Efeito da friedelina sobre o influxo de leucócitos para o espaço pleural após estímulo com LPS em camundongos.



As barras representam a contagem de leucócitos totais (A) e neutrófilos (B) no modelo pleurisia induzida por LPS. Os animais (n=6) foram tratados por via i.p. com FD (1, 10 ou 50 mg/Kg), dexametasona (2,5 mg/Kg) ou salina (0,9%) 1h antes do estímulo com LPS (250 ng/cavidade; 100 µL). As barras representam a média ± E.P.M. do número de células. Análises estatísticas utilizou ANOVA, seguidas com o teste de Newman-Keuls. (+++) representa p<0,001 quando comparado ao grupo estimulado com salina. (***) representa p<0,001 quando comparado ao grupo estimulado com LPS.

Para verificar o efeito da friedelina na mobilização de células da medula óssea (MO) para o sangue periférico, os animais pré-tratados com friedelina e estimulados com LPS foram avaliados quanto à contagem total e diferencial de leucócitos 4 horas após o estímulo. Como observado na Tabela 7, nos animais estimulados com LPS, observamos uma maior saída de células da medula óssea, predominantemente de neutrófilos, quando comparados aos animais estimulados com salina. Além disso, nos animais estimulados com LPS há uma maior contagem de leucócitos, predominantemente de neutrófilos na circulação periférica, quando comparados aos animais estimulados com salina. No entanto, o tratamento com friedelina foi hábil em reduzir a saída de leucócitos da medula óssea, reduzindo, assim, sua chegada ao sangue periférico, quando comparado ao grupo estimulado com LPS.

Tabela 7 - Efeito da friedelina na mobilização de leucócitos da medula óssea e do sangue periférico.

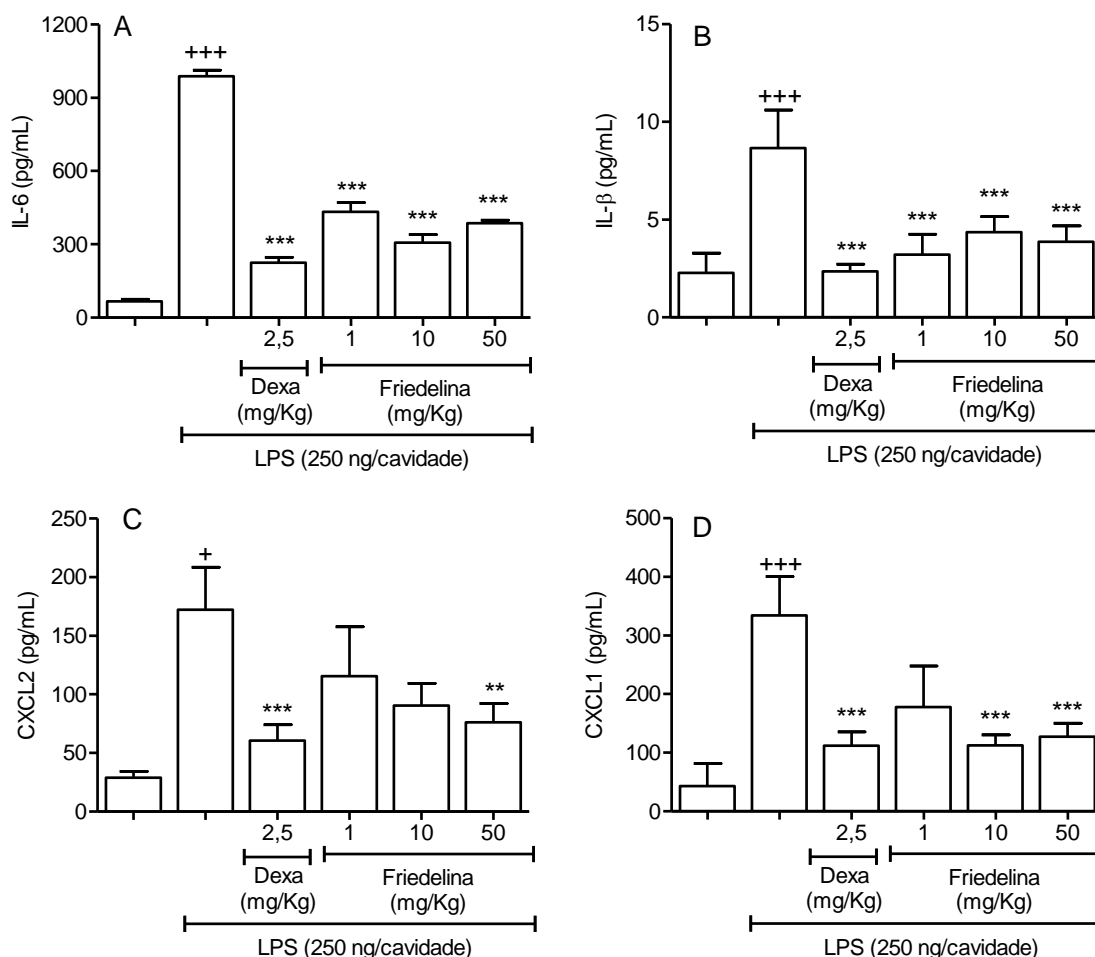
Estímulo	Tratamento (mg/Kg)	Sangue periférico (x10 ³ /mm ³)		Médula óssea (x10 ⁶ /fêmur)	
		Leucócitos totais	Neutrófilos	Leucócitos totais	Neutrófilos
Salina	-	19,8 ± 1,8	3,5 ± 0,4	38,1 ± 2,5	4,9 ± 0,6
LPS	-	26,7 ± 1,8 ⁺⁺⁺	14,9 ± 2,3 ⁺⁺⁺	18,8 ± 0,7 ⁺⁺⁺	1,7 ± 0,2 ⁺⁺⁺
LPS	FD (1)	14,4 ± 1,3 ^{***}	5,9 ± 0,9 ^{***}	28,8 ± 3,3 ^{***}	3,5 ± 0,6 ^{**}
	FD (10)	9,3 ± 1,6 ^{***}	11,2 ± 3,2 ^{**}	22,4 ± 1,2 ^{**}	2,4 ± 0,4 ^{**}
	FD (50)	12,5 ± 0,9 ^{***}	9,9 ± 1,3 ^{**}	25,4 ± 2,2 ^{***}	3,5 ± 0,4 ^{**}
	Dexa (10)	18,7 ± 2,4 ^{***}	10,1 ± 0,5 ^{**}	27,0 ± 4,5 ^{***}	3,6 ± 0,3 ^{**}

Cada valor representa a média ± E.P.M. do número de leucócitos totais ou neutrófilos no sangue periférico ou na medula óssea. As diferenças estatísticas foram analisadas por ANOVA seguida do pós-teste Newman-Keuls-Student. +++p<0,001, quando comparado aos animais (n=6) estimulados com salina. **p<0,01, ***p<0,001 quando comparados aos animais estimulados com LPS.

5.1.4 Efeito da friedelina na quantificação de citocinas no lavado pleural de camundongos estimulados por lipopolissacarídeo

No efluente do lavado pleural da reação induzida por LPS, foi observado que o LPS promoveu um aumento significativo nos níveis de IL-6, IL-1 β , CXCL2 (MIP-2) e CXCL1 (KC), conforme observado na figura 22. Podemos observar que a friedelina, na maior concentração (50 mg/kg), reduziu os níveis de todos os mediadores avaliados.

Figura 22 - Efeito da friedelina sobre o conteúdo de citocinas presentes no efluente pleural de animais estimulados com LPS.

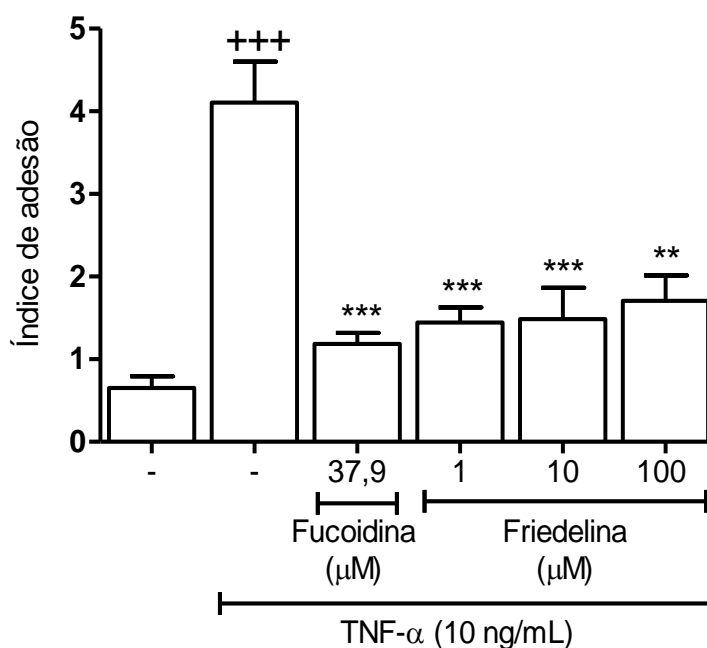


Cada barra representa a média \pm E.P.M. dos níveis de KC, IL-6, CXCL1 (MIP-1 α) e CXCL2 (MIP-2) no lavado pleural. As diferenças estatísticas foram analisadas por ANOVA, seguida do pós-teste Newman-Keuls-Student. +p<0,05, ++p<0,01, +++p<0,001 quando comparados aos animais (n=6) estimulados com salina. *p<0,05, **p<0,01 quando comparados aos animais estimulados com LPS.

5.1.5 Efeito da friedelina sobre a adesão/quimiotaxia de neutrófilos

Considerando os resultados prévios que revelaram o efeito da friedelina em inibir o recrutamento de neutrófilos no sítio inflamatório após estímulo com LPS, avaliou-se se o tratamento com friedelina poderia afetar a adesão e quimiotaxia de neutrófilos. Para isso, utilizou-se o sistema de cocultivo de células para avaliar o efeito da friedelina sobre a adesão de neutrófilos ao endotélio. Como observado na figura 23, quando neutrófilos são postos a aderir sobre células endoteliais ativadas (TNF- α , 10 ng/mL), notou-se um aumento significativo no número de neutrófilos aderidos às células endoteliais. Este fenômeno foi completamente abolido quando neutrófilos foram previamente expostos a diferentes concentrações de friedelina (1, 10 e 100 μ M). Fucoidina, um inibidor de P e L-selectina utilizado como controle, também promoveu uma diminuição do número de neutrófilos aderidos às células endoteliais.

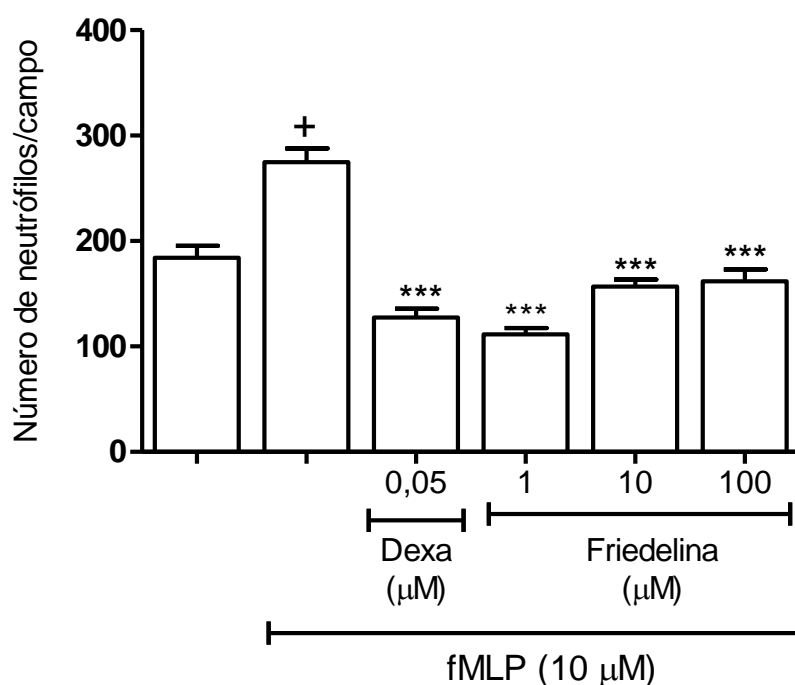
Figura 23 - Efeito da friedelina sobre a adesão de neutrófilos a células endoteliais.



Neutrófilos humanos foram tratados com friedelina (1, 10 e 100 μ M), fucoidina (37,9 μ M) ou veículo (etanol 0,005%) por 2h. As células endoteliais foram estimuladas com TNF- α (10 ng/mL) por 4h. Os dados representam o índice de adesão de neutrófilos a células endoteliais quando comparado ao grupo de neutrófilos tratados apenas com meio de cultura RPMI (100%). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças estatísticas foram analisadas por ANOVA, seguida do pós-teste Newman-Keuls-Student. +++p<0,001 quando comparados ao grupo RPMI. **p<0,001 quando comparados ao grupo estimulado com TNF- α .

Em seguida, foi avaliado o efeito direto da friedelina na quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*. Neste experimento, a quimiotaxia de neutrófilos foi avaliada *in vitro* utilizando o ensaio de quimiotaxia em câmara de Boyden. Como mostrado na figura 24, o estímulo com fMLP aumentou a quimiotaxia de neutrófilos quando comparado às células tratadas apenas com meio de cultivo. O tratamento com FD (1, 10 e 100 μM) reduziu a migração de neutrófilos expostos ao estímulo quimioatraente (fMLP 10 μM). Como esperado, o tratamento prévio com dexametasona (0,05 μM) reduziu a migração de neutrófilos.

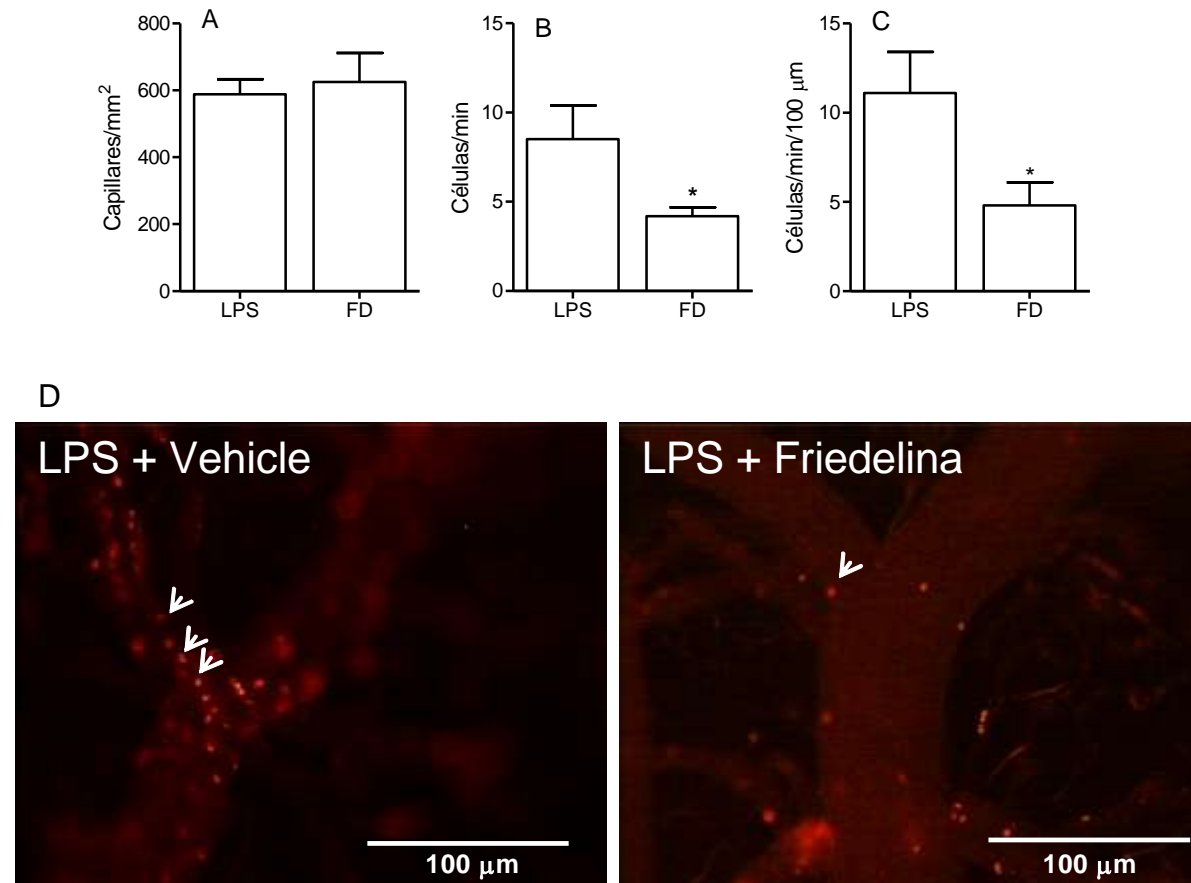
Figura 24 - Efeito da friedelina sobre a quimiotaxia de neutrófilos humanos.



Neutrófilos humanos foram tratados com friedelina (1, 10 e 100 μM), dexametasona (50 nM) ou (etanol 0,005%) por 2h. Os dados representam o número de neutrófilos por campo avaliado. (+) $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado apenas com meio de cultura RPMI; (*) $p < 0,05$ quando comparado ao grupo estimulado com fMLP e tratado com meio RPMI. Os dados foram mostrados como média \pm erro padrão da média. As diferenças estatísticas foram analisadas por ANOVA, seguida do pós-teste Newman-Keuls-Student. + $p < 0,05$ quando comparados ao grupo RPMI. *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo estimulado com fMLP.

Considerando estes resultados, verificou-se se as alterações observadas na adesão e quimiotaxia de neutrófilos seriam capazes de se repetir em um sistema *in vivo*. Para isso, ratos estimulados com LPS (6 mg/Kg) e tratados com friedelina (10 mg/Kg) tiveram a microcirculação avaliada pela técnica de microscopia intravital, o que possibilitou a visualização da rede de capilares e os leucócitos em seu interior. Como observado na figura 25 A (p. 84), o tratamento com friedelina não alterou o número e densidade de capilares na área visualizada quando comparado aos animais estimulados com LPS. No entanto, quando se observaram o rolamento e a adesão dos leucócitos ao endotélio, constatou-se uma redução significativa nestes parâmetros (Figuras 25 B e 25 C, p. 84). Na figura 25 D (p. 84), observam-se imagens representativas da marcação com rodamina-6G na microcirculação de animais estimulados (LPS+veículo) e tratados com friedelina (LPS+friedelina).

FIGURA 25 - Efeito da friedelina na interação leucócito endotélio na microcirculação de ratos estimulados com LPS.

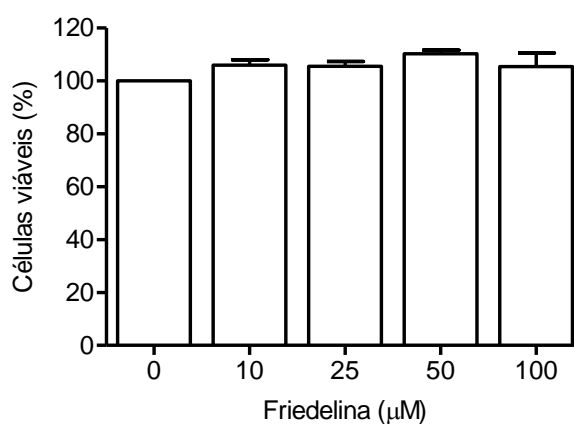


As barras representam a densidade de capilares (A), rolamento (B) e adesão de leucócitos (C) na microcirculação de ratos (n=8) estimulados com LPS (6 mg/Kg, i.p.) e tratados com FD (10 mg/Kg, i.p.). Em D, fotomicrografias representativas da microvasculatura exibindo a marcação de rodamina-6G. Aumento de 100x. Dados representam a média \pm E.P.M do número de capilar por mm² (A) e número de células por minuto em B e C. *p<0,05 quando comparado aos animais tratados com veículo (DMSO 1%).

