

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Bianca Vargas Belke

**DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTI-
INFLAMATÓRIO TÓPICO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE
*Casearia decandra jacq.***

Santa Maria, RS, Brasil

2017

Bianca Vargas Belke

**DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO
TÓPICO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Casearia decandra jacq.***

Dissertação apresentada ao Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

Prof^a. Dr^a. Liliane de Freitas Bauermann

Santa Maria, RS, Brasil

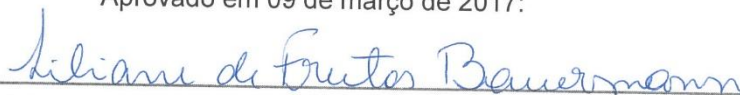
2017

Bianca Vargas Belke

**DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO
TÓPICO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Casearia decandra jacq.***

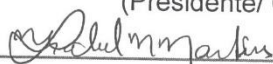
Dissertação apresentada ao Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

Aprovado em 09 de março de 2017:



Liliane de Freitas Bauermann, Prof. Dr^a. (UFSM)

(Presidente/ Orientadora)



Maria Isabel Morgan Martins, Dr^a. (ULBRA)



Guilherme Vargas Bochi, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, RS, Brasil

2017

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre comigo.

Aos meus pais, Vilson e Marli, por serem exemplos de vida, dedicação, carinho e também por confiarem na minha capacidade.

À minha orientadora Dr^a. Liliane de Freitas Bauermann pela confiança e apoio nas horas mais difíceis, e também pelo conhecimento compartilhado.

À professora Margareth, *in memoriam*, que me deu a oportunidade para realizar o mestrado, pela alegria e experiências compartilhadas.

Aos meus colegas e queridos amigos de laboratório Mariana, Ritiel, Letícia, Lauren, Amanda, Natália, Alana, Aline e Christine pela ajuda, companheirismo, muitos ensinamentos e amizade;

Em especial as minhas amigas Roberta e Thiele, que sempre me incentivaram e apoiaram em todos os momentos que precisei.

À Prof. Sara Marchesan e também à colega Camila Camponogara, do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica desta instituição, por contribuírem para o engrandecimento deste estudo.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela minha formação profissional e por todas as oportunidades oferecidas durante a graduação e pós-graduação.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela estrutura e subsídios oferecidos para o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À todas as pessoas que contribuíram de alguma maneira para minha formação, para a realização deste trabalho ou que torceram por mim.

RESUMO

DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Casearia decandra jacq.*

AUTORA: Bianca Vargas Belke

ORIENTADORA: Liliane de Freitas Bauermann

A espécie *Casearia decandra Jacq* é popularmente conhecida como “guaçatonga” e faz parte da família Salicaceae. São atribuídas pela população várias propriedades terapêuticas, sendo a mesma utilizada como diurética, antiofídica, cicatrizante, anti-inflamatória e antitérmica. Porém poucas informações sobre a composição química e atividade farmacológica das folhas dessa espécie são descritas na literatura. O presente trabalho objetivou avaliar a atividade antioxidante e atividade anti-inflamatória do extrato bruto das folhas de *C. Decandra*. As folhas foram secas, moídas e após o material foi submetido a maceração hidroalcoólica (70%) durante uma semana. Após este período, o extrato hidroalcoólico (EH) resultante foi recolhido, e concentrado em evaporador rotatório, obtendo-se o extrato bruto. O estudo fitoquímico foi realizado por meio da determinação quantitativa do teor de polifenóis e flavonoides. O potencial antioxidante foi avaliado pelos métodos do DPPH e poder de redução, onde o extrato bruto apresentou IC₅₀ elevado. A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) revelou a presença de rutina no extrato. O extrato bruto das folhas de *C. decandra* apresentou atividade anti-inflamatória tópica do extrato, sendo capaz de reduzir significativamente o edema de orelha nas doses de 0,001 a 1 mg/orelha, apresentando uma inibição máxima de 70±5% para a dose de 1,0 mg/orelha. O extrato também reduziu de forma significativa a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) nas doses de 0,001 a 1 mg/orelha, com inibição máxima de 42±4% para a dose de 1,0 mg/orelha. Também foram realizados os mesmos testes com o a rutina, onde foi observado efeito antiedematogênico e redução da atividade de mieloperoxidase nas doses do extrato utilizadas (0,03 a 0,003 mg/orelha). A análise histológica do extrato e do composto isolado demonstraram redução na migração celular e edema, corroborando os resultados anteriores. Estes resultados indicam que a espécie *C. decandra* apresenta um potencial farmacológico promissor para futuras análises a fim de elucidar mecanismos de ação dos processos avaliados neste trabalho.

Palavras-chave: Guaçatonga; Antioxidante; Anti-inflamatório

ABSTRACT

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT POTENTIAL AND TOPICAL ANTI-INFLAMMATORY OF THE CRUDE EXTRACT OF THE *Casearia decandra jacq.*

AUTHOR: Bianca Vargas Belke
ADVISER: Liliane de Freitas Bauermann

Casearia decandra Jacq is popularly known as "Guaçatonga" and is part of the Salicaceae family. Several therapeutic properties are attributed by the population, being used as diuretic, antiofidic, healing, anti-inflammatory and antithermic. However, little information on the chemical composition and pharmacological activity of the leaves of this species are described in the literature. The present work aimed to evaluate the antioxidant activity and anti-inflammatory activity of the crude extract of *C. decandra* leaves. The leaves were dried, ground and after the material was subjected to hydroalcoholic maceration (70%) for one week. After this time, the resulting hydroalcoholic extract (EH) was collected, and concentrated on a rotary evaporator to give the crude extract. The phytochemical study was carried out by means of the quantitative determination of the polyphenols and flavonoids content. The antioxidant potential was evaluated by the DPPH methods and reduction power, where the crude extract showed high IC₅₀. Analysis by high performance liquid chromatography (HPLC) revealed the presence of rutin in the extract. The crude extract of the leaves presented a topical anti-inflammatory activity of *C. decandra* extract, being able to significantly reduce ear edema at doses of 0.001 to 1 mg / ear, with a maximum inhibition of $70 \pm 5\%$ for the dose Of 1.0 mg / ear. The extract also significantly reduced the activity of the enzyme myeloperoxidase (MPO) at doses of 0.001 to 1 mg / ear, with maximum inhibition of $42 \pm 4\%$ for the 1.0 mg / ear dose. The same tests were also carried out with a rutin, in which the antiderematogenic effect and reduction of the myeloperoxidase activity were observed at the doses of the extract used (0.03 to 0.003 mg / ear). Histological analysis of the extract and the isolated compound showed a reduction in cell migration and edema, corroborating previous results. These results indicate that the *C. decandra* species presents a promising pharmacological potential for future analyzes in order to elucidate mechanisms of action of the processes evaluated in this work.

Keywords: Guaçatonga; Antioxidant; Anti-inflammatory

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspecto geral da <i>Casearia decandra jacq</i> - Foto: Eduardo Luís Hettwer Giehl.....	17
Figura 2 - Estrutura química da rutina.....	24
Figura 3 - Atuação dos mediadores inflamatórios no ensaio de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton.....	28

CAPÍTULO 1

Figure 1 - Fig. 1. HPLC compound of <i>C. decandra</i> extract of <i>C. decandra</i> leaves. (1) rutin.....	38
Figure 2 - Effect of ethanolic extract (0.001-1 mg/ear) from <i>C. decandra</i> and dexamethasone (Dexa) (0.1 mg/ear) topically administered on acute ear edema (A), MPO activity (OD/mL sample) (B), histological changes (hematoxylin-eosin 200 and 400x) (C) and number polymorphonuclear cells per field (D) on mice ear topically treated with croton oil. Ear edema and MPO activity were measured at 6 h after croton oil treatment. Each bar represents the mean+S.E.M. for 5-6 animals. The arrows indicate the presence of inflammatory cells in the ear tissue. The graphic symbols denote the significance levels when compared with the control, vehicle or naive groups. ###P<0.001 when compared with the vehicle (A) and naive (B) groups; *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001 when compared with the control group (one-way ANOVA followed post hoc Newman-Keuls test).....	40
Figure 3 - Effect of rutin (0.003-0.03 mg/ear) and dexamethasone (Dexa) (0.1 mg/ear) topically administered on acute ear edema (A), MPO activity (OD/mL sample) (B), histological changes (hematoxylin-eosin 200 and 400x) (C) and number polymorphonuclear cells per field (D) on mice ear topically treated with croton oil. Ear edema and MPO activity were measured at 6 h after croton oil treatment. Each bar represents the mean+S.E.M. for 5-6 animals. The arrows indicate the presence of inflammatory cells in the ear tissue. The graphic symbols denote the significance levels when compared with the control, vehicle or naive groups. ###P<0.001 when compared with the vehicle (A) and naive (B) groups; **P<0.01 and ***P<0.001 when compared with the control group (one-way ANOVA followed post hoc Newman-Keuls test).....	41