5.1.6 Efeito da friedelina sobre a viabilidade de células *in vitro*

Para descartar se os efeitos inibitórios apresentados pela friedelina sobre as funções de neutrófilos estejam relacionados a possíveis efeitos citotóxicos, avaliou-se o efeito da friedelina sobre a viabilidade de neutrófilos. Na figura 26, pode ser observado que o tratamento com diferentes concentrações de FD não interferiu com a viabilidade das células, sugerindo ausência de efeitos citotóxicos.

Figura 26 - Efeito da friedelina sobre a viabilidade de neutrófilos.



Neutrófilos humanos foram tratados com friedelina (10, 25, 50 e 100 µM) ou veículo (etanol 0,005%, barra na cor branca) por 12h. Os dados representam a porcentagem (%) de células viáveis quando comparadas ao grupo tratado apenas com meio de cultura RPMI (100%) e mostrado como média ± erro padrão da média.

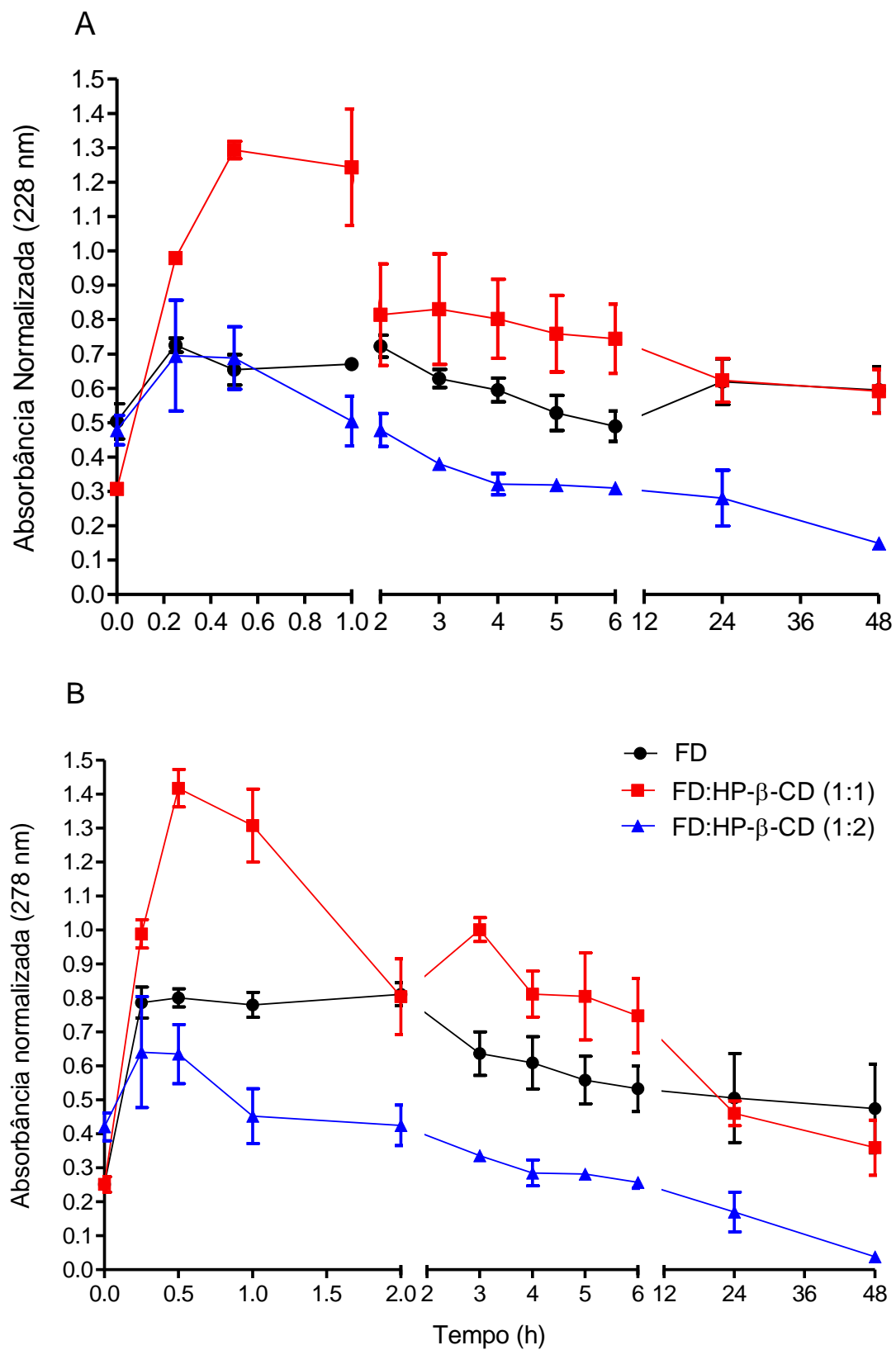
5.2 Caracterização físico-química da formação do complexo entre friedelina e hidroxipropil- β -ciclodextrina

5.2.1 Formação do complexo FD:HP- β -CD por absorção no UV-Vis

Para avaliar a formação de complexos de inclusão entre friedelina e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), utilizou-se, inicialmente, a técnica espectroscópica de absorção no UV-Vis. Na figura 27 (p. 87), pode ser verificada em diferentes tempos a absorbância normalizada da FD, FD:HP- β -CD (na proporção 1:1) e FD:HP- β -CD (na proporção 1:2).

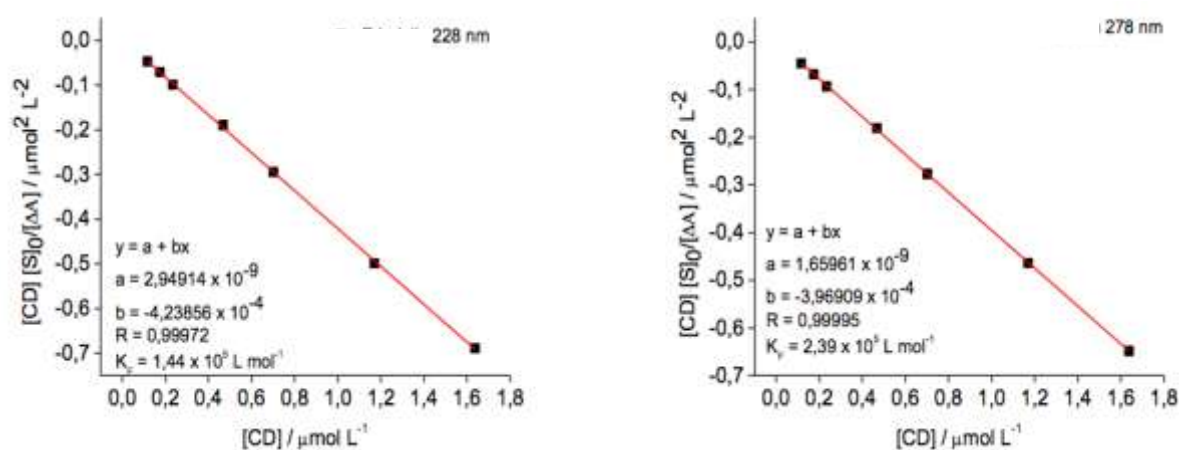
Na figura 27 (p. 87), comprimento de onda de 228 nm, o complexo formado na proporção 1 para 1 (linha vermelha) apresentou uma variação de absorbância de 0,3 a 1,2 de intensidade, mostrando uma crescente em intensidade quando comparada à friedelina pura nos primeiros 60 minutos da análise. Em seguida, a absorbância apresentou valores muito próximos aos detectados pela friedelina pura, principalmente nas 24h finais à análise. Um perfil semelhante pode ser observado no comprimento de onda de 278 nm (Figura 27 B, p. 87). No entanto, ao observar-se o complexo formado entre friedelina e HP- β -CD na proporção 1:2 (linha azul), nota-se uma diminuição na intensidade da absorbância a partir do tempo de 2h, quando comparado à friedelina pura. Além disso, observa-se também que, após esse período, a variação no valor da absorbância mostrou-se mínimo até as 24h (de 0,38 a 0,31), chegando a 0,14 no tempo de 48h. Quando os mesmos parâmetros foram observados no comprimento de 278 nm, o mesmo perfil pôde ser notado, sendo ainda maior a diminuição da absorbância após o tempo de 2h (0,48) para 48h (0,038) da solução em agitação. Cabe destacar que a análise foi realizada nestes dois comprimentos de onda, por serem os comprimentos em que a friedelina livre apresenta picos de maior intensidade, sendo característicos desta molécula.

Figura 27 - Cinéticas de formação do complexo de FD em HP- β -CD na razão molar de 1:1 e 1:2.



O comportamento espectrométrico da FD e da HP- β -CD em solução foi acompanhado em função do tempo para verificar alterações na absorvância com o propósito de identificar interações entre FD e HP- β -CD. A partir destes resultados, determinaram-se as condições adequadas para formação do complexo entre FD e HP- β -CD para as etapas posteriores deste trabalho. Para determinar o valor da constante de formação e dissociação da interação entre FD e HP- β -CD, utilizou-se a equação de Benesi-Hildebrand empregando os valores espectrométricos nos comprimentos de onda de 228 e 278 nm. Para tal, após 48h de agitação, a solução contendo FD e HP- β -CD, na proporção molar 1:2, foi analisada no UV-Vis. Ao aplicar os valores obtidos na equação, pode-se observar, na figura 28, a relação linear entre as variáveis.

Figura 28 - Constante de formação e dissociação do complexo FD:HP- β -CD.



Os valores da constante de formação do complexo FD:HP- β -CD foram de $1,44 \times 10^5$ e $2,39 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}$, nos comprimentos de onda de 228 e 278 nm, respectivamente. Para os valores da constante de dissociação, foram de $6,94 \times 10^{-6}$ e $4,18 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, nos comprimentos de onda de 228 e 278 nm, respectivamente.

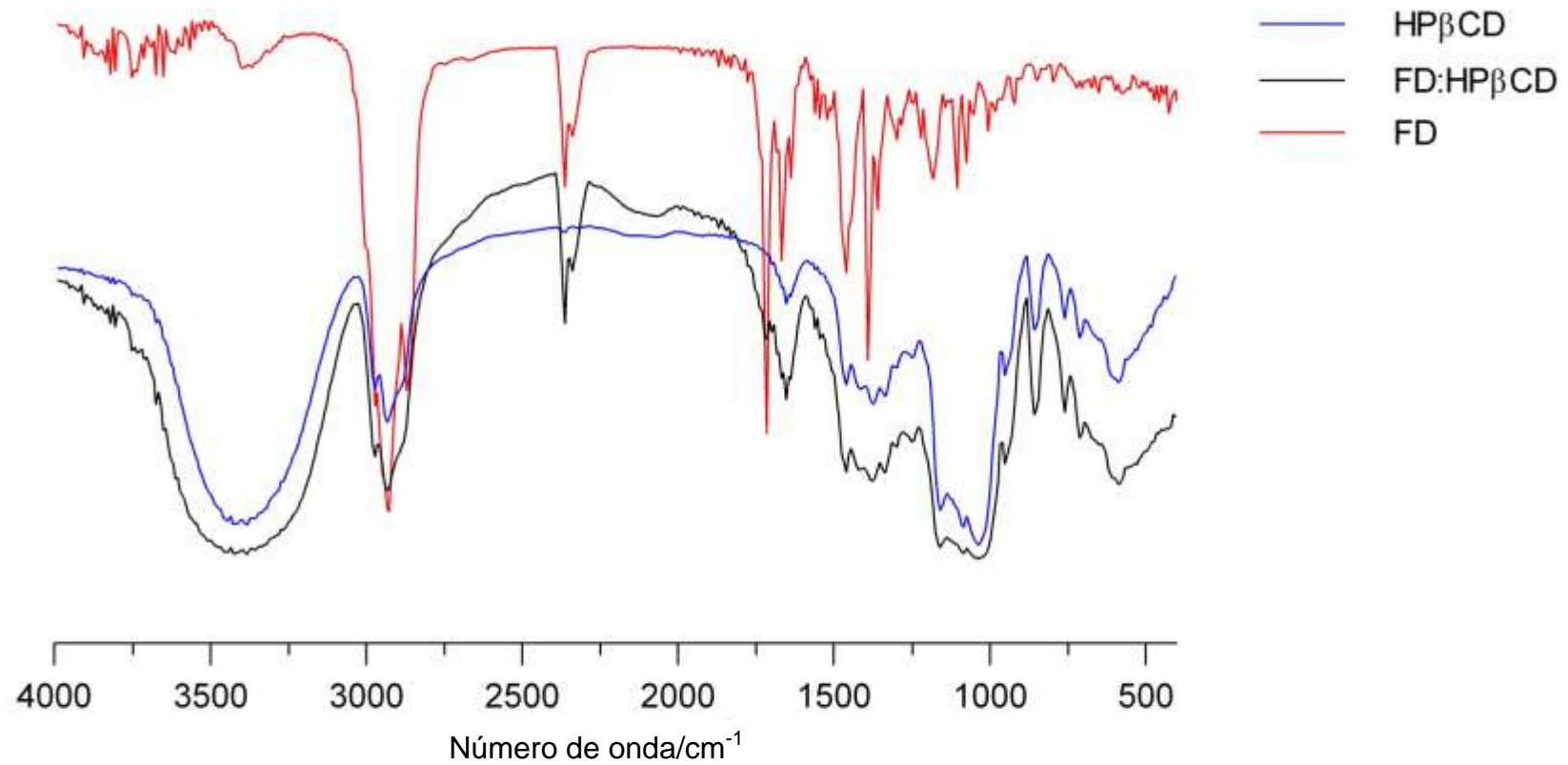
5.2.2 Formação do complexo FD:HP- β -CD por FT-IR

Para confirmação da formação do complexo de inclusão, foi utilizada a técnica do infravermelho por transformada de Fourier. Com esta técnica, as alterações espectroscópicas das interações entre a molécula hóspede e a ciclodextrina podem ser observadas, o que auxilia na identificação e caracterização da formação do complexo.

Na figura 29 (p. 91), podem ser observados os espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de FD, HP- β -CD e FD:HP- β -CD. Nesta figura, a linha vermelha representa o perfil da FD no espectro do infravermelho, no qual nota-se a presença de grupo carbonila (região de 1712,7 cm^{-1}). A presença de bandas em 2885, 2939 e 2970 cm^{-1} evidencia o caráter alifático da molécula e a presença de grupamentos C-H. A linha azul representa o espectro de infravermelho da HP- β -CD, que revela a intensidade das bandas de vibração em 3417 cm^{-1} para o grupamento O-H, enquanto na região de 2931 cm^{-1} nota-se o grupamento de C-H. Já nos pontos de menor intensidade, como os 1049, 1092,8 e 1157,2 cm^{-1} , pode ser observada a presença de grupamentos C-H e C-O) (BARBOSA, 2007).

Quando se observa o perfil obtido do complexo (FD:HP- β -CD), podem ser notadas alterações no espectro de infravermelho capazes de evidenciar a ocorrência da complexação (Figura 29 C, linha preta, p. 90). É possível observar alterações no perfil das bandas de absorção na região entre 1700 e 1500 cm^{-1} que se assemelham a HP- β -CD, além de alguns perfis de FD que foram completamente suprimidos (1629, 1658 e 2865 cm^{-1}) e a intensidade das bandas em 1712,7, 2931 e 2975 cm^{-1} alteradas.

Figura 29 - Espectros de infravermelho na análise da formação do complexo FD:HP- β -CD.



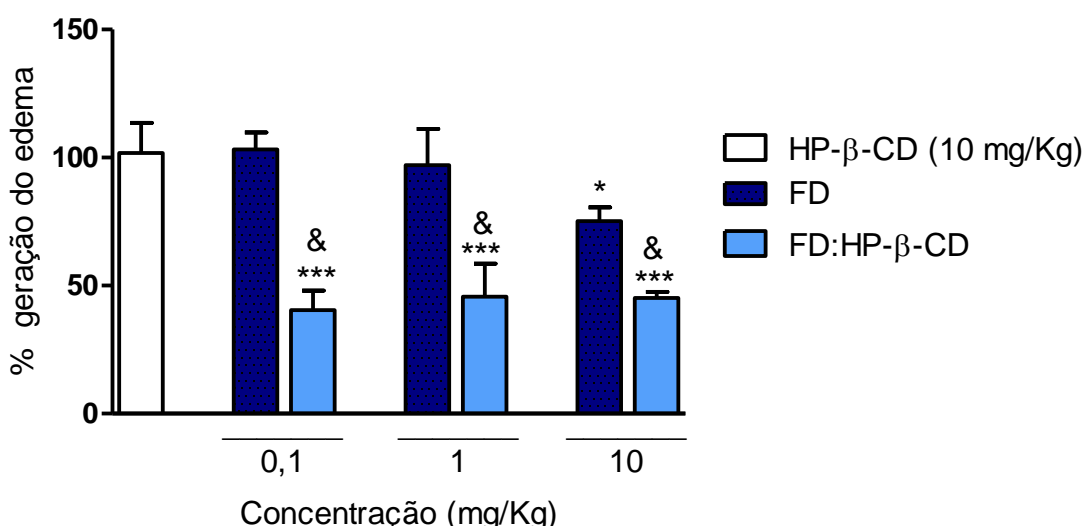
Espectro de infravermelho das amostras de FD (linha vermelha), HP- β -CD (linha azul) e FD:HP- β -CD (linha preta) no intervalo de 4000 a 400 cm⁻¹.

5.3 Avaliação da atividade biológica do complexo entre friedelina e hidroxipropil- β -ciclodextrina

Considerando que a friedelina mostrou-se capaz de formar complexo com a hidroxipropil- β -ciclodextrina, tornou-se necessário avaliar se os efeitos biológicos da friedelina foram mantidos na conformação de complexo com ciclodextrina. Logo, utilizando o modelo de edema de pata induzida por carragenina, decidiu-se avaliar se o complexo FD:HP- β -CD interfere com o potencial anti-inflamatório da friedelina livre.

Como apresentado na figura 30, e de acordo com os resultados anteriores, o pré-tratamento dos animais com FD reduziu a formação do edema no tempo de 2h apenas na maior concentração (10 mg/Kg, i.p.). Entretanto, o tratamento com a friedelina nas três doses testadas na forma de complexo com HP- β -CD inibiu a formação do edema no tempo de 2h. Este resultado indica que o complexo em ciclodextrina faz revelar o efeito anti-inflamatório que não se observa na friedelina em doses menores.

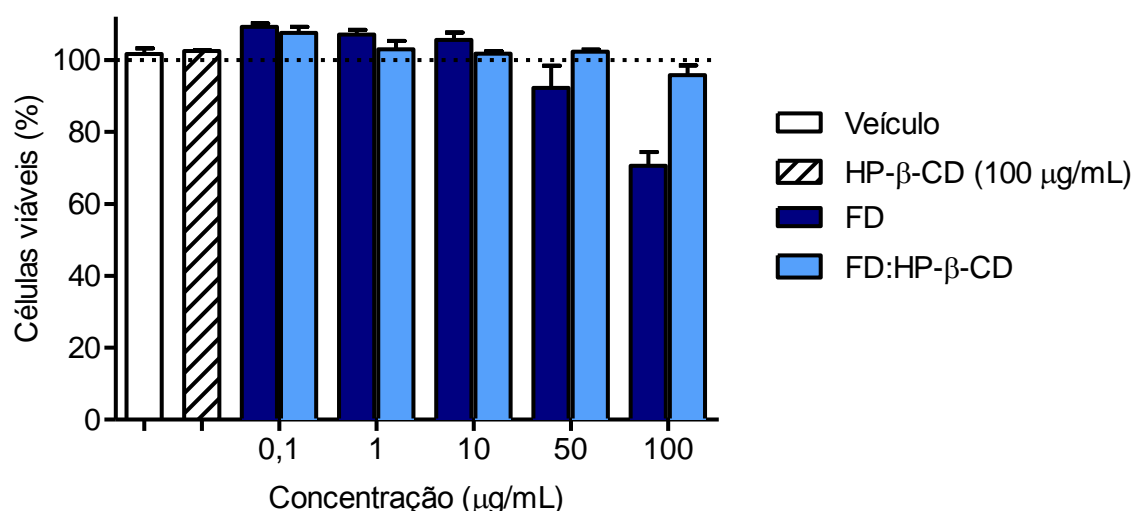
Figura 30 - Avaliação da atividade anti-inflamatória da friedelina e do seu complexo em ciclodextrina no modelo de edema induzido por carragenina.



HP- β -CD, FD e FD:HP- β -CD foram injetadas por via intraperitoneal 1h antes do estímulo. As barras representam a média \pm E.P.M. da variação da geração de edema da pata estimulada – a pata não estimulada. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguida com o teste de Newman-Keuls. (*) e (***) representam, respectivamente, $p < 0,05$ e $p < 0,001$ quando comparados ao grupo tratado com salina e estimulados com carragenina. (&) representa $p < 0,05$ quando comparado ao grupo FD:HP- β -CD ao FD livre.

Com propósito de investigar o potencial citotóxico do complexo, foi utilizada a linhagem de macrófagos J774A.1 expostas a diferentes concentrações de FD e FD:HP- β -CD por 24h para posterior avaliação da viabilidade pelo ensaio do MTT. Como observado na figura 31, o tratamento com FD livre não foi capaz de interferir com a viabilidade das células até a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Porém, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, notou-se uma redução na viabilidade das células de aproximadamente 35%. Em contraste, nenhuma das concentrações avaliadas de friedelina na forma de complexo com ciclodextrina foi capaz de reduzir a viabilidade dos macrófagos, em especial na maior concentração (100 $\mu\text{g/mL}$), o que sugere que a friedelina na forma de complexo possui efeito de reduzir a viabilidade suprimida.

Figura 31 - Efeito da friedelina e do seu complexo em ciclodextrina na viabilidade de macrófagos.



Macrófagos J774A.1 foram tratadas com friedelina (0,1 - 100 $\mu\text{g/mL}$) ou veículo (etanol 0,0005%) por 24 h. Os dados representam a porcentagem (%) de células viáveis quando comparados ao grupo tratado apenas com meio de cultura RPMI (linha pontilhada) e mostrados como média \pm erro padrão da média.

5.4 Efeito da friedelina livre e na forma de complexo com hidroxipropil-beta-ciclodextrina (FD:HP- β -CD) sobre a inflamação alérgica no modelo de asma experimental em camundongos

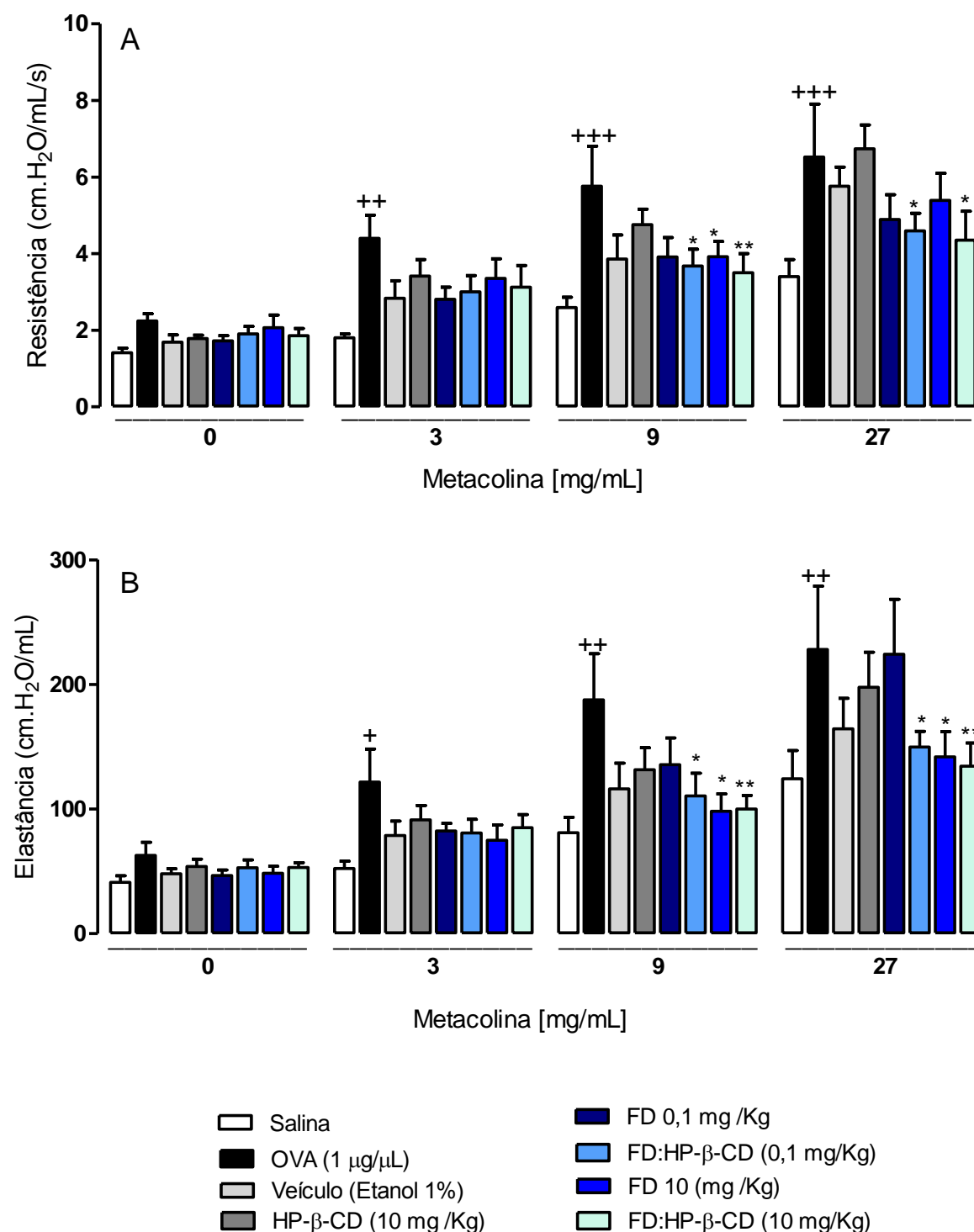
5.4.1 Efeito da FD e FD:HP- β -CD sobre parâmetros da função pulmonar em animais asmáticos estimulados com ovalbumina

Considerando todo o potencial farmacológico da friedelina descrito neste estudo até o momento, bem como a ausência de estudos sobre os possíveis efeitos antialérgicos da friedelina, decidiu-se avaliar, em um modelo experimental que mimetiza a fisiopatologia da asma alérgica, os efeitos da friedelina e do seu complexo em ciclodextrina.

Portanto, camundongos tornados asmáticos, de acordo com o protocolo experimental de sensibilização ativa com ovoalbumina, foram tratados com FD ou FD:HP- β -CD por via intranasal.

Parâmetros da mecânica pulmonar foram avaliados a conforme figura 32 (p. 94), de modo que animais asmáticos desafiados com OVA exibiram um aumento de maneira concentração-dependente na resistência e elastância pulmonar quando estimulados com metacolina. O tratamento intranasal com FD passou a inibir a resistência e a elastância pulmonar apenas na dose de 10 mg/Kg quando os animais foram estimulados com as concentrações de metacolina (9 e 27 mg/mL). O tratamento com o complexo FD:HP- β -CD reduziu os parâmetros de resistência e elastância pulmonar quando utilizada a friedelina livre na dose de 10 mg/Kg e em complexo com ciclodextrina já na dose de 0,1 mg/Kg (Figuras 32 A e B, respectivamente, p. 94). O tratamento com veículo (etanol 1%) ou HP- β -CD não alterou os parâmetros avaliados.

Figura 32 - Efeito do tratamento com FD e FD:HP- β -CD sobre parâmetros da função pulmonar de camundongos asmáticos estimulados com ovalbumina.



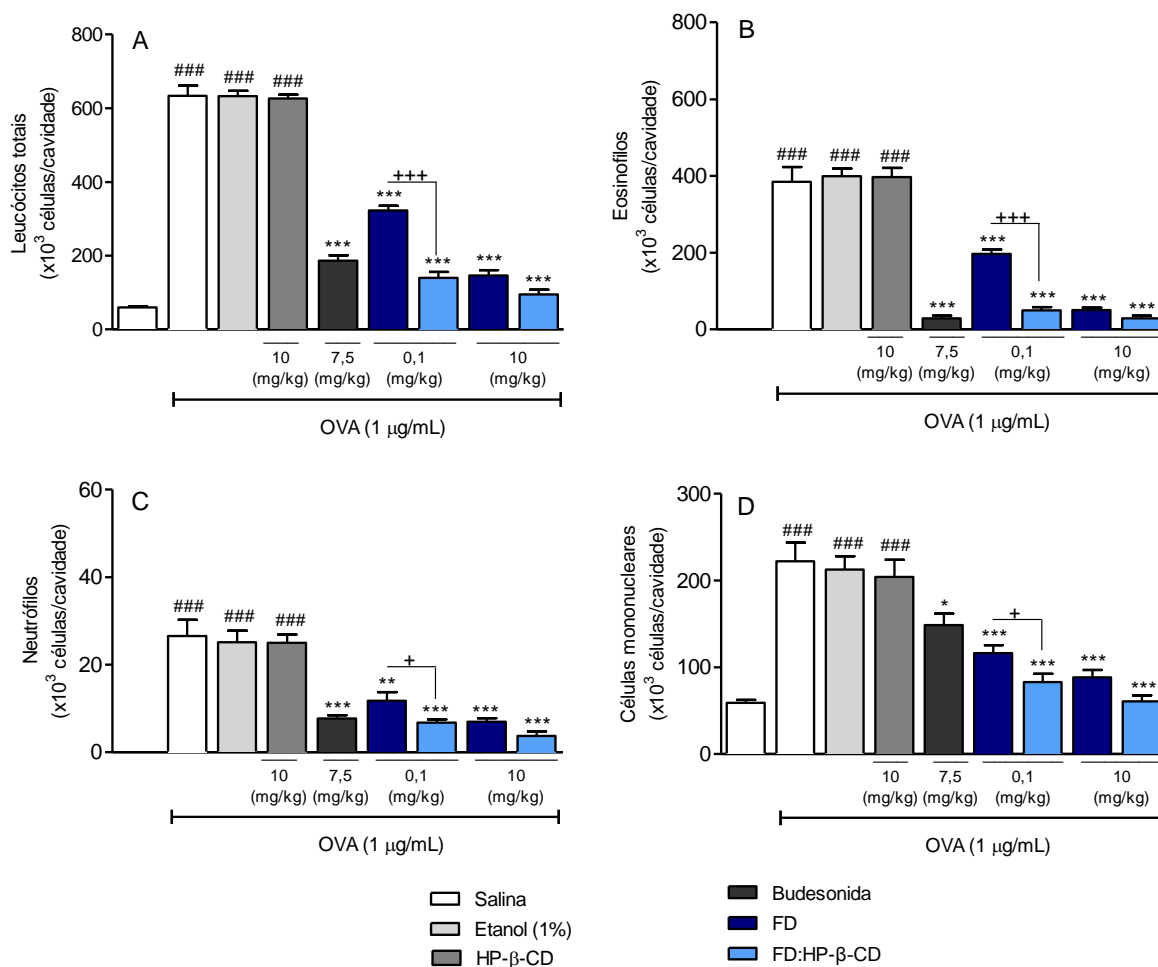
Os animais (n=10) foram tratados com FD (0,1 ou 10 mg/Kg), FD:HP- β -CD (0,1 ou 10 mg/Kg), veículo (etanol 1%), budesonida (7,5 mg/Kg), HP- β -CD (10 mg/Kg) ou salina por via intranasal 1h antes do desafio intranasal com ovalbumina. As barras representam a média \pm E.P.M. dos parâmetros de resistência e elastância pulmonar. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguida com o teste de Newman-Keuls. (*) e (**) representam $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente, quando comparados ao grupo desafiado com OVA e tratados com salina. (++) representa $p < 0,01$ quando comparado ao grupo desafiado com salina.

5.4.2 Efeito da FD e FD:HP- β -CD na inflamação das vias aéreas de animais asmáticos estimulados com ovalbumina

Em seguida, foi avaliado o efeito da friedelina e do seu complexo com ciclodextrina sobre a inflamação das vias aéreas após estímulo com OVA nos animais asmáticos.

Conforme a figura 33 (p. 96), o lavado broncoalveolar de animais desafiados por via intranasal com ovalbumina exibiu um acúmulo leucocitário (Figura 33 A) representado por aumento nas contagens de eosinófilos (Figura 33 B), neutrófilos (Figura 33 C) e células mononucleares (Figura 33 D). O tratamento com friedelina livre ou em complexo com ciclodextrina reduziu todos os parâmetros avaliados. Em especial, a friedelina na menor dose (0,1 mg/Kg) teve seu efeito incrementado sobre o acúmulo de eosinófilos quando administrada em complexo com ciclodextrina. Como esperado, o tratamento com budesonida (7,5 mg/Kg), fármaco de referência, reduziu o infiltrado inflamatório no lavado broncoalveolar. O tratamento com veículo (etanol 1%) ou HP- β -CD não alterou os parâmetros avaliados.

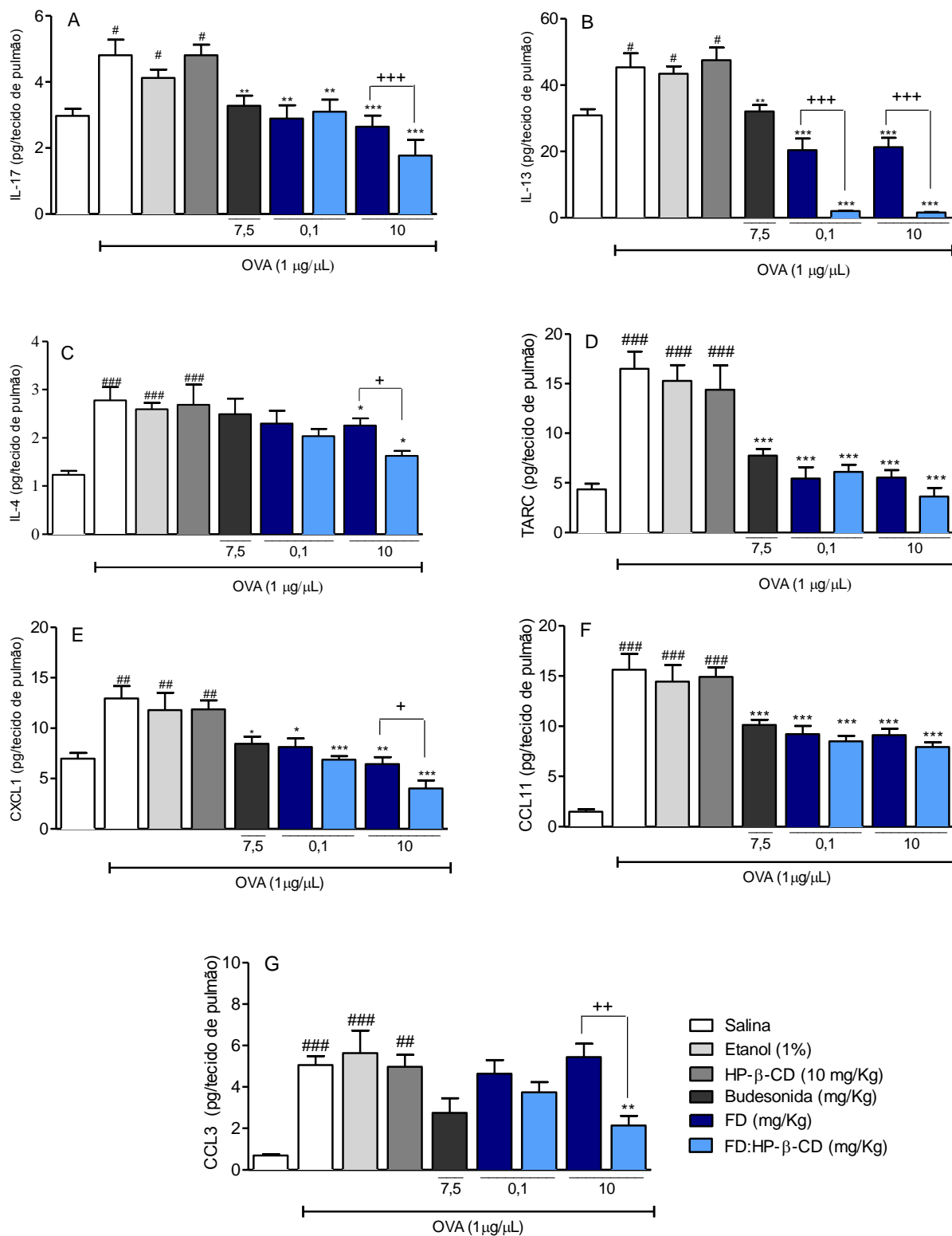
Figura 33 - Efeito do tratamento com FD e FD:HP- β -CD sobre a inflamação nas vias aéreas de camundongos asmáticos estimulados com ovalbumina.



Os animais foram tratados com FD (0,1 e 10 mg/Kg), FD:HP- β -CD (0,1 e 10 mg/Kg), HP- β -CD (10 mg/Kg), budesonina (7,5 mg/Kg), veículo (Etanol 1%) ou salina por via intranasal 60 minutos antes de cada desafio intranasal com ovalbumina. As barras representam a média \pm E.P.M. da contagem de leucócitos no lavado broncoalveolar de camundongos alérgicos. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguida com o teste de Newman-Keuls. (**) representa $p < 0,01$, (***) representa $p < 0,001$ quando comparados ao grupo desafiado com OVA e tratado com salina. (###) representa $p < 0,001$ quando comparado ao grupo desafiado com salina. (+) e (+++) representam $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente, quando comparado os grupos FD e HP- β -CD.

A partir do lavado broncoalveolar foram quantificadas algumas citocinas e quimiocinas envolvidas na inflamação alérgica. Conforme a figura 34 (p. 98), animais asmáticos estimulados com OVA aumentaram os níveis de citocinas IL-17, IL-13, IL-4 e TARC (Figuras 34 A, B, C e D, respectivamente, p. 98) quando comparados ao grupo desafiado com salina, bem como houve um aumento nos níveis de quimiocinas KC, eotaxina-1 e MIP-1 α (Figuras 34 E, F e G, respectivamente). Os camundongos tratados com FD reduziram os níveis de IL-17, IL-13, TARC, KC e eotaxina-1 (Figuras 34 A, B, D, E e F, respectivamente, p. 98), mas não os níveis de IL-4 e MIP-1 α (Figuras 34 C e G, respectivamente, p. 98). Porém, quando os animais foram tratados com o complexo FD:HP- β -CD, foi observada uma redução nos níveis de todos os mediadores avaliados, incluindo IL-4 e MIP-1 α (Figuras 34 C e G, respectivamente, p. 98). Observa-se, ainda, que houve uma potencialização da redução dos níveis de IL-13 (Figura 34 B, p. 98) quando os animais foram tratados com o complexo friedelina:ciclodextrina. O tratamento com veículo (etanol 1%) ou HP- β -CD não alterou os parâmetros avaliados.

Figura 34 - Efeito do tratamento com FD e FD:HP- β -CD sobre os níveis de citocinas e quimiocinas presentes nas vias aéreas de camundongos asmáticos estimulados com ovalbumina.