LISTA DE TABELAS

Table 1 - IC50 (mg/mL) values of the DPPH and reducing power assay for crude extract of <i>C.decandra</i>	40
---	----

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABS – Absorbância

CAT- Catalase

CLAE- Cromatografia Líquida de alta eficiência

DPPH – 2,2- Diphenyl-1-picrylhydrazyl

EB - Extrato bruto

EROs – Espécie reativa de oxigênio

GPx – Glutathione peroxidase

GSH – Glutathione reduzida

mg/ear – Miligramas por orelha

mg/g – Miligramas por grama

MIN - Minuto

MPO – Mieloperoxidase

SOD – Superóxido dismutase

UV – Ultravioleta

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Manuscrito submetido ao periódico: Journal of Ethnopharmacology.....58

Anexo 2 – Aprovação do projeto de pesquisa pelo comitê de ética no uso de animais da Universidade Federal de Santa Maria.....59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 A FAMÍLIA SALICACEA	16
2.2 O GÊNERO CASEARIA	16
2.3 A ESPÉCIE <i>Casearia decandra jacq.</i>	17
2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	21
2.4.1 Produção de radicais livres	20
2.4.2 Estresse oxidativo e potencial antioxidante de compostos vegetais	21
2.5 INFLAMAÇÃO	25
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4 APRESENTAÇÃO CIENTÍFICA	32
4.1 Manuscrito 1- Submetido a Revista Journal of Ethnopharmacology.....	32
5. CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
Anexo 1- artigo submetido ao periódico: journal of ethnopharmacology	60
Anexo 2 – aprovação do projeto de pesquisa pelo comitê de ética no uso de animais da universidade federal de santa maria	61

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais foram e continuam sendo utilizadas no tratamento e prevenção de diversas patologias. A busca por alívio e cura de doenças através da ingestão de ervas, certamente tenha sido umas das primeiras formas de utilização dos produtos naturais, sendo assim, contribuem de forma relevante para a divulgação das propriedades terapêuticas (BUTLER, 2008; KINGSTON, 2011).

No Brasil, o emprego de plantas medicinais está presente desde antes da colonização, quando índios já as utilizavam e, em seguida, passaram seus conhecimentos para os colonizadores, tornando-as amplamente utilizadas na medicina caseira (LIMA et al., 2012). A história do desenvolvimento dos fármacos registra que, no início, os materiais vegetais eram utilizados da maneira como eram encontrados no meio ambiente e à medida que os avanços da química surgiram, as substâncias ativas puderam ser identificadas, isoladas e usadas como moléculas sinteticamente elaboradas, com atividade terapêutica ainda maior (AURICCHIO; BACCHI, 2003).

A biodiversidade dos vegetais constitui uma grande riqueza em potencial para a saúde humana, assim as plantas são fontes de produtos naturais biologicamente ativos (MACIEL et al., 2002). O Brasil possui uma grande biodiversidade, sendo considerada uma das maiores do mundo. De toda biodiversidade mundial, estima-se que cerca de 15 a 20%, esteja concentrada nesse país (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Calcula-se que 25 a 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivadas de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007). Tais condições tornam o país com grande potencial fitoquímico, o que intensifica a importância de estudos realizados nesta área com plantas da flora brasileira (DE MOURA et al., 2001).

O tratamento com uso de plantas medicinais em suas diversas formas farmacêuticas sem o uso de princípios ativos isolados é considerado uma terapêutica milenar conhecida como fitoterapia. (ARAÚJO et al., 2007). A fitoterapia está inserida como uma das alternativas indispensáveis devido à maior facilidade de acesso pela população, uso disseminado, menor custo e eficácia comparável aos medicamentos sintéticos. (MARIOT; BARBERI, 2007).

O estímulo ao uso destes fitoterápicos tem como objetivo: prevenir, curar ou minimizar os sintomas das doenças, com um custo mais acessível à população e aos serviços de saúde, comparativamente àqueles obtidos por síntese química, que são, em geral, mais caros, devido às patentes tecnológicas envolvidas (TOLEDO et al, 2003). Nos últimos anos cresceu notavelmente o interesse por terapias alternativas e pelo uso terapêutico de produtos naturais, principalmente aqueles obtidos de plantas (YUNES; CALIXTO, 2001).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a partir dos anos 1990 houve um grande aumento no uso da medicina tradicional, tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos, e a importância desse tipo de medicina vem crescendo globalmente, ampliando a necessidade de regulamentação específica para a prescrição e venda deste tipo de medicamento (OMS, 2005).

No Brasil, pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS), passaram a ter acesso a fitoterápicos em 2007 e no ano seguinte, o Governo Federal aprovou o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Este programa propõe regulamentar todas as etapas da cadeia produtiva deste tipo de medicamento, assim como ampliar e melhorar as condições para a pesquisa científica neste setor e proteger o patrimônio genético e conhecimento tradicional associados às plantas com propriedades medicinais (PORTAL BRASIL, 2012).

Pouco tempo atrás, foi aprovado o Formulário Fitoterápico, em sua 1ª edição, instituído pela resolução RDC 60/2011, publicada em 11 de Novembro de 2011. Esse formulário, que integra a Farmacopeia Brasileira, traz 83 monografias de medicamentos, como infusões, tinturas, xaropes e pomadas, estando nele informações sobre a forma correta de preparo e as indicações e restrições de uso de cada espécie (BRASIL, 2011).

No entanto grande parte das plantas utilizadas na medicina tradicional ainda não foram estudadas de modo a comprovar sua eficácia e segurança e seu uso popular não é suficiente para validá-las como medicamentos eficazes e seguros (LAPA et al., 2000).

E devido à infinidade de espécies vegetais e de substâncias químicas existentes na natureza, não é aconselhável que esses estudos sejam realizados de maneira randômica, pois demandaria muito tempo e as chances de sucesso seriam remotas. Uma abordagem que tem fornecido resultados promissores é a que se baseia em estudos etnofarmacológicos. Essa abordagem direciona as pesquisas

farmacológicas para plantas que já vêm sendo utilizadas popularmente em tratamentos medicinais (SANTOS, 2006).

Dentre as plantas utilizadas na medicina popular no Brasil, está a *Casearia decandra* Jacq, popularmente conhecida conhecida como cambroé, pitumba, cafezeiro do mato e guaçatonga (LORENZI, 2006). A espécie tem sido utilizada como antiofídica, cicatrizante, anti-inflamatória e antitérmica (GONÇALVES et al., 2009). Devido à grande utilização popular de *C. decandra* a escassez de estudos que comprovem tais efeitos, motivou-se a realização deste trabalho para que haja uma maior compreensão acerca de seus constituintes químicos e avaliação da atividade farmacológica dessa espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A FAMÍLIA SALICACEA

Numerosas são as famílias de plantas com representantes medicinais, destacando-se, dentre elas, Flacourtiaceae (ABSY; SCAVONE,1973). No entanto, cabe ressaltar que essa família, de acordo com o sistema filogenético de classificação mais recente, não existe mais, tendo seus representantes sido incluídos em duas outras famílias já existentes: Salicaceae e Achariaceae (STEVENS 2001, JUDD *et al.* 2007).

Salicaceae está circunscrita à ordem Malpighiales, de acordo com o Grupo de Filogenia das Angiospermas, e compreende predominantemente árvores e arbustos decíduos que perdem as folhas no outono/inverno. Possui cerca de 50 gêneros com cerca de 1000 espécies encontradas especialmente nas regiões tropicais e subtropicais (APG III, 2009). No Brasil ocorrem 19 gêneros e aproximadamente 80 espécies dessa família, sendo a mais conhecida o gênero *Salix* do qual foi obtido o ácido salicílico, que em sua forma acetilada originou o ácido acetilsalicílico (LORENZI; SOUZA, 2005). Os representantes do *táxon* são dioicos (plantas masculinas ou femininas) e possuem folhas simples, de disposição alterna, com estípulas e margens serradas (JOLY, 1998).