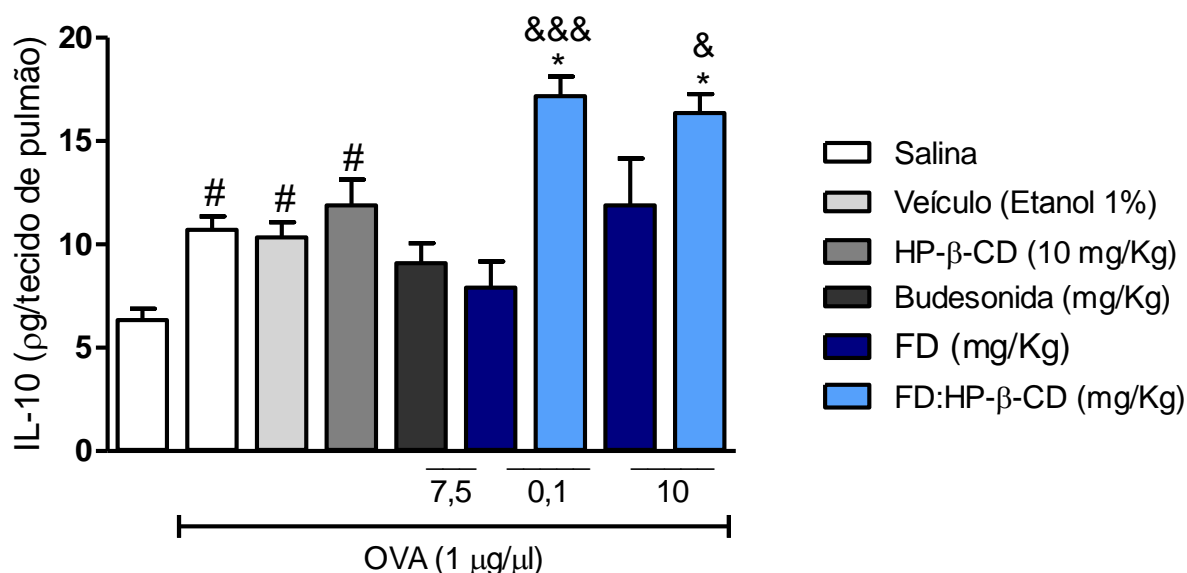


Os animais foram tratados com FD (0,1 ou 10 mg/Kg), FD:HP- β -CD (0,1 ou 10 mg/Kg), HP- β -CD (10 mg/Kg), budesonida (7,5 mg/Kg), veículo (etanol 1%) ou salina por via intranasal 1h antes de cada

desafio intranasal com ovalbumina. As barras representam a média \pm E.P.M. dos níveis dos mediadores pró-inflamatórios no lavado broncoalveolar de camundongos alérgicos. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguida com o teste de Newman-Keuls. (***) representa $p < 0,001$, (**) representa $p < 0,01$, (*) representa $p < 0,05$ quando comparados ao grupo desafiado com OVA e tratado com salina. (###) representa $p < 0,001$, (##) representa $p < 0,01$, (#) representa $p < 0,05$ quando comparados ao grupo desafiado com salina. (+++) representa $p < 0,001$, (++) representa $p < 0,01$, (+) representa $p < 0,05$ quando comparado os grupos de animais tratados com FD x FD:HP- β -CD.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que tem um papel importante na modulação da resposta imune. Conforme a figura 35, camundongos asmáticos desafiados com OVA apresentaram níveis de IL-10 superiores aos níveis dos animais controles (desafiados apenas com salina). O tratamento com as duas doses de friedelina não alterou este perfil. No entanto, o tratamento com o complexo FD:HP- β -CD nas doses de 0,1 e 10 mg/Kg aumentou significativamente os níveis de IL-10 quando comparado aos animais desafiados com OVA tratados com salina. O tratamento com veículo (etanol 1%) ou HP- β -CD não alterou os parâmetros avaliados.

Figura 35 - Efeito do tratamento com FD e FD:HP- β -CD sobre os níveis de IL-10 no LBA de camundongos asmáticos estimulados com ovalbumina.

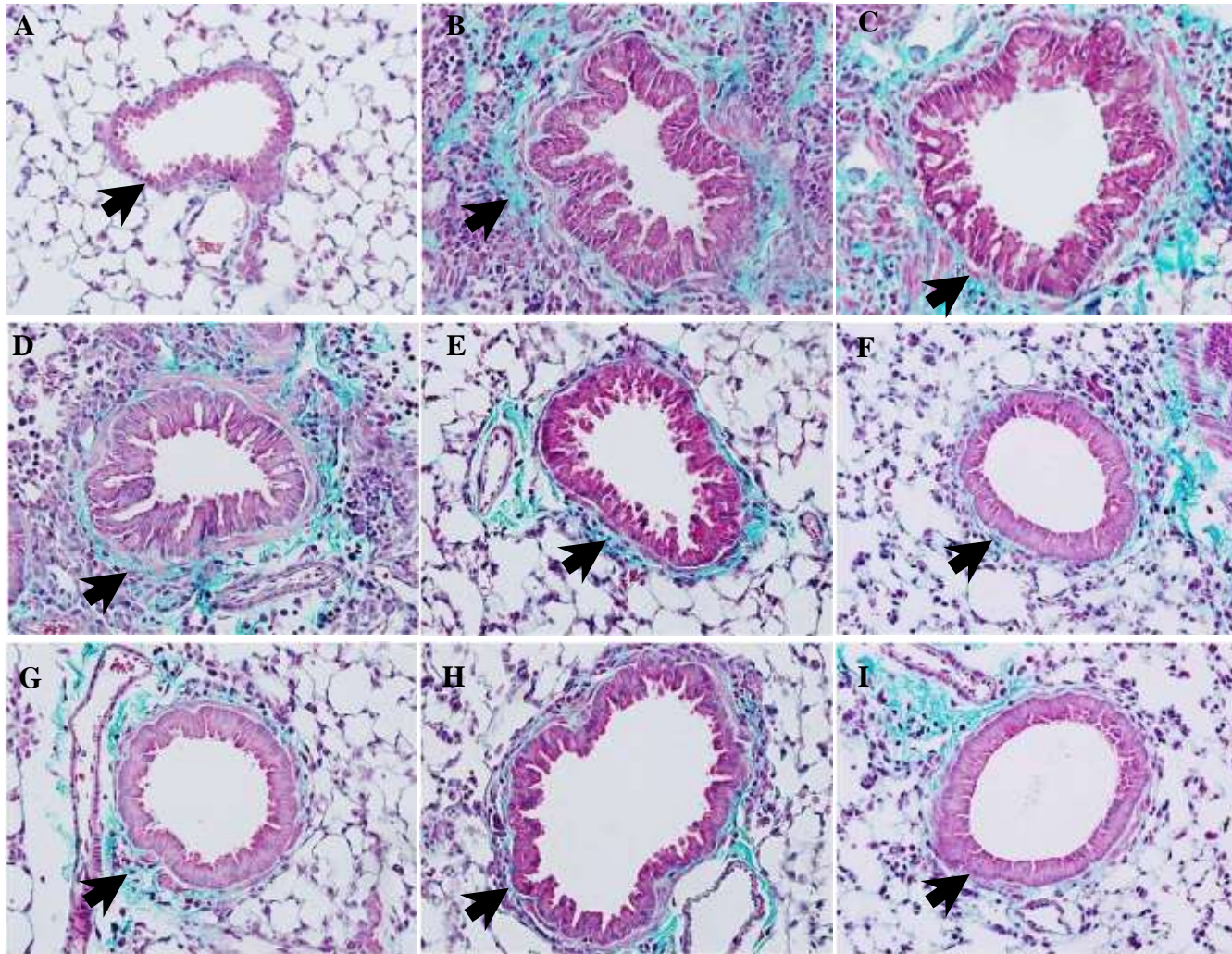


Os animais foram tratados com FD (0,1 ou 10 mg/Kg), FD:HP- β -CD (0,1 ou 10 mg/Kg), HP- β -CD (10 mg/Kg), budesonida (7,5 mg/Kg), veículo (etanol 1%) ou salina por via intranasal 60 minutos antes de cada desafio intranasal com ovalbumina. As barras representam a média \pm E.P.M. dos níveis dos mediadores pró-inflamatórios no lavado broncoalveolar de camundongos alérgicos. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguida com o teste de Newman-Keuls. (*) representa $p < 0,05$ quando comparados ao grupo desafiado com OVA e tratado com salina. (#) $p < 0,05$ quando comparados ao grupo desafiado com salina. (&) $p < 0,05$, (&&&) $P < 0,001$ quando comparados os animais que receberam FD livre x FD: HP- β -CD.

5.4.3 Efeito da FD e FD:HP- β -CD sobre a deposição de colágeno em animais asmáticos estimulados com ovalbumina.

Para saber se os efeitos observados pelo tratamento local com friedelina e seu complexo com ciclodextrina se estendem ao pulmão, avaliou-se a deposição de colágeno no pulmão. A figura 36 (p. 101) mostra a deposição de colágeno no pulmão através da coloração de Tricrômio de Gomori, que revela a presença de colágeno na coloração azul. Animais asmáticos desafiados com OVA (B) apresentam uma deposição aumentada de colágeno ao redor dos bronquíolos quando comparados aos controles estimulados com salina (A). Os animais tratados com friedelina na dose de 0,1 mg/kg (C) e 10 mg/Kg (D) apresentaram uma redução significativa da deposição de colágeno no pulmão. De maneira semelhante, o tratamento com friedelina na forma de complexo com ciclodextrina nas doses de 0,1 mg/Kg (E) e 10 mg/Kg (F) reduziu a deposição de colágeno. O tratamento com veículo (etanol 1%) ou HP- β -CD não alterou os parâmetros avaliados.

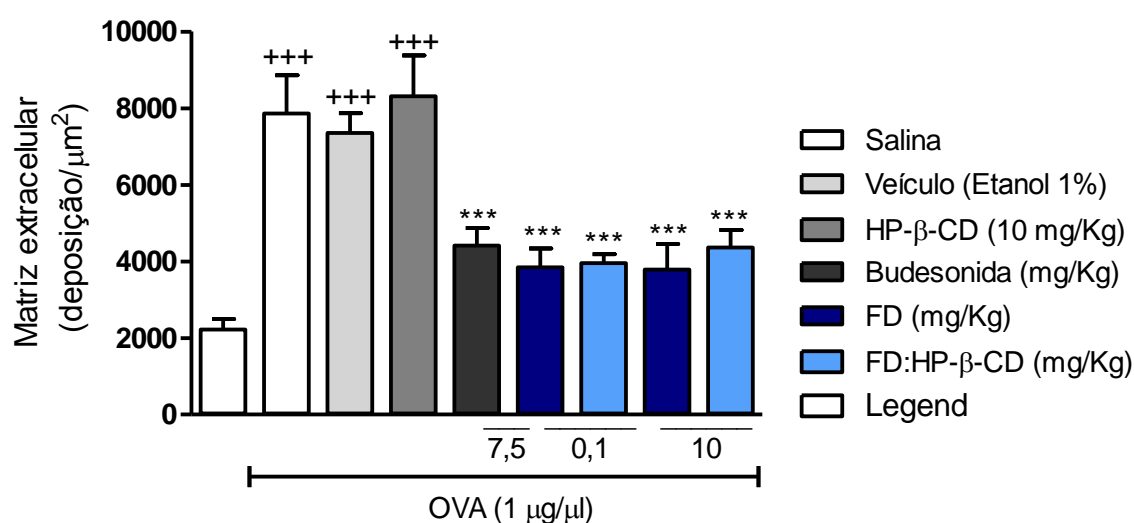
Figura 36 - Efeito do tratamento com FD e FD:HP- β -CD sobre a deposição de colágeno no pulmão de camundongos asmáticos estimulados com ovalbumina.



Cortes do tecido pulmonar de camundongos desafiados com salina (A), ovalbumina (B), tratados com veículo (C), HP- β -CD (D), budesonida (E), FD 0,1 mg/Kg (F), FD 10 mg/Kg (G), FD: HP- β -CD 0,1 mg/Kg (H) e FD: HP- β -CD 10 mg/Kg (I). Os cortes histológicos foram processados e corados com Tricômio de Gomori e as imagens, capturadas e analisadas em microscópio de luz (aumento de 400 X).

Na figura 37, observam-se as quantificações das imagens histológicas da deposição de colágeno por μm^2 . Animais desafiados com ovalbumina apresentaram um aumento na deposição de colágeno quando comparados aos animais desafiados com salina. Tanto os animais tratados com FD quanto com FD:HP- β -CD exibiram redução de cerca de 50% na deposição das fibras colágenas.

Figura 37 – Efeito do tratamento com FD e FD:HP- β -CD sobre a quantificação de matriz extracelular no pulmão de camundongos asmáticos estimulados com ovambumina.

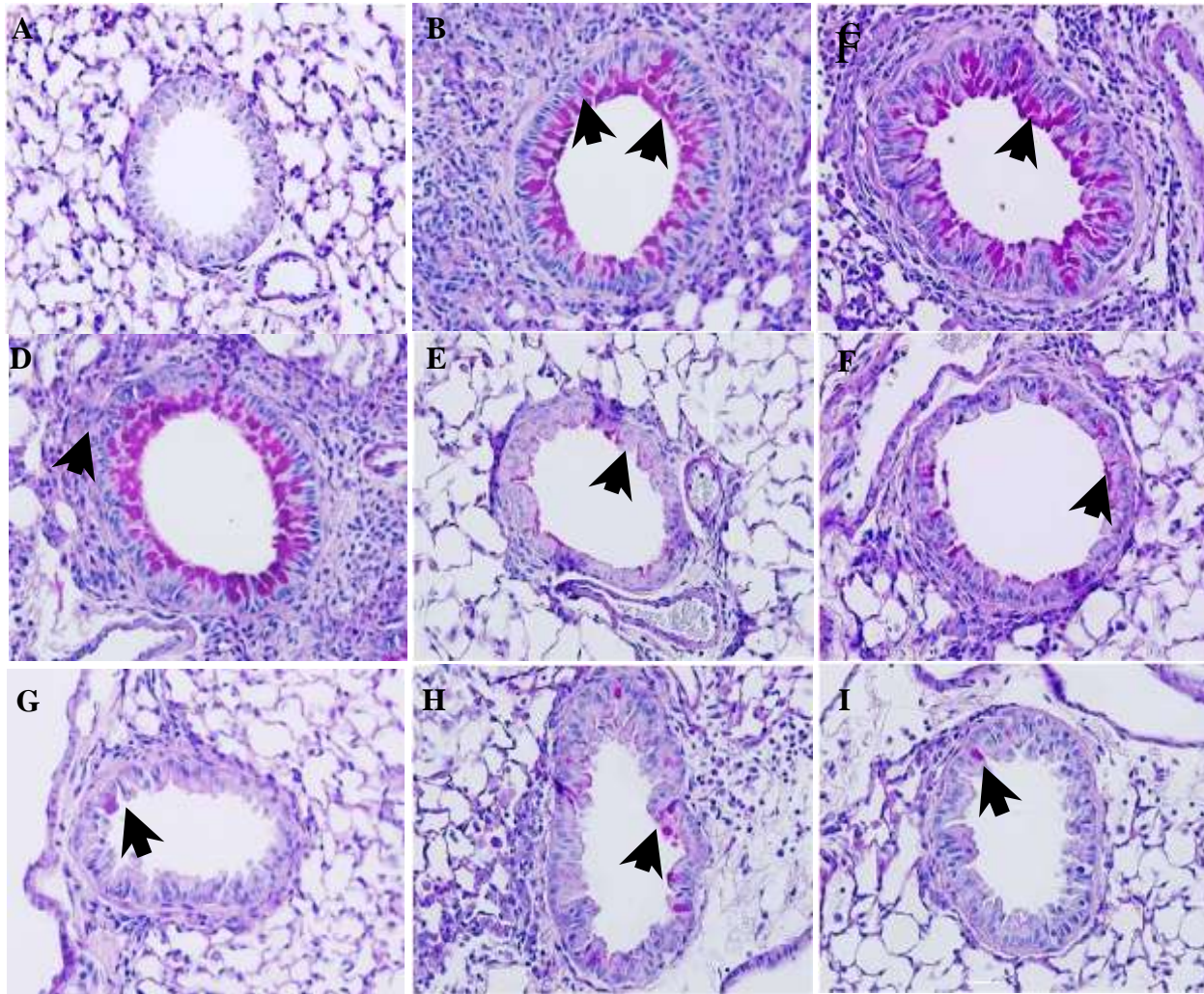


Quantificação da deposição de colágeno no tecido pulmonar dos grupos avaliados. As barras representam a média \pm E.P.M. da extensão de deposição de colágeno no tecido pulmonar. Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA seguida do pós-teste de Newman-Keuls-Student. (+++) $p < 0,001$ comparado ao grupo desafiado com salina e (***) $p < 0,001$ (comparado ao grupo tratado com salina e desafiado com ovalbumina).

5.4.4 Efeito da FD e FD:HP- β -CD sobre a produção de muco em animais asmáticos estimulados com ovalbumina

Outro parâmetro importante na patologia da asma refere-se à produção de muco. Para verificar se a friedelina e seu complexo em ciclodextrina interferem neste parâmetro, cortes de tecido do pulmão foram corados com ácido periódico de Schiff (PAS), conforme apresentado na figura 38 (p. 104). Nesta figura, pode ser observado que animais asmáticos desafiados com OVA (38 B) exibem uma intensa coloração de rosa magenta na parte interna do bronquíolo, indicando a presença de células produtoras de muco, característica ausente nos animais asmáticos estimulados com salina (Figura 38 A). O tratamento com 0,1 mg/Kg de FD (Figura 38 F) e 10 mg/Kg de FD (Figura 38 G) reduziu a produção de muco. O mesmo perfil de redução foi observado nos animais tratados com 0,1 mg/Kg de FD:HP- β -CD (Figura 38 H) e 10 mg/Kg de FD:HP- β -CD (Figura 38 I).

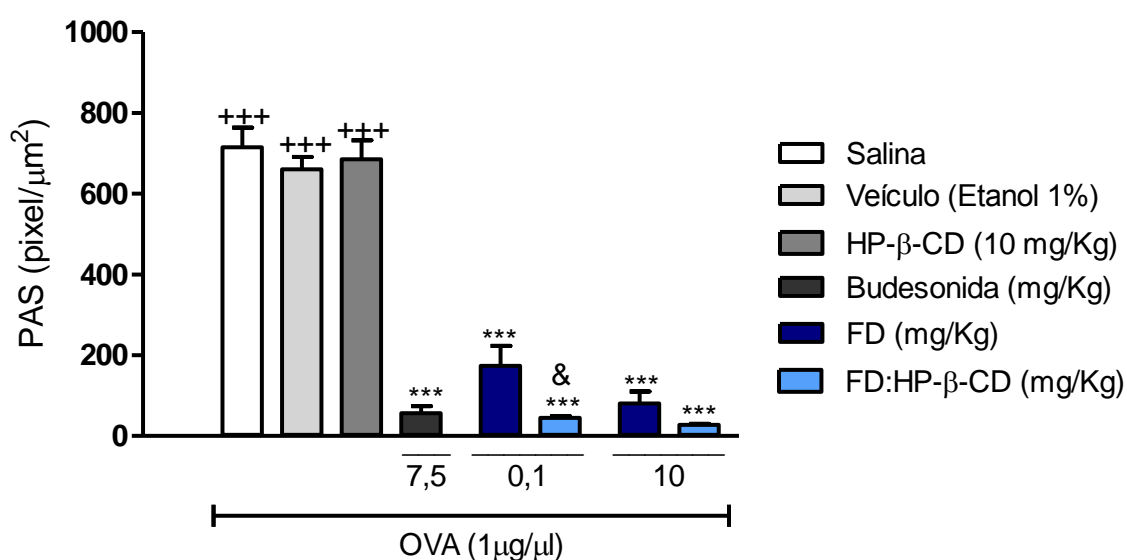
Figura 38 - Efeito do tratamento com FD e FD:HP- β -CD sobre a produção de muco no pulmão de camundongos asmáticos estimulados com ovalbumina.