2.2 O GÊNERO CASEARIA

O gênero *Casearia* foi descrito por Jacquin (1760), sob o basônimo de *Samydanitida* L. Este, está incluído na Tribo *Casearieae* Benth e possui aproximadamente 180 espécies pantropicais. São típicas do continente americano e ocorrem desde o México e Antilhas até a América do Sul. As plantas pertencentes ao gênero *Casearia* são principalmente arbustos ou árvores, com troncos lenhosos e dependendo de onde ocorrem, podem apresentar diferenças na casca. No Brasil, ocorrem aproximadamente cerca de 43 espécies, habitando diversas formações vegetais, desde a Bahia até o Rio Grande do Sul (ESALQ, 2003).

Na medicina popular são utilizadas no mundo todo, por exemplo, *Casearia esculenta*, que ocorre na Índia, utilizada na medicina tradicional no tratamento de

diabetes (PRAKASAM et al., 2003). O potencial farmacológico desta e de outras espécies de *Casearia* vem sendo alvo de inúmeros estudos (HUNTER et al., 1997; PRAKASH et al., 2002; SHEN et al., 2005). Outros estudos fitoquímicos iniciais empenharam-se na identificação de metabólitos ou classes de metabólitos, que foram realizados com testes clássicos (coloração, precipitação), comparação com padrões em cromatografia em camada delgada comparativa e espectrometria de absorção no ultravioleta. Os resultados indicaram a presença de saponinas, flavonoides e alcaloides no extrato das folhas do gênero *Casearia* (CARVALHO, 2007).

Na flora brasileira, este gênero destaca-se por sua importância econômica. São plantas comuns no uso popular, utilizadas como depurativos do sangue. O suco de suas folhas também servem para mordedura de cobras (MARQUETE, 2005). No estudo realizado por Mosaddik et al. (2004) com plantas originárias da Austrália pertencentes a quatro gêneros da mesma família (Salicaceae) foi verificado que o gênero *Casearia* é o que mais se destaca em termos de atividade citotóxica, antioxidante e antimicrobiana. Este fato sugere que sejam desenvolvidas novas pesquisas sobre a composição química da planta e de sua relação com as propriedades biológicas apresentadas.

Um exemplo bastante utilizado e também objeto de investigação em diversas pesquisas é a espécie *Casearia sylvestris*. Para seu extrato bruto e substâncias puras, foram relatadas a ação inibidora de enzimas fosfolipase A2 de venenos de cobras e de algumas toxinas (RASLAN et al., 2002), atividades antiulcerogênica (SERTIÉ, 2000; ESTEVES et al., 2005), anti-hiperlipidêmica (SCHOENFELDER et al., 2008), antimutagênica em baixa concentração e mutagênica em alta concentração (OLIVEIRA et al., 2009), antimicrobiana (SILVA et al., 2008), anticolinesterásica (SILVA et al., 2006) e antiinflamatória observada no óleo das folhas (ESTEVES et al., 2005), salientado o potencial de exploração das espécies vegetais do mesmo gênero (CASTANHO, 2011).

2.3 A ESPÉCIE *Casearia decandra jacq.*

Popularmente conhecida como pitumba, guaçatunga e quina-do-pará, *C. decandra* Jacq. (Figura 1) distribui-se nas florestas da região Sul do Brasil e também no Uruguai, Paraguai e Argentina. É encontrada na forma de arbusto ou árvore (entre 8 -18 metros), com folhas alternadas dísticas, salpicadas de pelos glandulosos e serradas nas bordas. Suas flores apresentam-se em pequenas cimeiras auxiliares, são apétalas e brancas e os frutos são grandes e contém numerosas sementes envoltas em arilo carnosos amarelo (CORRÊA, 1978).

Figura 1 – Aspecto geral da *Casearia decandra jacq* - Foto: Eduardo Luís Hettwer Giehl.



Fonte: http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=99

Em relação à fenologia vegetativa a *C. decandra* apresenta queda das folhas nos meses de julho e agosto, no período do inverno em que as temperaturas são mais baixas. Intensa brotação ocorre no final do inverno (setembro) e durante toda a primavera (outubro, novembro e dezembro). A espécie possui folhas simples, membranáceas a cartáceas, glabras em ambas as faces, alternas, dísticas, assimétricas, elípticas ou ovaladas, com margem serrada que medem de 3 cm a 11 cm de comprimento por 2 cm a 6 cm de largura (BARROSO et al., 2002).

Na medicina popular *C. decandra* é indicada para controle de colesterol, problemas de ovário, úlceras gástricas, má-circulação, enxaquecas, próstata, coração, além das propriedades diuréticas. As folhas contém produtos químicos do grupo das casearinas, com atividades antitumoral. Em infusão alcoólica, a casca é usada em picadas de cobras e mosquitos. As cascas dos troncos e as folhas também são utilizadas popularmente como antitérmico e no combate às úlceras gastroduodenais. Entretanto, até então, não existem estudos relacionando a propriedade anti-inflamatória tópica dessa espécie em processos inflamatórios induzido por um agente irritante (PLANTAS BRASILEIRAS; 2002).

Extensivas investigações têm enfatizado as terapêuticas das espécies de Casearia, especialmente *C. sylvestris* e *C. decandra*, amplamente utilizadas na medicina popular como antisséptico e cicatrizante de doenças da pele; como anestésico; agente antitumorígeno (ITOKAWA et al., 1988, BOLZANI et al., 1999); antiofídico (BORGES et al., 2011) e contra úlcera (BASILE et al., 1990). Tais propriedades medicinais encontram-se apenas para duas espécies do gênero, *C. decandra* e *C. sylvestris* (SIQUEIRA, 1981; PIO CORRÊA, 1984), sendo *C. sylvestris* a única espécie incluída na Farmacopéia Brasileira e que apresenta estudos amplos relacionados à folha, a grande maioria deles direcionados para sua natureza fitoquímica (SILVA; BAUER, 1970).

Existem poucos estudos científicos reportados na literatura para a espécie *C. decandra*, Marins et al (2011) demonstraram a atividade antimicrobiana do extrato bruto e frações das folhas de *C. decandra*. Dentre as bactérias Gram-positivas que apresentaram os maiores halos de inibição está a fração acetato de etila frente *Staphylococcus epidermidis* e em relação aos resultados obtidos para as bactérias Gram negativas, a fração clorofórmio frente *Shigella flexneri*, apresentou o maior halo de inibição.

Até o presente momento Bento e colaboradores (2013) isolaram através de dados da análise do extrato etanólico de *C. decandra* (CG//EM) a hidroquinona livre e glicosilada. Os resultados das análises do extrato bruto e das frações isoladas por cromatografia preparativa mostraram que a hidroquinona ($R_f = 0,78$) inibiu o crescimento do fungo *C. sherospermum*. Em um outro estudo foi relatado os constituintes dos óleos essenciais das flores e folhas, sendo que os constituintes majoritários foram: *Ecariofileno* (13,0%) e *germacreno D* (11,2%) no óleo das folhas,

e espatulenol (19,6%) e tumbergol (18,6%) no óleo das flores de *C. decandra* (JÚNIOR et al., 2007).

2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

2.4.1 Produção de radicais livres

Todo componente celular está sujeito a sofrer danos oxidativos, exemplo disso são as moléculas que sofrem alterações funcionais quando oxidadas como os lipídios, as proteínas e os ácidos nucleicos. Os principais causadores destes danos oxidativos são os radicais livres (RL). Por definição, o termo radical livre refere-se a átomos ou moléculas altamente reativos, que contêm número ímpar de elétrons na última camada eletrônica e este não emparelhamento de elétrons da última camada é que lhes confere esta alta reatividade, tornando-os ávidos por retornar ao estado de equilíbrio eletrônico (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

Os RL, por serem extremamente reativos e instáveis, participam de reações com substâncias químicas orgânicas e inorgânicas, proteínas, lipídeos, carboidratos, particularmente moléculas importantes nas membranas celulares e ácidos nucleicos (LEMOS, 2006). Várias substâncias podem ser definidas como radicais livres, mas o maior interesse é pelas espécies reativas do oxigênio (ERO) (FELIPPE JR; PERCÁRIO, 1991; ADEGOKE et al., 1998). As principais EROs distribuem-se em dois grupos: os radicalares, incluindo hidroxila ($\bullet\text{OH}$), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila ($\text{ROO}\bullet$) e alcoxila ($\text{RO}\bullet$); e os não-radicalares: oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion hipoclorito (ClO^-) (CHATGILIALOGLU; O'NEILL, 2001;). As espécies reativas de oxigênio por serem altamente reativas podem causar danos celulares, principalmente em lipídios da membrana celular, proteínas e ácidos nucleicos (AGARWAL et al. 2006, NGO et al, 2009).

Por isso a presença de RL tem sido relacionada com grande número de doenças, não possuindo papel etiológico na grande maioria dos estados patológicos, mas que participam diretamente dos mecanismos fisiopatológicos que determinam a continuidade e as complicações presentes nestes processos. Estudos indicam que os RL agem acelerando o processo degenerativo e a perda da estabilidade celular, provocando situações adversas ao organismo e seus tecidos, favorecendo a perda

da homeostasia do meio interno (RUSSO et al., 2002; SOUSA et al., 2007; ARDESTANI; YASDANPARAST, 2007).

2.4.2 Estresse oxidativo e potencial antioxidante de compostos vegetais

O estresse oxidativo surge quando existe um desequilíbrio entre a produção oxidante e a capacidade de eliminação dos sistemas protetores, também denominados de sistemas antioxidantes (JACKSON et al, 2005). Desse modo, o estresse oxidativo pode resultar tanto de um aumento na produção de EROs quanto da redução da capacidade antioxidante celular total. (SILVA et al., 2005).

O estresse oxidativo é uma condição celular ou fisiológica de altas concentrações de EROs que causa danos moleculares às estruturas celulares, tem sido relacionado à instalação e progressão de diversas doenças degenerativas, através de mutação do DNA, oxidação proteica e peroxidação lipídica (VALKO et al., 2006; VALKO, 2007) com conseqüente alteração funcional e prejuízo das funções vitais em diversos tecidos ou órgãos (HALLIWELL, 1992). O efeito deletério do estresse oxidativo varia consideravelmente de um ser vivo para o outro, de acordo com a idade, o estado fisiológico e a dieta. Hábitos de vida inapropriados, tais como a ingestão de álcool, fumo e dieta inadequada; condições ambientais impróprias, tais como a exposição à radiação não ionizante UV e ondas curtas; poluição; alta umidade relativa e temperatura elevada; estados psicológicos que provocam estresse emocional; envelhecimento, também estão associados ao estresse oxidativo (VANCINI et al., 2005).

Os níveis elevados de EROs no organismo podem causar efeitos deletérios e parecem ser um dos maiores responsáveis pelo processo de envelhecimento (HARMAN,1992) e por muitos processos degenerativos como o câncer, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, cataratas, entre outros (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Os estudos também revelaram que estas espécies também podem estar relacionadas a doenças inflamatórias, tais como artrite crônica, enfisema de pulmão e aterosclerose (SIES, 1997).

O excesso de RL no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo organismo ou absorvidos da dieta. De acordo com Halliwell (2000), antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à

do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo. Nos organismos vivos a produção de radicais livres é controlada por compostos antioxidantes de origem endógena capazes de reduzir a ação de ERO, como a SOD, CAT e GPx, ou de forma não-enzimática, GSH ou serem provenientes de outras fontes, como por exemplo alimentar, tais como α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (pro-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides) (BARREIROS et al., 2006).

Substâncias com atividade antioxidante são preconizadas há muito tempo como promotores de melhora do estado de saúde em condições patológicas como a inflamação, embora existam muitas controversas e muitos antioxidantes ainda necessitem de mais estudos para a comprovação de seus efeitos benéficos para a saúde humana (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010). Sendo assim, o emprego de compostos capazes de capturar RL surge como uma alternativa na terapia de várias doenças, o que tornam importantes as pesquisas de novos compostos capazes de inibir processos oxidativos (BARREIROS al., 2006).

As características farmacológicas das espécies vegetais são originadas de compostos químicos formados, degradados ou transformados a partir do metabolismo das mesmas, esses compostos são denominados metabólitos. Os metabólitos podem ser divididos em primários e secundários. Dentre os metabólitos primários incluem-se os carboidratos, as proteínas, os aminoácidos, os ácidos nucléicos (DNA e RNA) e ácidos orgânicos. As funções biológicas do organismo estão relacionadas principalmente à produção dos metabólitos primários como, as funções de um gene, a produção de proteínas específicas e outros. Os metabólitos secundários (MS), por sua vez, são produtos do metabolismo dos organismos, produzidos a partir dos metabólitos primários e se caracterizam por atuarem como substâncias tóxicas contra competidores, predadores e parasitas, como bactérias, fungos, plantas, protozoários, insetos e vírus (MAGALHÃES, 2006). Além disso, são importantes para a sobrevivência e a perpetuação das plantas, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, sendo compostos fenólicos, terpenoides, óleos essenciais e alcaloides, entre outros. São esses compostos os responsáveis pelos efeitos medicinais ou tóxicos das plantas, estando intimamente associados à estratégia de defesa dos vegetais (SANTOS et al., 2010; SIMÕES et al., 2010).

Muitos metabólitos secundários são considerados materiais especiais muito valorizados no mercado, sendo usados comercialmente como compostos biologicamente ativos. A utilidade comercial dos MS pode ser exemplificada pela nicotina, morfina, cocaína, óleos de eucalipto, eugenol e outros. Estes metabólitos têm sido usadas como estratégia para descoberta de novos compostos biologicamente ativos, tal como a presença da atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antiulcerogênica, entre outras (PIETROVSKI *et al.*, 2008 ;SILVEIRA *et al.*, 2009).

Assim, a avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, ligninas, tem sido objeto de incessantes estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais. Muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de futuramente virem a ser aproveitadas como agentes medicinais (CECHINEL; YUNES, 1998).

Neste contexto, as propriedades antioxidantes dos compostos polifenólicos das plantas foram sugeridas como promotoras de um papel importante na manutenção da saúde humana e na prevenção de várias doenças. (MONTORO *et al.*, 2004). As substâncias presentes em plantas que possuem núcleo fenólico como: tocoferol, flavonoides, carotenoides, terpenoides, fenólicos e taninos, apresentam destaque especial como antioxidantes, pois podem atuar como captadores de ERO e também podem reduzir e quelar íons ferro catalizadores de peroxidação lipídica (BARREIROS 2006). Reações químicas que avaliam a capacidade antioxidante direta da molécula baseiam-se em características da substância em ser uma boa seqüestradora de elétrons.

A capacidade antioxidante de um produto natural também pode estar relacionada à ativação de proteínas celulares que auxiliam na eliminação de EROs. Assim, torna-se necessário avaliar os tipos de interações dos produtos naturais, a fim, de verificar se eles apresentam ou não caráter antioxidante. (HUANG *et al.*, 2011).

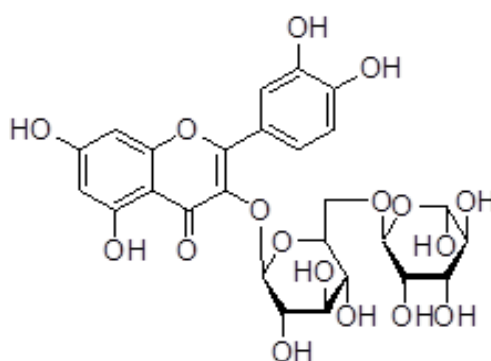
As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas à sua capacidade de sequestrar os radicais livres, por serem ricos em hidroxilas, são capazes de reagir com as ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) e, dessa forma, podendo ser úteis no tratamento de algumas doenças por inibir ou retardar significativamente os processos oxidativos (DECKER, 1997; VIEGAS JUNIOR *et al.*,

2006). Os flavonoides são encontrados em folhas, flores, raízes ou frutos, são provenientes do metabolismo secundários das plantas e podem apresentar diferentes concentrações, dependendo do vegetal. Revelam propriedades importantes e atuam como anticarcinogênicos, anti-inflamatórios, antialérgicos, antivirais, dentre outros (SIMÕES, 2003).

O potencial antioxidante e o teor de fenólicos totais e flavonoides também podem ser úteis para promover outras investigações e correlacionar esta atividade a outras importantes, como, por exemplo, à atividade anti-inflamatória. Vários trabalhos na literatura sugerem a correlação entre as atividades antioxidante e anti-inflamatória (THAMBI et al., 2006). A bioatividade dos fenólicos pode ser atribuída à sua capacidade de quelar metais, inibir a peroxidação lipídica e sequestrar radicais livres (CHEUNG; CHEUNG, 2003).