Pulmão corado com corante Ácido Periódico de Schiff no aumento de 400X. Imagem do pulmão de animais do grupo salina (A), animais desafiados com OVA (B), animais alérgicos tratados com veículo (C), animais alérgicos tratados com HP- β -CD (10 mg/Kg) (D), animais alérgicos tratados com budesonina (7,5 mg/Kg) (E), animais alérgicos tratados com FD (0,1 mg/Kg) (F) e FD (10 mg/Kg) (G), animais alérgicos tratados com FD: HP- β -CD (0,1 mg/Kg) (H) e FD: HP- β -CD (10 mg/Kg) (I).

A figura 39 mostra a quantificação da produção de muco, ficando evidente o efeito da FD e do FD:HP- β -CD em promover a redução na produção de muco nas vias aéreas dos animais asmáticos desafiados com OVA. Cabe destacar, ainda, que os animais tratados com 0,1 mg/Kg de FD:HP- β -CD exibiram efeito semelhante ao encontrado com o tratamento com 10 mg/Kg de FD livre.

Figura 39 – Quantificação da produção de muco no pulmão de camundongos asmáticos estimulados com ovalbumina.

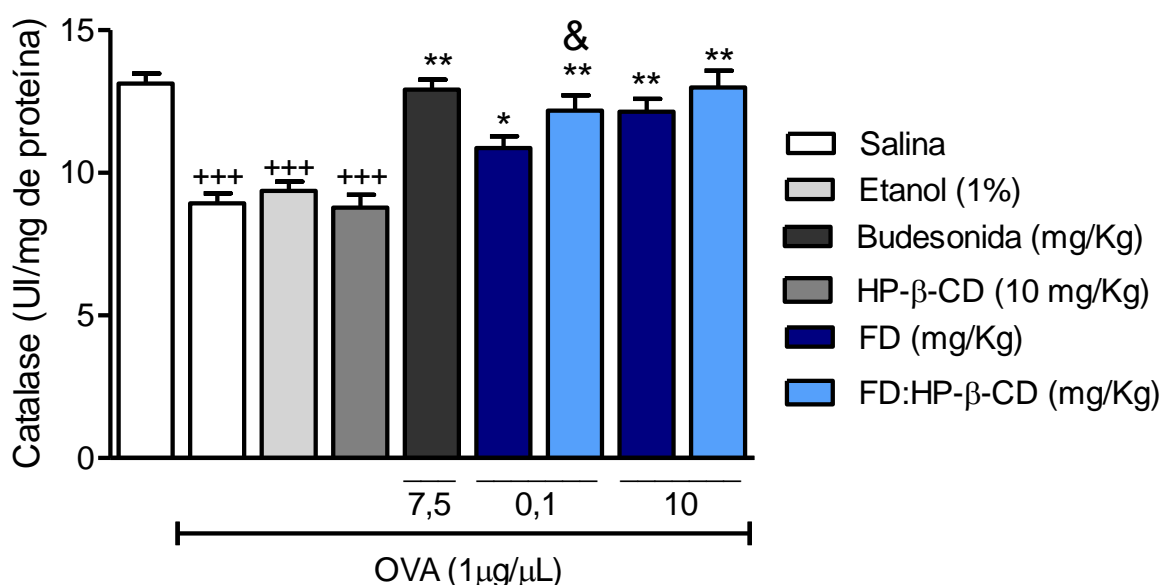


Quantificação da deposição de muco no tecido pulmonar dos grupos avaliados. As barras representam a média \pm E.P.M. da extensão de deposição de muco no tecido pulmonar. Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA seguida do pós-teste de Newman-Keuls-Student. (+++) $p < 0.001$ comparado ao grupo desafiado com salina e (***) $p < 0,001$ comparado ao grupo tratado com salina e desafiado com ovalbumina. (&) $p < 0,05$ (comparado ao grupo tratado com FD livre 0,1 e FD:HP- β -CD 0,1).

5.4.5 Efeito da FD e FD:HP- β -CD sobre a atividade da catalase no pulmão de animais asmáticos estimulados com ovalbumina.

Como apresentado na figura 40, animais asmáticos desafiados com OVA apresentaram uma redução da atividade da enzima catalase no pulmão quando comparados aos animais asmáticos desafiados com salina. O tratamento com FD reverteu de forma significativa a redução na atividade da enzima em comparação aos animais asmáticos desafiados com OVA. De maneira semelhante, o tratamento com FD:HP- β -CD nas duas doses avaliadas aumentou a atividade da enzima catalase. Além disso, os animais tratados com HP- β -CD ou com o veículo não promoveram alterações significativas na atividade da enzima.

Figura 40 – Efeito do tratamento com FD e FD:HP- β -CD na atividade da enzima catalase no pulmão de camundongos asmáticos estimulados com ovalbumina.



Os animais foram tratados com FD (0,1 e 10 mg/Kg), FD:HP- β -CD (0,1 e 10 mg/Kg), HP- β -CD (10 mg/Kg), budesonina (7,5 mg/Kg), veículo (etanol 1%) ou salina por via intranasal 60 minutos antes de cada desafio intranasal com ovalbumina. As barras representam a média \pm E.P.M. da quantificação da atividade da enzima catalase no pulmão de camundongos alérgicos. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguida com o teste de Newman-Keuls. (**) representa $p < 0,01$, (***) representa $p < 0,001$ quando comparados ao grupo desafiado com OVA e tratado com salina. (&) $p < 0,05$ quando comparados os grupos de FD 0,1 e FD: HP- β -CD 0,1. (+++) representa $p < 0,001$ quando comparado aos grupos salina ao grupo ovalbumina, etanol (1%) e HP- β -CD.

6 DISCUSSÃO

De acordo com a OMS (2010), as doenças inflamatórias crônicas são responsáveis por elevados números de internações hospitalares e alta mortalidade em todo o mundo. As enfermidades respiratórias crônicas estão entre os agravos à saúde que promovem elevados custos aos países, em especial as não transmissíveis, como as doenças pulmonares ocupacionais, asma, DPOC e hipertensão pulmonar (OMS, 2007).

Diversas substâncias isoladas de plantas medicinais têm sido largamente estudadas com o propósito de identificar novos compostos úteis para o tratamento de doenças de grande impacto no sistema de saúde (FAVARIN et al., 2013; AGRA et al., 2016). Além disso, há estimativas de que aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis no mercado tenham sido desenvolvidos direta ou indiretamente de substâncias isoladas de plantas medicinais, como o analgésico morfina, isolado da espécie *Papaver somniferum* (Papaveraceae), e a salicilina, protótipo do anti-inflamatório ácido acetil salicílico isolado da espécie *Salix alba* (Salicilaceae) (NOGUEIRA; MONTANARI; DONNICI, 2009; SHARA; STOHS, 2015).

Dentre os metabólitos presentes em diversas espécies vegetais, os terpenos destacam-se por exibir uma estrutura química bastante variada e diversos efeitos biológicos, incluindo efeitos como antiviral, antitumoral, antimicrobiano, antinociceptivo, cicatrizante e anti-inflamatório (HILL; CONNOLLY, 2013; DE OLIVEIRA et al., 2015; GUIMARÃES; QUINTANS; QUINTANS-JÚNIOR, 2013; BARRETO et al., 2014; AGRA et al., 2015; AGRA et al., 2016).

A friedelina, um triterpeno pentacíclico, está presente em diferentes espécies vegetais que possuem propriedades biológicas interessantes, como a *Clusia burlemarxii* (atividade antimicrobiana), *Azima tetraantha* Lam (atividades antinociceptiva, anti-inflamatória e antioxidante), *Maytenus ilicifolia* (antiulcerogênica) e *Clusia nemorosa* (anti-inflamatória e antinociceptiva). Além disso, tem chamado atenção devido a seus interessantes efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (RIBEIRO et al., 2011; ANTONISAMY et al., 2011; SUNIL et al., 2013; FARIAS et al., 2012; FERRO et al., 2013). No entanto, seu potencial efeito sobre a inflamação de origem alérgica ainda não está descrito na literatura.

Neste estudo, buscou-se caracterizar inicialmente os efeitos anti-inflamatórios da friedelina. Para isso, utilizou-se o modelo de edema de pata. Este modelo

experimental pode ser induzido por diversos agentes flogísticos e vem sendo usado há mais de cinco décadas para avaliar o efeito anti-inflamatório de substâncias, por permitir caracterizar a participação de células e mediadores químicos no curso da inflamação (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962; BUKHARI et al., 2016).

No processo inflamatório, ocorre a liberação de diferentes mediadores que contribuem para a formação do edema, como serotonina, bradicina e histamina, liberados mais precocemente em resposta à injúria endotelial (CRUNKHORN; MEACKOK, 1971), prostanoídes, como PGE₂, e acúmulo de células, principalmente PMN e mononucleares, em momentos mais tardios da formação do edema (POSADAS et al., 2004). Além disso, tem sido descrita a importância de citocinas (TNF- α , CXCL1 (KC) e IL-1 β) e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no curso da inflamação e na caracterização do componente doloroso durante a resposta inflamatória (CUNHA et al., 2005; WANG et al., 2004).

Os resultados obtidos neste trabalho revelaram que o tratamento dos animais por via intraperitoneal com friedelina foi capaz de prevenir a inflamação na pata deflagrada por carragenina, histamina e PGE₂, mas não por serotonina, indicando que sua ação anti-inflamatória não se mostra inespecífica (Figuras 19 (p.74) e 20 (p. 76)). Estes resultados confirmam, em parte, os achados de Antonisamy e colaboradores (2011), que descreveram a capacidade da friedelina em reduzir a formação do edema induzido por carragenina em ratos até 6h após estímulo (ANTONISAMY et al., 2011). No entanto, os autores não avaliaram o envolvimento de mediadores específicos na resposta anti-inflamatória da friedelina. Assim, esta pesquisa reforça o efeito da friedelina em reduzir o edema e destaca o seu potencial de inibir o edema provocado por histamina e PGE₂. Cabe destacar que estes mediadores inflamatórios fazem parte da fisiologia de diversas doenças, em especial as manifestações alérgicas, tal como a asma (BAGDONAS et al., 2015; SEYFIZADEH et al., 2015).

Com o propósito de avançar neste estudo, a fim de avaliar se os efeitos anti-inflamatórios da friedelina estendem-se aos eventos celulares da inflamação, decidiu-se avaliar o efeito da friedelina sobre a resposta inflamatória deflagrada por LPS no modelo de pleurisia, uma vez que já se encontra bem estabelecido o perfil celular envolvido nesta reação. O lipopolissacarídeo (LPS) é o principal constituinte da membrana celular externa de bactérias Gram-negativas, que lhes confere integridade estrutural e contribui para sua patogenicidade contra outros organismos,

e esta endotoxina é classicamente usada em diferentes modelos experimentais, *in vivo* e *in vitro*, para avaliar o efeito biológico de substâncias e caracterizar mecanismos fisiopatológicos de doenças (ALEXANDER; RIETSCHER, 2001; BANNERMAN; GOLDBLUM, 2003; BAUDIB et al., 2016; LYKHMUS et al., 2016). Neste trabalho, observou-se que o pré-tratamento com friedelina reduziu para o sítio inflamatório não apenas a mobilização de leucócitos, em especial os neutrófilos (Figura 21, p. 78), mas também os níveis de IL-6, IL-1 β , MIP-2 e CXCL1 (KC) (Figura 22, p. 80) em camundongos estimulados com LPS, o que confirma o efeito deste triterpeno em inibir os eventos celulares e a geração de mediadores químicos da inflamação. Em sintonia com estes achados, um estudo recente demonstrou, em ratos submetidos ao modelo de úlcera gástrica induzida por etanol, que a friedelina também foi capaz de reduzir o infiltrado de neutrófilos e os níveis de IL-6 e TNF- α , o que foi associado a efeitos protetores da lesão tecidual (ANTONISAMY et al., 2015).

Sabe-se que o processo de migração de leucócitos em direção ao sítio inflamatório envolve uma orquestrada cascata de eventos que culminam na ativação leucocitária, induzindo rolamento, adesão e, por fim, a transmigração celular (LEY et al., 2007). Logo, considerando os efeitos da friedelina em inibir o acúmulo de leucócitos no sítio da inflamação, decidiu-se avaliar o efeito da friedelina na motilidade celular, investigando seu efeito sobre a adesão e a quimiotaxia de neutrófilos humanos. Assim, utilizando um modelo de cultura de células, verificou-se que a friedelina reduziu a adesão de neutrófilos às células endoteliais ativadas por TNF- α , sendo capaz de suprimir a quimiotaxia de neutrófilos em câmara de Boyden sob estímulo de fMLP (Figuras 23 (p. 81) e 24 (p. 82), respectivamente). Cabe destacar, ainda, que tais efeitos inibidores causados pela friedelina não se mostraram relacionados a uma redução na viabilidade das células, o que descarta um potencial efeito citotóxico deste triterpeno (Figura 26, p. 85). Portanto, este conjunto de resultados revela um efeito direto da friedelina sobre neutrófilos.

De posse destes resultados, avaliou-se se estas ações diretas sobre neutrófilos *in vitro* teriam repercussões no organismo, utilizando-se a metodologia de microscopia intravital para avaliar o efeito da friedelina na mobilização de leucócitos em ratos estimulados com LPS.

A microscopia intravital mostra-se como uma ferramenta relevante para caracterizar a interação de leucócitos com o endotélio no ambiente *in vivo* (BANNERMAN; GOLDBLUM, 2003). A interação de células com o leito vascular é

essencial no desenvolvimento da fisiopatologia de várias doenças, incluindo sepse, alergias e câncer (SINGH et al., 2014; ENTENBERG et al., 2015). Neste estudo, observou-se que a friedelina interferiu tanto com a adesão quanto com o rolamento de leucócitos na microvasculatura estimulada por LPS (Figura 25, p. 84). Portanto, os efeitos da friedelina *in vitro* sobre a motilidade de neutrófilos mostram-se relevantes no organismo para prevenir a mobilização dos leucócitos para o sítio inflamatório. Com isso, observa-se, pela primeira vez, que a friedelina mostra-se capaz de interferir com etapas cruciais do recrutamento de neutrófilos, revelando um efeito direto deste triterpeno sobre estas células. Merece ser ressaltado que estudos estão sendo conduzidos para investigar os efeitos da friedelina sobre a expressão de moléculas de adesão em neutrófilos.

De maneira interessante, outros estudos revelam que triterpenos mostram-se capazes de afetar o recrutamento de células. Neste aspecto, Zhang e colaboradores (2014) observaram que o terpeno Ginsenosida Rb1 reduziu a expressão de VE-caderina e ZO-1, moléculas importantes para a migração transcelular, por inibir a translocação de NF- κ B (ZHANG et al., 2014). O notoginsenoside, um terpeno glicosilado, reduziu os níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) e a perda de albumina em microvasos do mesentério, por prevenirem a ativação do fator NF- κ B (LI et al., 2013). Estes dados revelam que metabólitos da classe dos terpenos atuam em mediadores importantes para que ocorra a migração celular e a manutenção da resposta inflamatória, além de reduzir alterações na permeabilidade do endotélio.

Porém, mesmo que estes resultados revelem o potencial farmacológico da friedelina, observações realizadas durante as etapas experimentais, assim como dados prévios da literatura, constataram a baixa solubilidade da friedelina em ambiente aquoso. Assim, tal característica pode ser responsável por limitar seus efeitos terapêuticos por comprometer sua biodisponibilidade. Logo, com propósito de propiciar uma melhor disponibilidade deste triterpeno no organismo, decidiu-se incorporar a friedelina no sistema de carreamento de fármacos bastante utilizado pela indústria farmacêutica na atualidade, a hidroxipropil- β -ciclodextrina.

Para que se tenha uma ideia da importância deste sistema nanométrico de carreamento de fármacos para a otimização de princípios ativos, e com o intuito de “coordenar, planejar e executar políticas e diretrizes de governança regulatória das nanotecnologias”, foi instituído o Comitê Interno de Nanotecnologia (CIN), através da

Portaria nº 1.358, de 20 de agosto de 2014 (BRASIL, 2014). No entanto, apesar da existência recente do CIN, no Brasil ainda não há uma normativa efetiva que regulamente o desenvolvimento e a aprovação de nanomedicamentos. Mesmo assim, 16 medicamentos contendo formulações consideradas nanotecnológicas já foram liberados para comercialização, compreendendo 13 princípios ativos diferentes, a saber: anfotericina B, cloridrato de doxorubicina, citrato de daunorubicina, acetato de leuprolida, pamoato de triptorrelina, piroxicam, nimesulida, sirolimus, aprepitante MK869, fenofibrato, acetato de megastrol, paclitaxel e estradiol (SANT'ANNA; FERREIRA; ALENCAR, 2013; BATISTA; PEPE, 2014).

Neste contexto, este trabalho utilizou a capacidade da ciclodextrina, moléculas de tamanho médio entre 1,37 e 1,69 nm, em carrear a friedelina como uma molécula hóspede. Aqui, foi empregado o método de cossolubilização, onde uma solução de friedelina foi preparada separadamente da solução de hidroxipropil- β -ciclodextrina e em seguida ambas foram misturadas e deixadas em agitação para proporcionar a formação do complexo.

Através de análise no UV-Vis, observa-se que as alterações no perfil de absorvância da FD:HP- β -CD (1:2) são sugestivas de interações decorrentes entre a molécula de FD com a HP- β -CD (Figura 27, p. 87). Através desta mesma análise, foi possível calcular o valor aproximado das constantes de formação e dissociação do complexo (Figura 28, p. 89). Valores da constante de formação são usados para prever a força de interação da molécula hóspede com a cavidade da ciclodextrina. Kfoury e colaboradores (2014) mostraram a efetiva complexação do trans-anetol, um flavorizante de baixa solubilidade em água, a moléculas de ciclodextrina. Os autores testaram a eficiência da complexação com diversos tipos de ciclodextrina e verificaram que a constante de formação (K_F) variou de 200 a 10000 mol L⁻¹, apresentando maiores constantes de formação nas ciclodextrinas sintéticas (HP- β -CD e RAMEB) em comparação às ciclodextrinas naturais, α e β -CD (KFOURY et al., 2014). Neste trabalho, os valores da constante de formação para os dois comprimentos de onda avaliados foram de $1,44 \times 10^5$ e $2,39 \times 10^5$ mol.L⁻¹, em 228 nm e 278 nm, respectivamente, sugerindo a formação de um complexo estável.

De maneira semelhante a este estudo, Loftsson e colaboradores (2007) testaram a eficiência da complexação de 42 substâncias frente a diferentes tipos de CD naturais e sintéticas. Os autores observaram que a maioria das moléculas

apresentaram boa eficiência de complexação e solubilidade nas diferentes CD modificadas, em especial a HP- β -CD e RM- β -CD, com variadas proporções molares de 1:1 até 1:250. Apesar da proporção de fármaco/ciclodextrina (F/CD) mais usada ser a 1:1, tem sido demonstrado que em solução pode haver diferentes proporções de F/CD em equilíbrio (LOFTSSON; HREINSDÓTTIR; MÁSSON, 2007).

Além disso, diferentes métodos de caracterização físico-químicos podem ser utilizados para determinar a formação de complexos de inclusão entre moléculas hóspedes e ciclodextrinas. Dentre estes, as técnicas de espectroscopia de infravermelho e termogravimetria são amplamente utilizadas (AIGNER et al., 2012; GÓMEZ-GALVÁN et al., 2016). A análise de infravermelho permite identificar os radicais presentes na estrutura da molécula. As interações decorrentes da incorporação da molécula hóspede à cavidade de CD promovem alterações no espectro do complexo em comparação ao espectro da substância pura e da CD utilizada (AL-MARZOUQUI et al., 2009). Quando ocorre a inclusão da molécula hóspede na cavidade de CD, observam-se alterações e deslocamentos na intensidade das bandas e nos comprimentos de onda. Tais alterações ocorrem devido ao aumento de forças intermoleculares, como ligações de hidrogênio, sugerindo a formação de complexos (ARIAS; MOYANO; GINÉS, 1997; CERCHIARA et al., 2003).