A rutina (Figura 2), é um tipo de flavonoide empregada como potente antioxidante e de grande interesse farmacológico para saúde humana, já que muitas propriedades têm sido relatadas e atribuídas para a rutina, incluindo antialérgica, anti-inflamatória, antibacteriano, propriedades antiplaquetárias, antiespasmódico, antivirais, antiúlcera, antidiarreico, vasodilatador, citoprotetora, antihipertensivo, antimutagênica e proteção contra o estresse nitrosativo e lesão hepatocelular (BRUNETON, 1991; JANBAZ et al., 2002; CALABRÒ et al., 2005; YANG et al., 2008; DOMITROVIC et al., 2012; MAHMOUD, 2012;).

Figura 2 - Estrutura química da rutina.



rutina

Estudos antioxidantes que já foram realizados com a rutina inclui a atividade antioxidante total, poder redutor, atividade quelante do ferro e atividade de limpeza do $\cdot\text{OH}$ e do $\text{O}_2^{\cdot-}$, método do DPPH \cdot e de peroxidação lipídica (YANG *et al.*, 2008; LUE *et al.*, 2010). Além disso possui ampla gama de propriedades biológicas, tais como, promoção de efeitos benéficos em diversas doenças, as quais estão envolvidas com a peroxidação lipídica descontrolada, capacidade de interagir com proteínas fosforilantes, é empregada na prevenção ou tratamento da insuficiência venosa ou linfática e da fragilidade ou permeabilidade capilar, além de outras atividades farmacológicas relatadas, como seu efeito sobre o sistema imunológico, células inflamatórias e até mesmo efeito anticarcinogênico. (BRUNETON, 1991; ROLIM, *et al.*, 2005; VELASCO *et al.*, 2008).

2.5 INFLAMAÇÃO

A pele exerce diversas funções fisiológicas essenciais à vida e apresenta um papel importante de proteção, termo regulação, resposta imunológica, bem como manutenção e desenvolvimento de defesa, uma vez que está constantemente sujeita a estímulos externos. Tais estímulos desencadeiam uma resposta imediata de proteção ao organismo, denominada resposta inflamatória (FIRESTEIN, 2004).

A inflamação, segundo Silva e Carvalho (2004), é uma resposta protetora imediata que ocorre nos tecidos circunjacentes a uma destruição ou área de destruição celular. Resulta da produção local de inúmeros mediadores a partir de fontes humorais ou celulares, e estes são os responsáveis pela uniformidade da reação inflamatória, independente da natureza do agente agressor. Pode ser causada por um agente infeccioso, isquemia, injúrias ocasionando lesão tecidual associada aos danos causados pelos radicais livres, formados principalmente a partir dos neutrófilos na presença da enzima mieloperoxidase (MPO) durante a fase tardia do processo inflamatório.

A liberação de RL no local da lesão pode contribuir na modulação da resposta inflamatória, como exemplo, estimulando a liberação de citocinas, moléculas de adesão e agentes quimiotáticos, contribuindo ainda mais para a manutenção da inflamação (NASCIMENTO, 2013). Portanto o processo inflamatório tem como

objetivo proteger o organismo contra infecções, eliminar patógenos, e reparar os tecidos após eventuais danos (MONTENEGRO; FRANCO, 2008).

A resposta inflamatória é caracterizada, a nível clínico, por quatro sinais clássicos, que incluem calor, eritema, edema e dor. Mas, uma resposta inflamatória exacerbada pode promover uma descompensação fisiológica, levando a perda de função do tecido e/ou órgão (SERHAN; SAVILL, 2005).

Para que a resposta inflamatória torne-se evidente, é necessário que ocorra diversos mecanismos hemodinâmicos. (MEDZHITOV, 2008). Dentre os eventos hemodinâmicos, o extravasamento de plasma rico em proteínas para o espaço extravascular ocorre por uma redução da velocidade do fluxo sanguíneo que é resultado do aumento da permeabilidade vascular e do fluxo sanguíneo, explicando, portanto, o desenvolvimento do edema durante a inflamação (WILLIAMS, 2006; MEDZHITOV, 2008). O edema é causado pelo fluxo transvascular de um fluido rico em proteínas (plasma) do compartimento intravascular para o interstício como resultado da ação de vários mediadores como histamina, bradicinina, leucotrienos, componentes do sistema complemento, substância P e fator de ativação de plaquetas (FRIEDL et al., 1989).

Os mediadores pró-inflamatórios liberados durante o processo inflamatório, tanto pelas células residentes do tecido cutâneo quanto pelas células transientes (neutrófilos, linfócitos, monócitos), incluem os metabólitos do ácido araquidônico (AA), histamina, serotonina, substância P, citocinas, óxido nítrico (NO) e EROs (KUPPER, 1990; SIMMONS, 2006). Os leucócitos, especificamente os neutrófilos e macrófagos, dão continuidade a fase inflamatória e são os principais efetores responsáveis pela fagocitose e eliminação de agentes invasores durante a inflamação, representando, desta forma, um dos componentes mais importantes da resposta inflamatória (FREINKEL; WOODLEY, 2001; MEDZHITOV, 2008).

Em um estado fisiológico normal a resposta inflamatória é benéfica, uma vez que protege o tecido contra danos, por exemplo, na defesa contra tumores e infecções. Porém, a desregulação de qualquer um dos fatores que atuam na resposta inflamatória pode levar a anormalidades e, em alguns casos, levar à patologias (MUELLER, 2006). Um processo inflamatório crônico tem sido considerada a base de muitas doenças, incluindo doenças cutâneas como eczemas, psoríase e dermatites (LEBWOHL, 2003). Doenças inflamatórias de pele são muito frequentes, embora algumas sejam transitórias e não induzem sérios danos. Porém,

alguns tipos de doença inflamatória podem tornar-se condições crônicas, reduzindo a qualidade de vida dos pacientes acometidos por essas (FYHRQUIST; VANNI *et al.*, 2007).

Além disso, poucos tratamentos são efetivos para esses tipos de doenças de pele e, grande parte desses, apresentam efeitos adversos, que limitam seu uso a longo-prazo. Como exemplo, encontram-se os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e os agentes imunossupressores no qual são os mais utilizados na clínica para tratar doenças inflamatórias de pele. Visto que já tenha sido comprovada sua efetividade, esses produzem efeitos adversos, que limitam seu uso (LAIHIA, *et al.*, 2012).

O modelo *in vivo* de edema de orelha é amplamente utilizado para demonstrar a atividade tópica de substâncias bioativas em inflamações cutâneas (BLAZSÓ; GÁBOR, 1995; GÁBOR, 2000). Esse modelo pode ser realizado em camundongos e é importante para avaliar se os agentes farmacológicos ou produtos naturais serão capazes de bloquear a resposta inflamatória induzida pela aplicação tópica de agentes irritantes (CONNEY *et al.*, 1991). Esse teste se caracteriza por demonstrar resultados rápidos, simplicidade da técnica, reprodutibilidade e baixas possibilidades de erros quando bem aplicado, além de ser um modelo que minimiza uso de animais e de substâncias (GÁBOR, 2000). Apesar de ser um modelo simples, esse é capaz de obter de forma clara e significativa uma resposta farmacológica, mesmo utilizando baixas quantidades das substâncias, através do tratamento com extratos de produtos naturais (VALLE *et al.*, 2014).

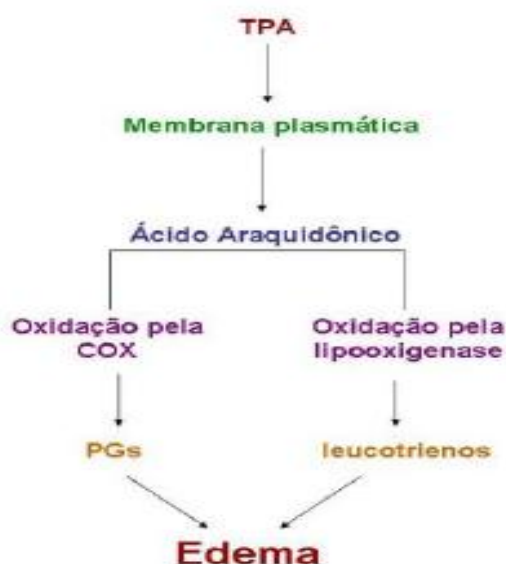
Outra técnica utilizada para analisar a atividade anti-inflamatória é a de migração celular. A MPO uma enzima derivada de leucócitos que catalisa a formação de numerosas espécies reativas oxidantes, é considerada uma macromolécula-chave na resposta imunológica inespecífica a muitos agentes invasores, especialmente bactérias, sendo que uma maior atividade observada na enzima indica a migração de células polimorfonucleares para o local inflamado (ROMAN *et al.*, 2008; IGNOATO *et al.* 2012).

O óleo de cróton tem sido descrito como um irritante que induz o infiltrado de neutrófilos, produção de prostaglandinas e edema em animais (RAO *et al.*, 1993). Apresenta como princípio ativo majoritário o 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA), um éster de forbol, potente agente flogístico e promotor de tumor, capaz de promover uma resposta inflamatória e hiperproliferativa bastante intensa,

assemelhando-se com algumas doenças cutâneas (GÁBOR, 2000; GÁBOR, 2003). Zhang *et al.* (2000), demonstraram que a aplicação de óleo de cróton na orelha de camundongos desencadeia uma resposta inflamatória independente de células T, sendo mediada por células do sistema imune inato. O éster de forbol exerce seus efeitos através da ativação da proteína quinase C (PKC), e a sequência de ativação da via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), fosfolipase A₂ (PLA₂) e expressão da cicloxigenase (COX-2), resultando na síntese e liberação de várias citocinas pró-inflamatórias, promovendo uma resposta inflamatória.

No edema de orelha, não há liberação de histamina, sendo as prostaglandinas e leucotrienos os mediadores da inflamação predominantes em um período de 6 h após a indução do edema (GÁBOR, 2003). A Figura 3 demonstra a resposta inflamatória desencadeada nesse modelo.

Figura 3 - Atuação dos mediadores inflamatórios no ensaio de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton.



Fonte: Adaptado de ALBERTS *et al.*, 1997.

Pela complexidade de mecanismos que o óleo de cróton exerce seu efeito tóxico e as alternativas de tratamento da doença, que se restringem a utilização de

corticoides tópicos, os quais causam diversos efeitos adversos (YAMAURA *et al.*, 2012). As preparações de plantas, por sua vez, freqüentemente inibem mais de uma via de ação, maximizando os efeitos anti-inflamatórios e minimizando efeitos adversos (SCHMITZ; BACHER, 2005). Isso se deve ao fato de haver uma mistura de substâncias que podem agir sinergicamente ou antagonicamente, através de diferentes mecanismos de ação. Além disso, sugere-se que compostos derivados de plantas possam ser utilizados na forma de monopreparados ou em associação aos medicamentos atuais, com o objetivo de diminuir custos e aumentar eficácia (CALIXTO *et al.*, 2004).

Dessa forma, fontes de produtos naturais, incluindo compostos de diversas plantas, têm sido usadas como estratégia para descoberta de novos compostos biologicamente ativos (PIETROVSKI *et al.*, 2008). Aproximadamente 300 preparações de plantas medicinais destinadas ao tratamento de doenças inflamatórias cutâneas, tiveram sua eficácia comprovada e seu uso tradicional validado pela Comissão e Corpo Científico Responsável pela Validação de Plantas Medicinais na Alemanha, sendo que 40 são destinadas ao uso na dermatologia e 10 plantas têm papel significativo na prática terapêutica, nas quais estão incluídas a *Arnica montana*, *Calendula officinalis*, *Matricaria recutita*, *Echinacea sp.*, *Sanguinária canadenses*, *Hammamelis virginiana*, *Aveno sativa*, *Aloe Vera* e *Hypericum perforatum* (BEDI e SHENEFELT, 2002; DATTNER, 2003; MEYER *et al.*, 2000).

Muitos metabólitos secundários derivados de plantas são conhecidos por atuarem em moléculas ou interferirem no mecanismo de ação de: mediadores inflamatórios (metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, aminoácidos excitatórios), produção e ação de segundos mensageiros (cGMP, cAMP, proteínas quinases, cálcio), expressão dos fatores de transcrição, expressão de moléculas pró-inflamatórias incluindo, iNOS, COX-2, IL-1, TNF-, neuropeptídeos e proteases (CALIXTO *et al.*, 2003). Além disso, de acordo com alguns estudos, a atividade antiinflamatória dos flavonóides ocorre via modulação de enzimas relacionadas com o metabolismo do AA, como a PLA₂, COX e/ou LOX, bem como a inibição do fator de transcrição nuclear (NF-κB), dependendo da estrutura do composto (YANAMOTO; GAYNOR, 2001; PARK *et al.*, 2003), justificando assim o uso tradicional de muitos extratos de plantas como antiinflamatórios, cujos constituintes fitoquímicos presentes são os flavonóides (PARK *et al.*, 2003).

A homeostase entre a produção de antioxidantes e pró-oxidantes nas doenças inflamatórias pode ser afetada, acarretando um aumento na produção de EROs, que por sua vez, destroem o agente responsável pelo processo inflamatório. Tal produção excessiva leva à injúria tecidual pelo dano causado às macromoléculas e lipoperoxidação de membranas. Vários fármacos anti inflamatórios têm mostrado um mecanismo antioxidante como parte de sua atividade biológica. Entre tais fármacos pode-se citar o nimesulida (FACINO et al., 1993), aminosalicilatos, entre outros. Assim o estudo da atividade e do mecanismo antioxidante dos extratos naturais utilizados na medicina tradicional com finalidade anti-inflamatória se tornou igualmente interessante (MILES; GRISHAM, 1994).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e realizar o doseamento dos principais metabólitos secundários presentes nas folhas do extrato bruto de *Casearia decandra*, bem como avaliar sua possível capacidade antioxidante e anti-inflamatória tópica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar doseamento de flavonoides e polifenóis totais no extrato bruto;
- ✓ Determinar a capacidade antioxidante pelo método do DPPH e pelo método do poder redutor do Ferro no extrato bruto;
- ✓ Determinar o perfil cromatográfico do extrato bruto das folhas da espécie a fim de identificar sua composição química por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e quantificá-los se presentes.
- ✓ Caracterizar o edema de orelha induzido pela única aplicação tópica de óleo de cróton;
- ✓ Verificar a possível atividade anti-inflamatória tópica do extrato bruto de *C. decandra* e do composto isolado rutina sobre o edema de orelha agudo induzido por óleo de cróton;
- ✓ Avaliar a infiltração leucocitária, por método enzimático e histológico no edema de orelha agudo induzido por óleo de cróton em camundongos tratados com extrato bruto de *C. decandra* e rutina.

4 APRESENTAÇÃO CIENTÍFICA

As sessões Materiais e Métodos, Resultados e Discussão encontram-se na forma de manuscrito o qual foi submetido no periódico Journal of Ethnopharmacology.

4.1 Manuscrito 1- Submetido a Revista Journal of Ethnopharmacology

RESEARCH ARTICLE

Casearia decandra Jacq. crude extract presents topical anti-inflammatory and antioxidant activities

Bianca Vargas Belke ^a, Camila Camponogara ^b, Thiele Faccim de Brum ^a, Roberta da Silva Jesus ^a, Mariana Piana ^a, Aline Augusti Boligon ^a, Sara Marchesan Oliveira ^b, Liliane de Freitas Bauermann ^a

RESEARCH ARTICLE

Casearia decandra Jacq. crude extract presents topical anti-inflammatory and antioxidant activities

Bianca Vargas Belke ^a, Camila Camponogara ^b, Thiele Faccim de Brum ^a, Roberta da Silva Jesus ^a, Mariana Piana ^a, Aline Augusti Boligon ^a, Sara Marchesan Oliveira ^b, Liliane de Freitas Bauermann ^a

^a Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi Campus, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

^b Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Camobi Campus, Santa Maria, RS 97105- 900, Brazil

Abstract

Casearia decandra, popularly known as "guaçatonga" is widely used in popular medicine to treat inflammatory conditions. The aim of this study was to evaluate an in vivo anti-inflammatory activity and to correlate this activity with the non-extracting antioxidant compounds of *C. decandra* leaves. In order to verify the topical anti-inflammatory effect of from leaves of *Casearia decandra*, it was tested in mice croton oil induced inflammation. Our findings show that topical application of *C. decandra* extract was significantly active in inhibiting both edema (inhibition of $70 \pm 5\%$ and an ID_{50} values of 0,02 (range:0.006-0.09) mg/ear) and MPO activity (inhibition of $42 \pm 4\%$) in mice ear treated with croton oil. The treatment with the extract also presents satisfactory results. Rutin caused a reduction in edema formation ($78 \pm 10\%$) and MPO activity inhibition = $30 \pm 8\%$. In addition, one feature presented antioxidant potential by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and reducing power which may be related to a presence of the compound. Taken together, these results suggest a

topical anti-inflammatory activity for *C. decandra* species confirming its popular use for the local treatment of cutaneous inflammatory disorders.