Neste estudo, as análises nos espectros de infravermelho revelaram que o complexo FD:HP- β -CD apresentou alterações significativas nas regiões de 700-1250 nm e na região de 1700 nm, modificações típicas de formação de complexo quando foram feitas as comparações com as moléculas isoladas (Figura 29, p. 90). De forma semelhante a este estudo, Gavini e colaboradores (2010) utilizaram a HP- β -CD para carrear o diclofenaco de sódio. Entre as técnicas de caracterização para formação do complexo, foram utilizadas análises de FT-IR, o que reforçou a ideia de que as CDs são efetivas no carregamento de fármacos, que incrementam os efeitos destas moléculas e ajudam a reduzir sua toxicidade (GAVINI et al., 2010). Em outro estudo, Liu e colaboradores (2014) mostraram que o triterpeno pentacíclico pedunculósido foi capaz de formar complexo com β -CD e caracterizado através de técnicas espectroscópicas (UV-Vis e FT-IR). Os autores observaram que a complexação deste triterpeno melhorou seu efeito antiedematogênico em camundongos, bem como reduziu a toxicidade ao avaliar parâmetros hematológicos (LIU et al., 2014). Merece ser destacado que apesar das técnicas utilizadas neste estudo permitirem

propor a caracterização do complexo FD:HP- β -CD, amostras estão sendo preparadas para futuras análises, utilizando ressonância magnética nuclear (RMN).

Uma vez confirmada a formação do complexo de inclusão entre friedelina e ciclodextrina, decidiu-se verificar se a formação deste complexo seria capaz de interferir com a atividade biológica já evidenciada anteriormente para a friedelina.

Em uma primeira análise, verificou-se que o efeito antiedematogênico da friedelina no modelo de edema de pata induzido por carragenina foi potencializado quando os animais foram tratados com friedelina carregada com HP- β -CD (Figura 30, p. 91). Com isso, demonstrou-se que não apenas a friedelina mostra-se capaz de formar complexo com ciclodextrina, mas também que o complexo incrementa o potencial terapêutico da friedelina. Adicionalmente, constatou-se que o complexo formado não se mostrou capaz de induzir efeitos citotóxicos em macrófagos da linhagem J774A.1 (Figura 31, p. 92), sugerindo segurança em seu uso.

Sabe-se que as doenças alérgicas apresentam grande impacto social, devido ao número crescente de novos casos, elevado número de pacientes não responsivos à terapêutica atual disponível e crescentes custos ao sistema de saúde (EPA, 2015). No Brasil, no último ano, os custos do SUS com doenças respiratórias foram de R\$ 1.341.962.902,06, sendo registrados 1.217.767 internações e 102.071 óbitos entre os meses de junho de 2015 e junho de 2016 (DataSUS, 2016). Estes números revelam a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos que sejam eficazes para o tratamento de pacientes com asma, em especial os que apresentam baixa responsividade aos medicamentos disponíveis.

Portanto, tendo por base o potencial anti-inflamatório da friedelina e a inexistência de dados na literatura que mostrem seu efeito em inflamações alérgicas, decidiu-se investigar se a friedelina livre e seu complexo em ciclodextrina seriam capazes de interferir com a resposta inflamatória alérgica, utilizando, para isso, o modelo de asma experimental induzida por ovalbumina em camundongos.

Os resultados obtidos neste trabalho revelaram que os animais tratados com FD ou FD:HP- β -CD por via intranasal apresentaram uma redução significativa do infiltrado leucocitário obtido no LBA dos animais desafiados com ovalbumina e houve uma atenuação relevante do infiltrado eosinofílico (Figura 33, p. 96). Sabe-se que a presença de eosinófilos nas vias aéreas é uma característica presente em pacientes com asma (GREEN; BRIGHTLING; McKENNA, 2002) e que a manutenção deste tipo celular nas vias aéreas vem sendo descrita como uma

característica presente em pacientes refratários à terapia com corticoides e com uma maior incidência de internações hospitalares (MOORE et al., 2010; PATTERSON; BORISH; KENNEDY, 2015). Logo, os resultados obtidos neste estudo revelaram a friedelina como uma promissora molécula útil para inibição do recrutamento de eosinófilos na inflamação alérgica.

A hiperreatividade das vias aéreas é um fator marcante na asma e está associada com a produção de mediadores pró-inflamatórios, hiper-secreção de muco e espessamento da parede das vias aéreas (WADSWORTH; YANG; DORSCHIED, 2012). Animais previamente sensibilizados e desafiados com ovalbumina exibem aumento na produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, um aumento na produção de muco por células caliciformes, bem como maior deposição de colágeno e atividade de MMP-9, que corroboram com maior infiltrado de células no LBA e pulmão e a hiper-reatividade das vias aéreas (SERRA et al., 2012). Os animais desafiados com ovalbumina apresentaram um aumento significativo da resistência e elastância quando estimulados com metacolina (broncoconstrictor colinérgico), alterações no parênquima pulmonar, forte infiltrado celular no lavado broncoalveolar, predominantemente eosinofílico e aumento nos níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Os dados encontrados neste trabalho com o modelo de asma experimental em camundongos foram semelhantes aos descritos na literatura em modelo murino de inflamação alérgica induzida por ovalbumina (FERREIRA et al., 2016).

Inúmeras citocinas e quimiocinas estão relacionadas à fisiopatologia da asma, incluindo a IL-13, que contribui para a hiperreatividade e eleva a produção de metaloproteinases e hipersecreção de muco (WADSWORTH; YANG; DORSCHIED, 2012; ZEKI et al., 2016; KAU; KORENBLAT, 2014), e a IL-4 e a IL-5, que participam na produção específica de IgE, mobilização de células e indução de metaplasia de células caliciformes (ROBINSON, 2009; KAU; KORENBLAT, 2014). Outras citocinas importantes na resposta inflamatória são a CCL7 (TARC) e a IL-17, que exercem funções na migração de células Th2 e Treg para o pulmão e têm ação sobre neutrófilos e perfil de resposta celular Th17, respectivamente (PALOMINO; MARTIN, 2015; PARUKELAR; DIAMANT; HANANIA, 2015). Estudos prévios revelaram que a permanência dos neutrófilos nas vias aéreas contribui para a obstrução do fluxo de ar (ROBINSON, 2009). Assim, apesar de necessitar de mais informações sobre o papel da IL-17 e o perfil Th17 na asma, a inibição deste mediador pode estar

relacionada a efeitos benéficos de substâncias com potencial anti-inflamatório e redução do agravamento dos sintomas da asma.

Neste trabalho, identificou-se, ainda, que além do tratamento com FD reduzir os níveis de IL-17, os níveis de IL-13 foram apenas inibidos pelo tratamento com o complexo FD:HP- β -CD, mostrando que o efeito biológico da FD foi beneficiado pela sua complexação com HP- β -CD (Figura 34, p. 98). Diversos estudos foram realizados avaliando o potencial de substâncias que bloqueiam a ação de IL-13 em seus receptores como ferramenta farmacológica no tratamento da asma. O bloqueio destes receptores por uma substância ainda em desenvolvimento clínico, o AMG-317 (anticorpo monoclonal humano que bloqueia IL-4R α), limita a ação de IL-4 e IL-13 e também reduz a liberação de outros mediadores, como CCL17 (TARC) e CCL26 (eotaxina-3) (Figura 29, p. 90) (OH; GEBA; MOLFINO, 2010).

Durante a realização deste estudo, constatou-se que a friedelina mostrou-se capaz de reduzir os níveis de eotaxina-1, o que certamente contribuiu para a redução do número de eosinófilos no LBA (Figuras 34 (p. 98) e 33 (p. 96), respectivamente). A eotaxina-1 (CCL11) mostra-se como um importante quimioatraente de eosinófilos, através da ligação ao receptor CCR3 na superfície dos leucócitos, que juntamente com a ação de IL-5 são responsáveis pela diferenciação, maturação e recrutamento de eosinófilos. A permanência e a ativação de eosinófilos no local da inflamação promovem lesão tecidual, devido à liberação de produtos contidos dentro desta célula, como a proteína catiônica eosinofílica, peroxidase de eosinófilos e leucotrienos, que contribuem para a hipersecreção de muco e hiper-responsividade brônquica (PEASE; WILLIAMS, 2001; CHUNG, 2015).

O tratamento com FD e seu complexo em ciclodextrina em animais asmáticos também foi capaz de reduzir os níveis de KC e MIP-1 α (Figura 34, p. 98). Desta forma, observa-se que o tratamento intranasal com FD complexada promoveu um incremento da redução do influxo de leucócitos totais e dos mediadores pró-inflamatórios avaliados no lavado broncoalveolar quando comparado aos animais tratados com FD livre.

Além da produção de mediadores pró-inflamatórios, citocinas pró-resolutivas ou vias anti-inflamatórias são ativadas durante a inflamação. A IL-10 mostra-se como um mediador amplamente avaliado no contexto de diversas desordens inflamatórias, devido à sua capacidade de contribuir com a redução da resposta

imune inata e adaptativa em infecções e em doenças autoimunes (OLSEN et al., 2015).

Estudos em pacientes com asma identificaram a presença de células T regulatórias (T reg), marcadas com CD4⁺Foxp3⁺ no sangue periférico de alguns pacientes em tratamento com corticosteroides, bem como o aumento dos níveis de IL-10 (KARAGIANNIDIS et al., 2004). No entanto, em um estudo recente, foi avaliada a presença de células T reg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) no lavado broncoalveolar, pulmão, timo e linfonodos de camundongos desafiados com ovalbumina e verificou-se que o tratamento com dexametasona (via intraperitoneal) e budesonida (inalatório) promoveu uma redução na população de células T reg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) nos locais avaliados. Além disso, não promoveu aumento nos níveis de IL-10 no pulmão de camundongos desafiados com HDM (extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus*) (OLSEN et al., 2015). Neste estudo, porém, detectou-se que o desafio com ovalbumina promoveu um discreto aumento nos níveis de IL-10 quando comparado aos animais controles (Figura 35, p. 99). E o tratamento com FD:HP-β-CD, mas não a FD livre, promoveu um aumento significativo nos níveis dessa citocina no lavado broncoalveolar de animais alérgicos. Estes achados estão de acordo com dados recentes na literatura, que mostraram que o tratamento com FD promoveu um aumento nos níveis de IL-10 após a indução de úlcera gástrica por etanol em ratos (ANTONISAMY et al., 2015). Porém, mais ensaios são necessários para explicar como a friedelina pode estar aumentando/ativando mecanismos resolutivos, além de diminuir mediadores pró-inflamatórios.

Verificou-se ainda que o tratamento intranasal com FD foi capaz de reduzir a resistência e elastância das vias aéreas que foram potencializadas pela administração intranasal de FD complexada com HP-β-CD (Figura 32, p. 94). Além disso, houve uma redução significativa da deposição de colágeno no tecido pulmonar, sugerindo uma menor fibrose peribrônquica. Em seguida, ao avaliar a produção de muco por células caliciformes, observa-se, em cortes histológicos, que a FD complexada melhorou os efeitos da FD livre, ao provocar uma redução significativa da deposição de muco na dose de 0,1 mg/Kg de complexo de maneira semelhante à dose de 10 mg/Kg de FD livre (uma redução na dose administrada de mais de 100 x).

Análises histopatológicas do pulmão revelaram que animais tratados com FD e FD:HP- β -CD exibiram um menor infiltrado celular e melhor organização do parênquima pulmonar quando comparados aos animais asmáticos sem tratamento (Figura 37, p. 101). Estes dados sugerem que a complexação da FD contribuiu para melhorar o efeito da FD livre em reduzir as alterações na mecânica pulmonar induzida pelo desafio com ovalbumina. Sugere-se que a inibição da resistência, elastância e alterações no parênquima pulmonar, bem como a redução na secreção de muco (Figura 38, p. 104) e influxo de células inflamatórias podem ter sido mediadas, em parte, pela redução dos níveis dos mediadores pró-inflamatórios avaliados e pelo aumento nos níveis de IL-10. Em recente publicação, foi demonstrado o efeito do esculentoside A, uma molécula da classe dos triterpenos, em reduzir a inflamação pulmonar alérgica, reduzindo a liberação dos níveis de IL-4, IL-5, IL-13 e infiltrado neutrofílico no lavado broncoalveolar, bem como a expressão do RNA mensageiro do quimioatraente eotaxina e das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 no pulmão de camundongos desafiados com ovalbumina, sendo uma molécula presente em planta medicinal com potencial anti-inflamatório interessante (CI et al., 2015).

Além das citocinas, um desequilíbrio no metabolismo oxidativo nas células que compõem as vias aéreas pode contribuir para a cronicidade de doenças respiratórias, como DPOC e asma. Assim, substâncias que contribuam com a ativação de mecanismos antioxidantes podem promover uma aceleração da resolução da resposta inflamatória. Dentre os sistemas antioxidantes que as células possuem destaca-se o sistema enzimático, onde a produção de enzimas para catalisar reações que levam à formação de moléculas não reativas e sua eliminação do organismo. No campo das enzimas, a catalase tem um papel importante, sendo responsável pela formação de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, diminuindo os níveis de espécies reativas. Assim, ao avaliar sua atividade no pulmão dos camundongos desafiados com ovalbumina, observa-se que o tratamento com friedelina promove um aumento na atividade desta importante enzima antioxidante, contribuindo, assim, para a redução dos danos observados com o tratamento da friedelina no parênquima pulmonar destes animais (Figura 40, p. 106).

Vale mencionar que os animais tratados apenas com ciclodextrina ou veículo não apresentaram qualquer redução em todos os parâmetros avaliados, e a budesonida, um corticoide inalatório padrão, provocou redução dos níveis de

resistência e elastância, bem como melhora das alterações do parênquima pulmonar e redução dos níveis dos mediadores avaliados e influxo de leucócitos no lavado broncoalveolar, de maneira semelhante aos dados encontrados em outros trabalhos na literatura utilizando o mesmo modelo experimental (SERRA et al., 2012; BARRETO et al., 2015).

Por fim, pode-se concluir que os efeitos evidenciados pelo tratamento com friedelina livre foram potencializados pelo carreamento da friedelina com hidroxipropil-beta-ciclodextrina nos modelos de inflamação utilizados e que tais efeitos são fundamentais para que ocorra a redução dos sintomas da asma, podendo ser uma estratégia interessante para o tratamento de inflamações pulmonares. No entanto, mais esclarecimentos sobre os mecanismos celulares e moleculares da ação farmacológica deste triterpeno precisam ser melhor elucidados.

7 CONCLUSÃO

Em conjunto, este estudo permite as seguintes conclusões:

- A friedelina reduz a chegada de neutrófilos no sítio inflamatório, por interferir com a adesão e a quimiotaxia de neutrófilos, bem como a liberação de quimioatraentes no sítio inflamatório;
- O carreamento da friedelina com hidroxipropil- β -ciclodextrina favorece a formação de um complexo estável e que pode ser utilizado em sistemas biológicos *in vitro* e *in vivo*;
- A friedelina reduz as alterações de resistência e elastância pulmonares, bem como o influxo de leucócitos nos pulmões de camundongos desafiados com ovoalbumina, através da supressão de citocinas e quimiocinas importantes no estabelecimento das alterações nas vias aéreas;
- A formação do complexo entre friedelina e hidroxipropil- β -ciclodextrina incrementou os efeitos da friedelina ao potencializar seu efeito sobre IL-13, IL-4 e MIP1- α , sugerindo que tal inibição pode contribuir para os efeitos observados sobre a hiperreatividade brônquica e a secreção de muco.

Desta forma, pode-se concluir que o carreamento da friedelina com hidroxipropil-beta-ciclodextrina incrementa os efeitos anti-inflamatórios da friedelina, por atenuar a inflamação aguda na asma.

REFERÊNCIAS

- ADER, P.; WESSMANN, A.; WOLFFRAM, S. Bioavailability and metabolism of the flavonol Quercetin in the pig. **Free Radical Biology & Medicine**, 28(7), 1056–1067, 2000.
- AGRA, L. C.; FERRO, J. N. S.; BARBOSA, F. T.; BARRETO, E. Triterpenes with healing activity: a systematic review. **Journal of Dermatological Treatment**, 26(5), 465–470, 2015.
- AGRA, L. C.; LINS, M. P.; MARQUES, P. S.; SMANIOTTO, S.; MELO, C. B.; LAGENTE, V.; BARRETO, E. Uvaol attenuates pleuritis and eosinophilic inflammation in ovalbumin-induced allergy in mice. **European Journal of Pharmacology**, 780 (6), 232-242, 2016.
- AIGNER, Z.; BERKESI, O.; FARKAS, G.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P. DSC, X-ray and FTIR studies of a gemfibrozil/dimethyl- β -cyclodextrin inclusion complex produced by co-grinding. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 57(1), 62–67, 2012.
- AKHTAR, N.; KHAN, R. A. Liposomal systems as viable drug delivery technology for skin cancer sites with an outlook on lipid-based delivery vehicles and diagnostic imaging inputs for skin conditions. **Progress in Lipid Research**. Accepted Manuscript, <http://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.08.005>, 2016.
- AL-MARZOUQI, A. H.; ELWY, H. M.; SHEHADI, I.; ADEM, A. Physicochemical properties of antifungal drug-cyclodextrin complexes prepared by supercritical carbon dioxide and by conventional techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 49(2), 227–233, 2009.
- ALEXANDER, C.; RIETSCHEL, E. T. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. **Journal Endotoxin Research**, 7(3), 167-202, 2001.
- ALQAHTANI, A.; HAMID, K.; KAM, A.; WONG, K. H.; ABDCELHAK, Z.; RAZMOVSKI-NAUMOVSKI, V.; CHAN, K.; LI, K. M.; GROUNDWATER, P. W.; LI, G. Q. The pentacyclic triterpenoids in herbal Medicines and their pharmacological activities in diabetes and diabetic complications. **Current Medicinal Chemistry**, 20, 908-931, 2013.
- AMENDOEIRA, F. C.; FRUTUOSO, V. S.; ZANON, C.; CHEDIER, L. M.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C.; BANDEIRA-MELO, C.; BOZZA, P. T.;

CASTRO-FARIA-NETO, H. C. Anti-inflammatory Activity in the Aqueous Crude Extract of the Leaves of *Nidularum procerum*: A Bromeliaceae from the Brazilian Coastal Rain Forest. **Biology Pharmacology Bull.** 28(6), 1010-1015, 2005.

AMORIM, J. L.; SIMAS, D. L. R.; PINHEIRO, M. M. G.; MORENO, D. S. A.; ALVIANO, C. S.; SILVA, A. J. R.; FERNANDES, P. D. Anti-Inflammatory Properties and Chemical Characterization of the Essential Oils of Four Citrus Species. **Plos One**, 11(4), e0153643, 2016.

ANDERSON, C. A.; SOLARI, R.; PEASE, J. E. Biased agonism at chemokine receptors: obstacles or opportunities for drug discovery? **Journal of Leukocyte Biology**, 99 (June), 1–9, 2015.

ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K.; STEWART, C. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**. 109 (4), 1427-1257, 1995.

ANDRADE, M. R.; ALMEIDA, E. X.; CONSERVA, L. M. Alkyl chromone and other compounds from *Clusia nemorosa*. **Phytochemistry**, 47(7), 1431–1433, 1998.

ANTONISAMY, P.; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* Lam. in mouse and rat models. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 63(8), 1070–1077, 2011.

ANTONISAMY, P.; DURAI PANDIYAN, V.; ARAVITHAN, A.; AL-DHABI, N. A.; IGNACIMUTHU, S.; CHOI, K. C.; KIM, J. H. Protective effects of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* Lam. against ethanol-induced gastric ulcer in rats and possible underlying mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, 750 (3), 167–175, 2015.

ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, 43(1), 385–406, 2012.

ARAÚJO, C. V.; ESTADO, V.; TIBIRIÇÁ, E.; BOZZA, P. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; SILVA, A. R. PPAR gamma activation protects the brain against microvascular dysfunction in sepsis. **Microvascular Research**, 84(2), 218-221, 2012.

ARIAS, M. J.; MOYANO, J. R.; GINE, J. M. Investigation of the triamterene - β -cyclodextrin system prepared by co-grinding. **International Journal of**

Pharmaceutics, 153, 181–189, 1997.

BAGDONAS, E.; RAUDONIUTE, J.; BRUZAUSKAITE, I.; ALDONYTE, R. Novel aspects of pathogenesis and regeneration mechanisms in COPD. **International Journal of COPD**, 10, 995-1013, 2015.

BANNERMAN, D.D.; GOLDBLUM, S. E. Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, 284(6), L899–L914, 2003.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Editora UFV, 2007.

BARNES, P. J.; ADCOCK, I. M. How Do Corticosteroids Work in Asthma? **Annals of Internal Medicine**, 139(5 I), 359–370, 2003.

BARNES, P. J. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 120(2-3), 76–85, 2010.

BARNES, P. J. Theophylline. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 188(8), 901–906, 2013a.

BARNES, P. J. New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, 12(7), 543–559, 2013b.

BARNES, P. J. Therapeutic approaches to asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndromes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 136(3), 531–545, 2015.

BARNES, P. J.; BONINI, S.; SEEGER, W.; BELVISI, M. G.; WARD, B.; HOLMES, A. Barriers to new drug development in respiratory disease. **European Respiratory Journal**, 45(5), 1197–1207, 2015.

BARNES, P. J. Kinases as Novel Therapeutic Targets in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Pharmacological Reviews**, 68(3), 788–815, 2016.

BARRETO, E.; SERRA, M. F.; SANTOS, R. V.; SANTOS, C. E. A.; HICKMANN, J.; COTIAS, A. C.; PÃO, C. R. R.; TRINDADE, S. G.; SCHIMIDT, V.; GIACOMELLI, C.;

CARVALHO, V. F.; SILVA, P. M. R.; CORDEIRO, R. S. B.; MARTINS, M. A. Local administration of gold nanoparticles prevents pivotal pathological changes in murine models of atopic asthma. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, 11(6), 1038–1050, 2015.

BARRETO, R. S. S.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; ARAÚJO, A. S. A.; ALMEIDA, J. R. G. S.; SANTOS, M. R. V.; BARRETO, A. S.; DESANTANA, J. M.; SIQUEIRA-LIMA, P. S.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. A systematic review of the wound-healing effects of monoterpenes and iridoid derivatives. **Molecules**, 19(1), 846–862, 2014.

BARROS, B. S.; SILVA, J. P.; FERRO, J. N.; Agra, I. K. R.; BRITO, F.A.; ALBUQUERQUE, E. D.; CAETANO, L.C; BARRETO, E. Methanol extract from mycelium of endophytic fungus *Rhizoctonia sp.* induces antinociceptive and anti-inflammatory activities in mice. **Journal of Natural Medicines**, 65(3-4), 526–531, 2011.

BATISTA, A. D. J. S.; PEPE, V. L. E. Os desafios da nanotecnologia para a vigilância sanitária de medicamentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, 19(7), 2105–2114, 2014.

BAUDIB, K.; VIEIRA, R. D.; CICKO, S.; AYATA, K.; HOSSFELD, M.; EHRAT, N.; GÓMEZ-MUÑOZ; ELTZSCHIG, H. K.; IDZKO, M. C1P attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by preventing NF- κ B activation in neutrophils. **The Journal of Immunology**, 196(5):2319-26, 2016.

BEERS, J. R. F.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry**, 195, 133- 140, 1952.

BEKERS, O.; UITENDAAL, E. V.; BEIJNEN, J.; H; BULT, A.; UNDERBERG, W.J.M. I. Cyclodextrins in the pharmaceutical Field. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 17, 1503-1549, 1991.

BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. Cytokines and chemokines. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 111(2 Suppl), S460–S475, 2003.

BRASIL. Decreto 5.813 de 22 de junho de 2006. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Ministério da Saúde**. Brasília, DF, 22 jun. 2006. Disponível em:

<http://www.mda.gov.br/sitemda/sites/sitemda/files/user_arquivos_64/Programa_Nacional_de_Plantas_Medicinais_e_Fitoter%C3%A1picos..pdf> Acesso em: 26 de jun.

2016.

BRASIL. Portaria n 971, de 3 de maio de 2006. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Ministério da Saúde**. Brasília, DF, 3 mai. 2006. Disponível em: <portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/PNPIC.pdf>. Acesso em: 5 de set. 2016.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos/ Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Brasília, DF, 2009. 136p: il.- (série C, Projetos, Programas e Relatórios).

BRASIL. Portaria GM/MS n 4.217/2010, em 28 de dezembro de 2010. Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse do Sistema Único de Saúde. **Ministério da Saúde**. Brasília, DF, 28 dez. 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Portaria_MS_4217_28_12_2010.pdf>. Acesso em: 10 de Nov. 2011.

BRASIL. Portaria n° 1.358 de 20 de agosto de 2014. Instauração do Comitê Interno de Nanotecnologia da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília, DF, 20 ago. 2014. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=44&data=21/08/2014>. Acesso em: 4 de novembro de 2016.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Secretaria Executiva. Datasus. Informações de Saúde. Morbidade e informações epidemiológicas. Acesso em 16 de agosto de 2016. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=6926&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sih/cnv/ni>>

BRENNAN, F. M. ; MCINNES, I. B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. **Journal of Clinical Investigation**, 118(11), 3537–3545, 2008.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 59(7), 645-666, 2007.

BUKHARI, I. A.; GILANI, A. H.; MEO, S. A.; SAEED, A. Analgesic, anti-inflammatory and anti-platelet activities of *Buddleja crispa*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 16(1), 79, 2016.

CERCHIARA, T.; LUPPI, B.; BIGUCCI, F.; ZECCHI, V. Effect of chitosan on

progesterone release from hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexes. **International Journal of Pharmaceutics**, 258(1-2), 209–215, 2003.

CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R. K. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. **AA Pharmaceutical ScieTech**, 6(2), 329-357, 2005.

CHAVAKIS, T. Leucocyte recruitment in inflammation and novel endogenous negative regulators thereof. **European Journal of Clinical Investigation**, 42(6), 686–691, 2012.

CHENG, X.; HE, S.; YUAN, J.; MIAO, S.; GAO, H.; ZHANG, J.; LI, Y.; PENG, W.; WU, P. Lipoxin A4 attenuates LPS-induced mouse acute lung injury via Nrf2-mediated E-cadherin expression in airway epithelial cells. **Free Radical Biology and Medicine**, 93, 52–66, 2016.

CHINSEMBU, K. C. Tuberculosis and nature's pharmacy of putative anti-tuberculosis agents. **Acta Tropica**, 153, 46-56, 2016.

CHUNG, K. F. Targeting the interleukin pathway in the treatment of asthma. **The Lancet**, 386(9998), 1086–1096, 2015.

CI, X.; ZHONG, W.; REN, H.; WEN, Z.; LI, D.; PENG, L. Esculentoside A Attenuates Allergic Airway Inflammation via Activation of the Nrf-2 Pathway. **International Archives of Allergy and Immunology**, 167(4), 280–290, 2015.

COCHRANE, S. A.; ARTS, J. H. E.; EHNES, C.; HINDLE, S.; HOLLN, H. M.; POOLE, A.; SUTO, H.; KIMBER, I. Thresholds in chemical respiratory sensitization. **Toxicology**, 333, 179-194, 2015.

COELHO, A. L. J.; FREITAS, M. S.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; ZINGALI, R. B.; BARJA-FIDALGO, C. Interactions of disintegrins with human neutrophils induces cytoskeleton reorganization, focal adhesion kinase activation, and extracellular-regulated kinase-2 nuclear translocation, interfering with the chemotactic function. **The FASEB Journal**, 2001.

COSTA, M. P.; MARQUES, L. G.; OLIVEIRA, F. C. E.; PESSOA, C. Uma abordagem atual sobre o impacto dos sistemas de liberação de drogas nos avanços em nanomedicina. **Boletim Informativo Gerum**, 5(2), 124-133, 2014.

CRUNKHORN, P.; MEACOCK, S. C. Mediators of the inflammation induced in the rat

paw by carrageenin. **British Journal of Pharmacology**, 42(3), 392–402, 1971.
CUNHA, T. M.; JÚNIOR-VERRI, W. A.; SILVA, J. S.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.;

FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 102(5), 1755–60, 2005.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 28(1), 1-9, 2007.

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, 3, 1023-1035, 2004.

DERENDORF, H.; MELTZER, E. O. Molecular and clinical pharmacology of intranasal corticosteroids: Clinical and therapeutic implications. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 63(10), 1292–1300, 2008.

DONATE, P. B.; CUNHA, T. M.; VERRI, W. A.; JUNTA, C. M.; LIMA, F. O.; VIEIRA, S. M.; PERES, R. S.; BOMBONATO-PRADO, K. F.; JÚNIOR, P. L.; FERREIRA, S. H.; DONADI, E. A.; PASSOS, G. A. S.; CUNHA, F. Q. Bosentan, an endothelin receptor antagonist, ameliorates collagen-induced arthritis: The role of TNF- α in the induction of endothelin system genes. **Inflammation Research**, 61(4), 337–348, 2012.

DOOLEY, D. C.; SIMPSON, J. F.; MERYMAN, H. T. Isolation of large numbers of fully viable human neutrophils: a preparative technique using percoll density gradient centrifugation. **Experimental Hematology**, 10(7), 591-599, 1982.

DRISCOLL, K. E. Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation. **Experimental Lung Research**, 20(6), 473–490, 1994.

DRISCOLL, K. E. TNF- α and MIP-2: Role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress. **Toxicology Letters**, 112-113, 177–183, 2000.

DUCHARME, F. M.; NI CHROININ, M.; GREENSTONE, I.; LASSERSON, T. J. Addition of long-acting beta2-agonists to inhaled corticosteroids versus same dose inhaled corticosteroids for chronic asthma in adults and children. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, (5), CD005535, 2010.

EDWARDS, A. M.; BERGMANN, K. C.; RING, J. Chromones. History of Allergy.

Chemical Immunology and Allergy. Basel, Karger, 100, 317-322, 2014.

EDWARDS, R. M.; KICSKA, G.; SCHMIDT, R.; PIPAVATH, S. N. J. Imaging of small airways and emphysema. **Clinics in Chest Medicine**, 36(2), 335–3472, 2015.

ENTENBERG, D.; RODRIGUEZ-TIRADO, C.; KATO, Y.; KITAMURA, T.; POLLARD, J.; CONDEELIS, J. In vivo subcellular resolution optical imaging in the lung reveals early metastatic proliferation and motility. **Intravital**, 4(3), 1-22, 2015.

EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Asthma Facts. Indoor Environment Division Office of Air and Radiation, 2015. Disponível em: <<http://www.epa.gov/asthma>> Acesso em: 22 de Abril de 2016.

FARIAS, J. A. C.; FERRO, J. N. S.; SILVA, J. P.; AGRA, I. K. R.; OLIVEIRA, F. M.; CANDEA, A. L. P.; CONTE, F. P.; FERRARIS, F. K.; HENRIQUES, M. G. M. O.; CONSERVA, L. M.; BARRETO, E. Modulation of inflammatory processes by leaves extract from *Clusia nemorosa* both in vitro and in vivo animal models. **Inflammation**, 35(2), 764–771, 2012.

FAVARIN, D. C.; OLIVEIRA, J. R.; OLIVEIRA, C. J.; ROGERIO, A. D. P. Potential effects of medicinal plants and secondary metabolites on acute lung injury. **Biomed Research International**, 2013, 17–23, 2013.

FERRARIS, F. K.; RODRIGUES, R.; SILVA, V. P.; FIGUEIREDO, R.; PENIDO, C.; HENRIQUES, M. D. G. M. O. Modulation of T lymphocyte and eosinophil functions in vitro by natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet. **International Immunopharmacology**, 11(1), 1–11, 2011.

FERREIRA, F. R.; SILVA, E. G.; DE LEO, L. P. M.; CALVO, E. J.; BENTO, E. D. S.; GOULART, M. O. F.; DE ABREU, F. C. Electrochemical investigations into host-guest interactions of a natural antioxidant compound with β -cyclodextrin. **Electrochimica Acta**, 56(2), 797–803, 2010.

FERREIRA, F. R.; VALENTIM, I. B.; RAMONES, E. L. C.; TREVISAN, M. T. S.; OLEA-AZAR, C.; PEREZ-CRUZ, F.; DE ABREU, F. C.; GOULART, M. O. F. Antioxidant activity of the mangiferin inclusion with β -cyclodextrin. **LWT - Food Science and Technology**, 51, 129-134, 2013.

FERREIRA, T. P. T.; MARIANO, L. L.; GHILOSO-BORTOLINI, R.; ARANTES, A. C. S.; FERNANDES, A. J.; BERNI, M.; CECCHINATO, V.; UGUCCIONI, M.; MAJ, R.; BARBERIS, A.; SILVA, P. M. R.; MARTINS, M. A. Potential of PEGylated Toll-Like

receptor 7 ligands for controlling inflammation and functional changes in mouse models of asthma and silicosis. **Frontiers in Immunology**, 7(March), 1–15, 2016.

FERRO, J. N. S.; SILVA, J. P.; CONSERVA, L. M.; BARRETO, E. Leaf extract from *Clusia nemorosa* induces an antinociceptive effect in mice via a mechanism that is adrenergic systems dependent. **Chinese Journal of Natural Medicines**, 11(4), 385–390, 2013.

FISCHER, B. M.; VOYNOW, J. A.; GHIO, A. J. COPD: balancing oxidants and antioxidants. **International Journal of COPD**, 10, 261-276, 2015.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**, 12, 1-17, 2016.

GALLI, S. J.; TSAI, M. IgE and mast cells in allergic disease. **Nature Medicine**, 18(5), 693–704, 2012.

GAVINI, E.; SPADA, G.; RASSU, G.; CERRI, G.; BRUNDU, A.; COSSU, M.; SORRENTI, M.; GIUNCHEDI, P. Development of solid nanoparticles based on hydroxypropyl- β - cyclodextrin aimed for the colonic transmucosal delivery of diclofenac sodium. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 63(4), 472–482, 2011.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, 3(5), 401–416, 2004.

GINA - Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2014. Disponível em: <<http://www.ginasthma.org/>> Acesso em: 22 de Abril de 2016.

GINA - Global Initiative for Asthma. Global Strategy For Asthma Management And Prevention, 2015. Disponível em: <http://ginasthma.org/wp-content/uploads/2016/01/GINA_Report_2015_Aug11-1.pdf> Acesso em: 19 de Julho de 2016.

GOMES, T. A.; COSTA, S. P. M.; MEDEIROS, G. C. R.; SILVA, C. R.; LYRA, M. A. M.; SILVA, K. E. R.; ALBUQUERQUE, M. M.; SILVA, R. M. F.; ROLIM-NETO, P. J. Estratégias utilizadas para o incremento da solubilidade do fármaco antirretroviral classe II: Efavirenz. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 36(2),

239-249, 2015.

GÓMEZ-GALVÁN, F.; PÉREZ-ÁLVAREZ, L.; MATAS, J.; ÁLVAREZ-BATISTA, A.; POEJO, J.; DUARTE, C. M.; RUIZ-RUBIO, L.; VILA-VILELA, J. L. Preparation and characterization of soluble branched ionic β -cyclodextrins and their inclusion complexes with triclosan. **Carbohydrate Polymers**, 142, 149-157, 2016.

GOSH, A.; CHEN, F.; THAKUR, A.; HONG, H. Cysteinyl Leukotrienes and Their Receptors: Emerging Therapeutic Targets in Central Nervous System Disorders. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, 1–9, 2016.

GRANOT, Z.; JABLONSKA, J. Distinct Functions of Neutrophil in Cancer and Its Regulation. **Mediators of Inflammation**, 2015, 1-11, 2015.

GREEN, R. H.; BRIGHTLING, C. E.; MCKENNA, S.; HARGADON, B.; PARKER, D.; BRADDING, P.; WARDLAW, A. J.; PAVORD, I. D. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: A randomised controlled trial. **Lancet**, 360(9347), 1715–1721, 2002.

GRIFFITH, J. W.; SOKOL, C. L.; LUSTER, A. D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. **Annual Review of Immunology**, 32, 659–702, 2014.

GUEDES, F. L.; ALVES, G. M. C.; SANTOS, F. L. A.; LIMA, L. F.; ROLIM, L. A.; ROLIM NETO, P. J. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia**, 89(3), 220-225, 2008.

GUIMARÃES, A. G.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Monoterpenes with Analgesic Activity – A Systematic Review. **Phytotherapy Research**. 27, 1-15, 2013.

HADLEY, K.; RYAN, A.; FORSYTH, S.; GAUTIER, S.; SALEM, N. The essentiality of arachidonic acid in infant development. **Nutrients**, 8(4), 1-47, 2016.

HAEGGSTRÖM, J. Z.; RINALDO-MATTHIS, A.; WHEELLOCK, C. E.; WETTERHOLM, A. Advances in eicosanoid research, novel therapeutic implications. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 396(1), 135–139, 2010.

HARESH, P. R.; AMIT, P. A. Cyclodextrin as solubility enhancer for Levosimendan Lyophilized injection. **Der Pharmacia Lettre**, 5(5), 206–212, 2013.

HAVIR, E. A.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 125, 189-198, 1968.

HENSON, P. M. Dampening inflammation. **Nature Immunology**, 6(12), 1179–1181, 2005.

HILL, R. A.; CONNOLLY, J. D. Triterpenoids. **Natural Product Reports**, 30(7), 1028–1065, 2013.

HIRANO, T. Interleukin 6 in autoimmune and inflammatory diseases: a personal memoir. Proceedings of the Japan Academy. Series B, **Physical and Biological Sciences**, 86(7), 717–30, 2010.

HOLGATE, S. T.; WENZEL, S.; POSTMA, D. S.; WEISS, S. T.; RENZ, H.; SLY, P.D. Asthma. **Nature Reviews**, 1, 1-24, 2015.

HORIGUCHI, M.; HIROKAWA, M.; ABE, K.; KUMAGAI, H.; YAMASHITA, C. Pulmonary administration of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ to the lungs induces alveolar regeneration in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of Controlled Release**. 233, 191-197, 2016.

ITO, E.; CROZIER, A.; ASHIHARA, H. Theophylline metabolism in higher plants. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, 1336(2), 323–330, 1997.

JANOCHA, S.; SCHIMITZ, D.; BERNHARDT, R. Terpene hydroxylation with microbial cytochrome P450 monooxygenases. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. 148, 215-250, 2015.

JESUS, J. A.; LAGO, J. H. G.; LAURENTI, M. D.; YAMANOTO, E. S.; PASSERO, L. F. D. Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids: An update. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015, 1-14, 2015.

JIAO, J.; ZHANG, Y.; LOU, D.; WU, X.; ZHANG, Y. Antihyperlipidemic and antihypertensive effect of a triterpenoid-rich extract from bamboo shavings and vasodilatador effect of friedelin on phenylephrine-induced vasoconstriction in thoracic aortas of rats. **Phytotherapy Research**, 21, 1135–1141, 2007.

KARAGIANNIDIS, C.; AKDIS, M.; HOLOPAINEN, P.; WOOLLEY, N. J.; HENSE, G.; RÜCKERT, B.; MANTEL, P. Y.; MENZ, G.; AKDIS, C. A.; BLASER, K.; SCHMIDT-WEBER, C. B. Glucocorticoids upregulate *FOXP3* expression and regulatory T cells in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 114(6), 1425–1433, 2004.

KAU, A. L.; KORENBLAT, P. E. Anti-Interleukin 4 and 13 for asthma treatment in the era of endotypes. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, 14(6), 570–575, December, 2014.

KFOURY, M.; AUEZOVA, L.; GREIGE-GERGES, H.; RUELLAN, S.; FOURMENTIN, S. Cyclodextrin, an efficient tool for trans-anethole encapsulation: Chromatographic, spectroscopic, thermal and structural studies. **Food Chemistry**, 164, 454–461, 2014.