Keywords: *Casearia decandra*, Guaçatonga, Antioxidant activity, Anti-inflammatory activity

1. Introduction

The *Casearia decandra*, popularly known as "guaçatonga", "pitumba", is a species belonging to the family Salicaceae, found throughout Brazil (Lorenzi.,2006). In popular medicine it has been used as antiophidic, healing, anti-inflammatory and antipyretic (Gonçalves et al., 2009). In addition, studies reveal that it presents pharmacological response in experimental models of gastric ulcer (Menezes, 2004). However, until then, there have been no studies relating the topical anti-inflammatory property of this species.

Inflammation is a physiological process consisting of the organic response to the injury, involving an action between the immune system and the tissue in which the injury occurred (Ward, 2010). During this process, high levels of ROS are also produced to exert a defense against pathogens (Huang et al., 2012).

In this context, phenolic compounds present redox potential, which allows them to act as hydrogen donor agents and metal chelators and scavenger activity of ROS in the inflammatory process (Pietta.,2000). Moreover, the effects of some phenolic compounds are related to the increased activity of antioxidant enzymes and induction of the synthesis of antioxidant proteins (Chung et al., 2006).

Given the diversity of the popular use of this plant and lack of research, mainly on the study of the leaves, the present study aimed to investigate the antioxidant and anti-inflammatory in vivo extract of *C. decandra* leaves and relate these activities, confirming their popular use.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

All chemicals were of analytical grade. Solvent for the extractions, folin-ciocalteu reagent, iron sulfate, potassium ferricyanide, trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich Co.), anhydrous ferric chloride, ascorbic acid, hematoxylin–eosin and paraffin were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Croton oil, hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), tetramethylbenzidine (TMB), dexamethasone, gallic, ascorbic, rosmarinic, chlorogenic and caffeic acids, quercetin, rutin, DPPH, Tris–HCl, isoflurane (Baxter, São Paulo, Brazil), sodium acetate, acetone, absolute ethanol, acetic acid, formaldehyde (all from Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) were used.

2.2. Plant collection and extractions

Leaves of *Casearia decandra* Jacq. were collected at Capão da Canoa in Rio Grande do Sul in december of 2013. A dried voucher specimen is preserved in the herbarium of the Department of forest sciences at Federal University of Santa Maria by register number HDCF 5757. The leaves were dried at room temperature and powdered in a knife mill. The powder of leaves was macerated at room temperature with 70% ethanol for a week with daily shake-up. After filtration, the extract was evaporated under reduced pressure to remove the ethanol, the aqueous extract was dried in a stove (temperature above 40 °C) to produce the extract.

2.3. Phytochemical analysis

2.3.1. Total polyphenols content

The determination of total phenolic content was performed by the Folin e Ciocalteu method with slightly modifications (Chandra and Meja., 2004). The samples were prepared at a concentration of 0.15 mg/mL. Absorbance was measured at 730 nm, in triplicate. Gallic acid was used in the calibration curve. The results were displayed in mg of gallic acid equivalents per g of extract (mg GAE/g).

2.3.2. Total flavonoids content

Total flavonoids were determined according to a slightly modified colorimetric method described by Woisky and Salatino (1998). Briefly, AlCl₃ solution was added to a aliquot of the sample and after 15 min the absorbance was verified at 420 nm, in

triplicate. The data were calculated based on the calibration curve of rutin and expressed in mg of rutin equivalents per g of extract (mg RE/g).

2.3.4. HPLC analysis polyphenols

High performance liquid chromatography was performed with a Prominence Auto-Sampler (SIL-20A) equipped with Shimadzu LC-20AT (Shimadzu, Kyoto, Japan) reciprocating pumps connected to a DGU-20A5 degasser and CBM-20A integrator. UV-VIS detector DAD SPD-M20A and Software LC solution 1.22 SP1 were used. Reversed phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using a C-18 column (250 mm_4.6 mm) packed with 5 µm diameter particles. The mobile phase comprising of solvent 1 (water containing 2% acetic acid) and Solvent 2 (methanol), according to method of Evaristo e Leitão, (2001) with modifications. The flow rate used was 0.8 mL/min and 40 µL of injection volume. The identification of the phenolics was performed by comparing retention times and the Diode-Array-UV spectra with those of standards. Stock solutions (0.00625–0.250 mg/mL) of chlorogenic, caffeic, rosmarinic and gallic acids and rutin, as well as extract samples of *C. decandra* were dissolved in the mobile phase. Quantification was carried out by integration of the peaks using the external standard method. All chromatographic operations were performed in triplicate.

2.4. Antioxidant activity

2.4.1. DPPH test

The radical - scavenging activity of the *C. decandra* extract was quantified in the presence of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) stable radical, according to a slightly modified method previously described by Choi *et al.*(2002). Briefly, the extract samples were tested at 7.81, 15.62, 31.25, 62.50, 125 and 250 mg/mL. Each sample was mixed with 1.0 mL 0.3 mM of DPPH in ethanol solution and, after 30 min the absorption was measured at 518 nm. Ascorbic acid in the same concentrations was used as positive control. The test was performed in triplicate and the calculation of the radical scavenging capacity (%) followed the equation:

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \frac{[(\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) \times 100]}{\text{Abs}_{\text{control}}}$$

Where: Abs_{sample} is absorbance of each fraction; Abs_{blank} is absorbance of the samples without adding the DPPH; $Abs_{control}$ is absorbance the solution of ethanol in DPPH.

2.4.2 Reducing power assay

The total reducing power of the *C. decandra* extract was determined according to the method of Berker *et al.*(2010). Volumes of 2.5 mL of different concentrations of the extracts (31.25, 62.5, 125, 500 and 1000 $\mu\text{g/mL}$) were mixed with 2.5 mL 0.2 M PBS, pH = 6.6 and 2.5 mL of 1% potassium ferricyanide $K_3[Fe(CN)_6]$ in test tubes. The mixture was placed in a water bath at 50°C , for 20 min. Then, 2.5 mL of 10% trichloroacetic acid was added to the mixture and mixed thoroughly. A volume of 2.5 mL of this mixture was then added to 2.5 mL of distilled water and 0.5 mL of $FeCl_3$ (0.1% solution) and allowed to stand for 10 min. Then, the absorbance of this mixture was measured at 700 nm using a UV-VIS spectrophotometer. A higher absorbance indicated a higher reducing power. IC_{50} value ($\mu\text{g extract/mL}$) is the effective concentration for reducing power and ascorbic acid was used as a positive control.

2.5. Anti-inflammatory activity

2.5.1 Animals

Male adult Swiss mice (25-30 g) were kept at $22\pm 2^\circ\text{C}$ and 60-80% humidity under a 12 h/ light-dark cycle and with standard laboratory food and water *ad libitum*. The animals were habituated to the room experimental at least 1 h before the experiments. All experiments were performed between 8:00 a.m. and 5:00 p.m. and were conducted in accordance with national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA – and of U.S. Public Health Service's Policy on Humane care and Use of Laboratory Animals – PHS Policy) and all procedures were approved by Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria (Process number 8970291015/2015). All

behavioral studies followed the Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines (McGrath et al., 2010) and the number of animals used in each experimental group was described in the figures and tables captions. Animals were randomly assigned in different treatment groups and behavioral evaluations were carried out blindly with respect to drug administration. The number of animals and intensity of stimuli was the minimum necessary to verify the consistent effects of treatments.

2.5.2 *In vivo* experimental design

2.5.2.1 Treatments

The *C. decandra* ethanolic extract (0.001-1 mg/ear) and rutin (0.003-0.03 mg/ear), croton oil (1 mg/ear; irritant agent) and dexamethasone (0.1 mg/ear; positive control) were topically applied on the right ear of each mouse.

2.5.3 Croton-oil-induced acute ear edema

Acute ear edema was induced by unique topical application of croton oil (1 mg/ear). The ethanolic extract (0.001-1 mg/ear), rutin (0.003-0.03 mg/ear; 0.03 mg the amount presents in 1 mg of ethanolic extract) of *C. decandra* and dexamethasone (0.1 mg/ear) were performed right after croton oil-induced skin inflammation. All treatments and the irritant agent were dissolved in 20 μ L acetone and applied in right mice ear. The ear thickness was measured before and at 6 h after the croton oil application. Six hours after acute ear edema induction, the animals were euthanized and ear biopsies were taken for further analysis (Brum et al., 2016; Piana et al., 2016).