KINNULA, V. L. Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway diseases. **Thorax**, 60(8), 693–700, 2005.

KONRAD, F. M.; REUTERSHAN, J. CXCR2 in acute lung injury. **Mediators of Inflammation**, 2012, 1-8, 2012.

KUDO, M.; ISHIGATSUBO, Y.; AOKI, I. Pathology of asthma. **Frontiers in Microbiology**, 4(SEP), 1–16, 2013.

KVASNICA, M.; URBAN, M.; DICKINSON, N. J.; SAREK, J. Pentacyclic triterpenoids with nitrogen- and sulfur-containing heterocycles: synthesis and medicinal significance. **Natural Product Reports**, 00, 1–28, 2015.

LAKKAKULA, J. R.; KRAUSE, R. W. M. A vision for cyclodextrin nanoparticles in drug delivery systems and pharmaceutical applications. **Nanomedicine**, 9(6), 877–94, 2014.

LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. The airway epithelium in asthma. **Nature medicine**. 18(5), 684-692, 2012.

LANNES-VIEIRA, J.; CHAMMAS, R.; VILLA-VERDE, D.M.; VANNIER-DOS-SANTOS, M.A.; MELLO-COELHO, V.; DE SOUZA, S.J.; BRENTANI, R.R.; SAVINO, W. Extracellular matrix components of the mouse thymic microenvironment. III. Thymic epithelial cells express the VLA-6 complex that is involved in laminin-mediated interactions with thymocytes. **International Immunology**, 5:1421-1430, 1993.

LEVINE, S. J.; WENZEL, S. E. Narrative Review: The Role of Th2 Immune Pathway Modulation in the Treatment of Severe Asthma and Its Phenotypes. **Annals International of Medicine**, 152:232-237, 2010

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews: Immunology**, 7(9), 678–89, 2007.

LI, C.; LI, Q.; LIU, Y. -Y.; WANG, M. -X.; PAN, C. -S.; YAN, L.; CHEN, Y. -Y.; FAN, J. -Y.; HAN, J. -Y. Protective effects of butyrate on intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, 306: G111–G122, 2013.

LIMA, P. S. S.; LUCCHESI, A. M.; ARAÚJO-FILHO, H. G.; MENEZES, P. P.; ARAÚJO, A. A. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; QUINTANS, J. S. S. Inclusion of Terpenes in Cyclodextrins: Preparation, Characterization and Pharmacological Approaches. **Carbohydrate Polymers**, 151, 965-987, 2016.

LIU, C.; ZHANG, W.; YANG, H.; SUN, W.; GONG, X.; ZHAO, J.; SUN, Y.; DIAO, G. A water-soluble inclusion complex of pedunculoside with the polymer β -cyclodextrin: A novel anti-inflammation agent with low toxicity. **PLoS ONE**, 9(7), 1-9, 2014.

LLOYD, C. M.; HESSEL, E. M. Functions of T cells in asthma: more than just TH2 cells. **Nature Reviews Immunology**, 10 (12), 838–848, 2010.

LOFTSSON, T.; HREINSDÓTTIR, D.; MÁSSON, M. The complexation efficiency. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, 57(1-4), 545–552, 2007.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: Basic science and product development. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 62(11), 1607–1621, 2010.

LYKHMUS, O.; MISHRA, N.; ROVAL, L.; KALASHNYK, O.; GERGALOVA, G.; USPENSKA, K.; KOMISARENKO, S.; SOREQ, H.; SKOK, M. Molecular Mechanisms Regulating LPS-Induced Inflammation in the Brain. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, 9 (19), 1-13, 2016.

MASOLI, M.; FABIAN, S. H.; BEASLEY, R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. **Allergy**, 59, 469-478, 2004.

McCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, 68(14), 2015–2022, 2007.

MEDEIROS, R.; PASSOS, G. F.; VITOR, C. E.; KOEPP, J.; MAZZUCO, T. L.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbanacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *British Journal of Pharmacol.* V 151, 618–627, 2007.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, 454(7203), 428–435, 2008.

MOORE, W. C.; MEYERS, D. A.; WENZEL, S. E.; TEAGUE, W. G.; LI, H.; LI, X.; D'AGOSTINO, R.; CASTRO, M.; CURRAN-EVERETT, D.; FITZPATRICK, A. M.; GASTON, B.; JARJOUR, N. N.; SORKNESS, R.; CALHOUN, W. J.; CHUNG, K. F.; COMHAIR, S. A. A.; DWEIK, R. A.; ISRAEL, E.; PETERS, S. P.; BUSSE, W. W.; ERZURUM, S. C.; BLEECKER, E. R. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the severe asthma research program. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 181(4), 315–323, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunology Methods**, 65: 55–63, 1983.

MUCENIECE, R.; NAMNIECE, J.; NAKURTE, I.; JEKABSONS, K.; RIEKSTINA, U.; JANSONE, B. Pharmacological research on natural substances in Latvia: Focus on lunasin, betulin, polyphenol and phlorizin. **Pharmacological Research**, 2016. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.03.040>

MULLOL, J.; BOUSQUET, J.; BACHERT, C.; CANONICA, W. G.; GIMENEZ-ARNAU, A.; KOWALSKI, M. L.; MARTÍ-GUADAÑO, M.; MAURER, M.; PICADO, C.; SCADDING, G.; VAN CAUWENBERGE, P. Rupatadine in allergic rhinitis and chronic urticaria. **Allergy**, 63(87), 5–28, 2008.

NASCIMENTO, A. R.; LESSA, M. A.; SABINO, B.; BOUSQUET, P.; TIBIRIÇÁ, E. Microvascular effects of centrally acting antihypertensive drugs in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, 55(3), 240–247, 2010.

NELSON, H. S. β -Adrenergic Bronchodilators. Review article. **The New England Journal of Medicine: Drug Therapy**, 333(8), 499–506, 1995.

NELSON, H. S. Is there a problem with inhaled long-acting β -adrenergic agonists? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 117(1), 3–16, 2006.

NIALS, A. T.; UDDIN, S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. **Disease Models & Mechanisms**, 1(4-5), 213–220, 2008.

NIH - National Institutes of Health - U.S. Department of Health and Human Services - National Heart, Lung and Blood Institute. National Asthma Education and Prevention Program Expert Panel Report. Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. **NIH Publication Number 08-5846**. October 2007. Disponível em: <<http://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/guidelines/asthsumm.pdf>> Acesso em: 01 de Maio de 2016.

NOGUEIRA L.J.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Histórico da Evolução da Química Medicinal e a Importância da Lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as Contribuições de Overton e Hansch. **Revista Virtual de Química**. v. 1, n.3, 2009.

OH, C. K.; GEBA, G. P.; MOLFINO, N. Investigational therapeutics targeting the IL-4/IL-13/STAT-6 pathway for the treatment of asthma. **European Respiratory Review**, 19(115), 46-54, 2010.

OLIVEIRA, M. G. B.; GUIMARÃES, A. G.; ARAÚJO, A. A. S.; QUINTANS, J. S. S.; SANTOS, M. R. V.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Cyclodextrins: improving the therapeutic response of analgesic drugs: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, 25(8), 897–907, 2015.

OLSEN, P. C.; KITOKO, J. Z.; FERREIRA, T. P.; AZEVEDO, C. T.; ARANTES, A. C.; MARTINS, M. A. Glucocorticoids decrease Treg cell numbers in lungs of allergic mice. **European Journal of Pharmacology**, 747, 52–58, 2015.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Vigilância Global, prevenção e controle das doenças respiratórias crônicas: uma abordagem integradora. Editores: Jean Bousquet e Nikolai Khaltsev, 2007.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. BONITA, R., BEAGLEHOLE, R., KJEILSTRÖM, T. Epidemiologia básica. Tradução e revisão científica Juraci A César. 2ª edição. São Paulo, Santos. 2010.

PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. **Einstein**, 13(3), 469–473, 2015.

PARULEKAR, A.D.; DIAMANT, Z.; HANANIA, N. A. Role of T2 inflammation biomarkers in severe asthma. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, 22(1), 59-68, 2016.

PATERAKI, I.; HESKES, A. M.; HAMBERGER, B. Cytochromes P450 for Terpene Functionalisation and Metabolic Engineering. **Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology**, 148, 107-139, 2015.

PATLOLLA, J. M. R.; RAO, C. V. Triterpenoids for Cancer Prevention and Treatment: Current Status and Future Prospects. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 13(1), 147–155, 2012.

PATTERSON, M. F.; BORISH, L.; KENNEDY, J. L. The past, present, and future of monoclonal antibodies to IL-5 and eosinophilic asthma: a review. **Journal of Asthma and Allergy**, 8, 125-134, 2015.

PEASE, J. E.; WILLIAMS, T. J. Eotaxin and asthma, **Current Opinion Pharmacology**, 1(3), 248-253, 2001.

PELAIA, G.; VATRELLA, A.; CUDA, G.; MASELLI, R.; MARSICO, S. A. Molecular mechanisms of corticosteroid actions in chronic inflammatory airway diseases. **Life Sciences**, 72(14), 1549–1561, 2003.

PENIDO, C.; COSTA, K. A.; PENNAFORTE, R. J.; SILVA, M. F. S. C.; PEREIRA, J. F. G.; SIANI, A. C.; HENRIQUES, M. G. M. O. Anti-allergic effects of natural tetranotriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. **Inflammation Research**, 54, 295-303, 2005.

PERGOLA, C.; JAZZAR, B.; ROSSI, A.; NORTHOFF, H.; HAMBURGUER, M.; SAUTEBIN, L.; WERZ, O. On the inhibition of 5-lipoxygenase product formation by tryptanthrin: Mechanistic studies and efficacy *in vivo*. **British Journal of Pharmacology**, 165(3), 765–776, 2016.

PETERS, M.; KOHLER-BACHMANN, S.; LENZ-HABIJAN, T.; BUFE, A. Influence of an allergen-specific Th17 response on remodeling of the airways. **American Journal Respiratory Cell Molecular Biology**, 54(3), 350-358, 2016a.

PETERS, C. P.; McGRATH, K. W.; HAWKINS, G. A.; HASTIE, A. T.; LEVY, B. D.; ISRAEL, E.; PHILLIPS, B. R.; MAUGER, D. T.; COMHAIR, S. A.; ERZURUM, S. C.; JOHANSSON, M. W.; JARJOUR, N. N.; COVERSTONE, A. M.; CASTRO, M.;

HOLGUIN, F.; WENZEL, S. E.; WOODRUFF, P. G.; BLEECKER E. R.; FAHY, J. V. Plasma interleukin-6 concentrations, metabolic dysfunction, and asthma severity: a cross-sectional analysis of two cohorts. **The Lancet Respiratory Medicine**, 4(7), 574-584, 2016b.

PINHO, E.; GROOTVELD, M.; SOARES, G.; HENRIQUES, M. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, 101(1), 121–135, 2014.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**, 142(2), 331–8, 2004.

PRASAD, B. N. B. M. Refractory asthma – An old disorder: Novel approaches for effective control. **Medical Journal Armed Forces India**, 72, 277-280, 2016.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European Journal of Pharmacology**, 533(1-3), 222–239, 2006.

RAMA, A. C. R.; VEIGA, F.; FIGUEIREDO, I. V.; SOUSA, A.; CARAMONA, M. Aspectos farmacêuticos da formulação de medicamentos para neonatos. Fundamentos da complexação de indometacina com hidroxipropil-beta-ciclodextrina para tratamento oral do fechamento do canal arterial. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 41(3), 282-299, 2005.

RAMIREZ, S. H.; HASKÓ, J.; SKUBA, A.; FAN, S.; McCORMICK, R.; DYKSTRA, H.; REICHENBACH, N.; KRIZBAI, I.; MAHADEVAN, A.; ZHANG, M.; TUMA, R.; SON, Y.; PERSIDSKY, Y. Activation of Cannabinoid Receptor 2 Attenuates Leukocyte-Endothelial Interactions and Blood-Brain Barrier Dysfunction under Inflammatory Conditions. **The Journal of Neuroscience**, 32(12), 4004–4016, 2012.

RIBEIRO, P. R.; FERRAZ, C. G.; GUEDES, M. L. S.; MARTINS, D.; CRUZ, F. G.. A new biphenyl and antimicrobial activity of extracts and compounds from *Clusia burllemarxii*. **Fitoterapia**, 82(8), 1237–1240, 2011.

ROBINSON, D. S. Regulatory T cells and asthma. **Clinical and Experimental Allergy**, 39(9), 1314–1323, 2009.

SABINO, B.; LESSA, M. A.; NASCIMENTO, A. R.; RODRIGUES, C. A.;

HENRIQUES, M. D.; GARZONI, L. R.; LEVY, B. I.; TIBIRIÇÁ, E. Effects of antihypertensive drugs on capillary rarefaction in spontaneously hypertensive rats: intravital microscopy and histologic analysis. **Journal Cardiovascular Pharmacology**, 51(4), 402-409, 2008.

SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 30(1), 1-17, 2001.

SANT'ANNA, L.S.; FERREIRA, A. P.; ALENCAR, M. S. M. Patents, drug delivery and public health protection: health risk management for nanopharmaceuticals. **Journal of Technology Management & Innovation**, 8(2), 107–118, 2013.

SERRA, M. F.; ANJOS-VALOTTA, E. A.; OLSEN, P. C.; COUTO, G. C.; JURGILAS, P. B.; COTIAS, A. C.; PÃO, C. R.; FERREIRA, T. P.; ARANTES, A. C.; PIRES, A. L.; CORDEIRO, R. S.; SILVA, P. M.; MARTINS, M. A. Nebulized lidocaine prevents airway inflammation peribronchial fibrosis, and mucus production in a murine model of asthma. **Anesthesiology**, 117(3), 580-591, 2012.

SEYFIZADEH, N.; SEYFIZADEH, N.; GHARIBI, T.; BABALOO, Z. Interleukin-13 an importante cytokine: a review on its roles in some human diseases. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, 62(4), 341-378, 2015.

SHARA, M.; STOHS, S. J. Efficacy and Safety of White Willow Bark (*Salix alba*) Extracts. **Phytotherapy Research**, 29(8), 1112–1116, 2015.

SHEN, Y.; WANG, D.; WANG, X. Role of CCR2 and IL-8 in acute lung injury: a new mechanism and therapeutic target. **Expert Review of Respiratory Medicine**, 5(1), 107–114, 2011.

SHIMIZU, K.; KONNO, S.; OZAKI, M.; YAMASHITA, K.; TODO, S.; NISHIMURA, M. Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), a novel NF-kappaB inhibitor, inhibits allergic inflammation and airway remodeling in murine models of asthma. **Clinical Experimental Allergy**, 42, 1273-1281, 2012.

SINGH, R. K.; FURZE, R. C.; BIRRELL, M. A.; RANKIN, S. M.; HUME, A. N.; SEABRA, M. C. A role for Rab27 in neutrophil chemotaxis and lung recruitment. **BMC Cell Biology**, 15:39, 2014.

SKIRY CZ, A.; KIERSZIOWSKA, S.; MÈRET, M.; WILLMITZER, L.; TZOTOS, G. Medicinal Bioprospecting of the Amazon Rainforest: A modern Eldorado? **Trends in Biotechnology**, 34(10), 781-790, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o manejo da Asma. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 38, Suplemento 1, S1-S46, 2012.

SORIANO, J. B.; CAMPOS, H. S. Epidemiology of Asthma. **Pulmão RJ**, 21(2), 3–10, 2012.

SULAIMAN, I.; LIM, J. C. W.; SOO, H. L.; STANSLAS, J. Molecularly targeted therapies for asthma: Current development, challenges and potential clinical translation. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, 40, 52–68, 2016.

SUNIL, C.; DURAIKANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S.; AL-DHABI, N. A. Antioxidant, free radical scavenging and liver protective effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. leaves. **Food Chemistry**, 139(1-4), 860–865, 2013.

SZEJTLI, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. **Chemical Reviews**, 98(97), 1743–1753, 1998.

TAMOKOU, J. D. D.; TALA, M. F.; WABO, H. K.; KUIATE, J. R.; TANE, P. Antimicrobial activities of methanol extract and compounds from stem bark of *Vismia rubescens*. **Journal of Ethnopharmacology**, 124(3), 571–575, 2009.

TAUR, D. J.; PATIL, R. Y. Some medicinal plants with antiasthmatic potential: a current status. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. 1(5), 413-418, 2011.

UMAR, A.; STEELE, V. E.; MENTER, D. G.; HAWK, E. T. Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention. **Seminars in Oncology**, 43(1), 65–77, 2016.

UNITED NATIONS. World Population Prospects: The 2015 Revision. 2015. Disponível em: <<https://esa.un.org/unpd/wpp/Download/Standard/Population/>> Acesso em: 11 de Agosto de 2016.

VALENÇA, M. M.; SILVA, A. A.; BORDINI, C. A. Headache research and medical practice in Brazil: An historical overview. **Headache**, 55(S1), 4–31, 2015.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica. **Minerva Coimbra**, 2006.

WADSWORTH, S. J.; YANG, S. J.; DORSCHIED, D. R. IL-13 , asthma and glycosylation in airway epithelial repair. **Biochemistry, Genetics and Molecular Biology**, 187–227, 2012. Disponível em: from <http://cdn.intechopen.com/pdfs/41123/InTech-Il_13_asthma_and_glycosylation_in_airway_epithelial_repair.pdf> Acesso em: 05 de Maio de 2016.

WANG, Z.; PORRECA, F.; CUZZOCREA, S. A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 309(3), 869–878, 2004.

WASILEWSKI, N. V.; LOUGHEED, M. D.; FISHER, J. T. Changing face of β_2 -adrenergic and muscarinic receptor therapies in asthma. **Current Opinion in Pharmacology**, 16(1), 148–156, 2014.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants - Volume 2, 2003. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s4927e/s4927e.pdf>> Acesso em: 19 de Julho de 2016.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants - Volume 4, 2009. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s16713e/s16713e.pdf>> Acesso em: 11 de Agosto de 2016.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 111 (December), 544–547, 1962.

WOOD, A. J. J. Drug Therapy. **The New England Journal of Medicine**, 1380- 1388, 1996.

XUE-MEI, M.; HUAN-XIAO, S. The anti-inflammatory effect of the CXCR β antagonist-N15P peptide and its modulation on inflammation-associated mediators in LPS-Induced PBMC. **Inflammation**, 2015.

ZEKI, A. A.; YEGANEH, N.; KENYON, N. J.; GHAVAMI, S. Autophagy in airway diseases: a new frontier in human asthma? **Allergy**, 71(1), 5-14, 2016.

ZEYFIZADEH, N.; SEYFIZADEH, N.; GHARIBI, T.; BABALOO, Z. Interleukin-13 as an important cytokine: A review on its roles in some human diseases. **Acta**

Microbiologica et Immunologica Hungarica, 62(4), 341–378, 2015.

ZHANG, J.-M.; JIANXIONG, A. Cytokines, Inflammation and Pain. **International Anesthesiology Clinics**, 45(2), 27-37, 2007.

ZHANG, Y.; SUN, K.; LIU, Y. -Y.; ZHANG, Y. -P.; HU, B. -H.; CHANG, X.; YAN, L.; PAN, C. -S.; LI, Q.; FAN, J. -Y.; HE, K; MAO, X. -W.; TU, L.; WANG, C. -S.; HAN, J. -Y. Ginsenoside Rb1 ameliorates lipopolysaccharide-induced albumin leakage from rat mesenteric venules by intervening in both trans-and paracellular pathway. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, 306(4), G289–G300, 2014.

ZHU, G.; MEI, L.; TAN, W. Nanomedicine: From bioimaging to drug delivery and therapeutics, nanotechnology is poised to change the way doctors practice medicine. **The Scientist**, 2014. Disponível em: <<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/40598/title/Nanomedicine/>> Acesso em: 24 de Abril de 2016.

ANEXO A – Organograma estrutural do estudo.