2.5.3.1 Ear edema measurement

The skin inflammation process was induced through topical application of croton oil (irritant agent) and it was evaluated by ear edema development. The ear edema was assessed before (baseline) and at the time greater edematogenic effect

of the croton oil using a digital micrometer (Digimes) in animals previously anesthetized with isoflurane. The micrometer was applied near the tip of the ear just distal to the cartilaginous ridges. At the end of the stipulated period of exposure of irritant agent, the ear edema formation was evaluated by ear thickness increase and it was expressed as ear thickness variation in μm (Adami et al., 2012; Brum et al., 2016; Piana et al., 2016). To minimize variation, a single investigator carried out the measurements throughout each experiment.

2.5.4. Assessment of leukocyte infiltration

2.5.4.1 Measurement of MPO activity

MPO is an enzyme found in cells of myeloid origin and has been used as a biochemical marker of polymorphonuclear leukocyte and its activity is directly related to the amount neutrophil infiltrated in the injured tissue. MPO activity was determined as described previously (Oliveira et al., 2014; Piana et al., 2016). The MPO enzyme activity was evaluated in the ear samples after 6 h of the skin inflammation induction by croton oil. Tissue samples were homogenized with motor-driven homogenizer in acetate buffer (8 mM, pH 5.4) containing hexadecyltrimethylammonium (HTAB). The results were expressed as optical density (OD)/ mL of sample.

2.5.4.2 Histological analysis

Mice different groups were used to evaluate histological changes in animal's ear at 6 h after irritant agent application or irritant agent plus treatments. Mice were euthanized and the right ear were removed and fixed in an alfac solution (16:2:1 mixture of ethanol 80%, formaldehyde 40% and acetic acid. Each sample was embedded in paraffin was, sectioned at 5 μm and stained with hematoxylin-eosin. A representative area was selected for qualitative light microscopic analysis of the inflammatory cellular response with a 20x and 40x objectives (Oliveira et al., 2014; Piana et al., 2016). To minimize a source of bias, the investigator did not know the group that they were analyzing.

2.6. Statistical analyses

A calibration curve was used for the phytochemical composition, the experimental values were expressed as mean \pm S.D. For antioxidant activity values of SC_{50} (scavenging concentration required for to inhibit the DPPH radical levels in 50%) were obtained by linear regression and expressed as mean \pm SEM. In the anti-

inflammatory activity the results are presented as mean \pm SEM with exception of the ID₅₀ values (dose required to reduce the responses of the treated groups by 50% relative to the control group), which are reported as geometric means plus their respective 95% confidence limits. The maximum effect (E_{max}) was calculated based on the response of the control groups. The statistical significance between the groups was assessed by one-way ANOVA followed by a post hoc Newman–Keuls test. The accepted level of significance for the test was $P < 0.05$ and calculations were performed using GraphPad Prism version 5.00 statistical software, San Diego California, USA.

3. Results

3.1 Phytochemical analysis

In the phytochemical analysis of extract it was possible to identify the presence of polyphenols and flavonoids. In determining the total phenols by Folin-Ciocalteu method were found in the amount of extract 120.40 ± 1.95 EAG /g expressed as gallic acid equivalents per gram of crude extract and flavonoids found in the extract an amount of 106.56 ± 2.70 ER / g of flavonoids. HPLC analysis revealed the presence of the rutin flavonoid (27.81 ± 1.11 mg/g) in the crude extract of *C. decandra*. The chromatogram of the compounds is shown in Fig. 1.

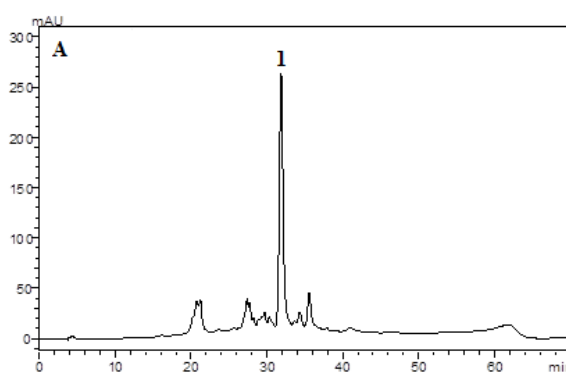


Fig. 1. HPLC compound of *C. decandra* extract of *C. decandra* leaves. (1) rutin.

3.2. Antioxidant activity

In this study, the extract of *C. decandra* leaves exhibited very good antioxidant capacity. The required amounts of extract from the leaves tested to reduce the initial concentration of DPPH by 50% (SC_{50}) were $SC_{50} = 27.083 \pm 0.55 \mu\text{g} / \text{ml}$, was shown to be statistically comparable to the positive ascorbic acid control SC_{50} value of $15.98 \pm 0.78 \mu\text{g}/\text{mL}$. The reducing ability of a compound can serve as an indicator of their potential antioxidant activity. So another important method compared the antioxidant potential of *C. decandra*, which exhibited a good IC_{50} value in the reduction of power, of $184.39 \pm 1.28\mu\text{g}/\text{mL}$, comparing with the standard antioxidant ascorbic acid in the concentration of $279.22 \pm 2.56 \mu\text{g} / \text{ml}$ (Table 1).

Table 1 - IC_{50} (mg/mL) values of the DPPH and reducing power assay for crude extract of *C. decandra*.

	SC_{50} (mg/mL)	IC_{50} (mg/mL)
	C. decandra	Ac. Acs
DPPH	27.08 ± 0.55	15.98 ± 0.78
Reducing power assay	184.39 ± 1.28	279.22 ± 2.56

Values are expressed as mean \pm S.E.M. Means with are significantly different ($p < 0.05$), by analysis of variance (One-way ANOVA) ($n = 3$).

3.3 Topical effect of *C. decandra* ethanolic extract and rutin on inflammatory parameters croton oil-induced

We assessed the topical anti-inflammatory activity of ethanolic extract and rutin of *C. decandra* in an acute contact dermatitis model induced by croton oil. Topical croton oil application induced marked increase skin thickness presenting an E_{max} of $134 \pm 0.01 \mu\text{m}$ when evaluated at 6 h after the induction while topical vehicle (20 $\mu\text{L}/\text{ear}$; acetone) alone application did not change the ear thickness (23 μm) (Fig 2A and 3A). However, the ethanolic extract (0.001-1 mg/ear) and rutin (0.03-0.003 mg/ear) topical treatment caused a dose-dependent inhibition of croton oil-induced ear edema, with an ID_{50} value of 0.02 (0.006-0.09) mg/ear and 0.007 (0.005-0.01) mg/ear and a maximum inhibition of $70 \pm 5\%$ (at 1 mg/ear) and $78 \pm 10\%$ (at 0.03

mg/ear), respectively. Dexamethasone, used as a positive control, inhibited croton oil-induced ear edema in $92\pm6\%$ (Fig 2A and 3A).

To investigate the effect of *C. decandra* ethanolic extract and rutin on neutrophil infiltration, MPO activity was assessed. The croton oil induced an increase on MPO activity when compared with vehicle and naïve group and the topical treatments reduced the neutrophil infiltration when compared with control group. The *C. decandra* ethanolic extract reduced the MPO activity only at 1 mg/ear with a maximum inhibition of $42\pm4\%$ while the rutin decreased in $30\pm8\%$ at 0.03 mg/ear. Moreover, dexamethasone reduced the MPO activity in $48\pm7\%$ (Fig 2B and 3B).

Once we observed the development of an inflammatory process after croton oil application, we investigated histological changes in the ear tissue at 6 h after the application of irritant agent and treatments. Histological sections of the mice ears submitted to single topical application of Croton oil showed the presence edematous ears characterized by an intense increase of ear thickness (vasodilation), especially at the dermis and expressive cell migration (polymorphonuclear leukocytes) to the ear tissue when compared to naïve or vehicle group (Fig. 2C and 3C). All inflammatory events were remarkably reduced by *C. decandra* ethanolic extract (1 mg/ear) and rutin (0.03 mg/ear) topical treatment as well as by dexamethasone when compared with croton oil group. Furthermore, the polymorphonuclear cells presence was also evaluated quantitatively. We observed that croton oil application promoted an intense inflammatory cells infiltration (107 ± 13 polymorphonuclear cells per field) when compared with naïve group (14 ± 2 polymorphonuclear cell per field). The topical treatments reduced the inflammatory cell infiltration (53 ± 3 , 41 ± 7 and 26 ± 2 polymorphonuclear cells per field to ethanolic extract, rutin and dexamethasone, respectively), when compared with croton oil group (Fig 2D and 3D).

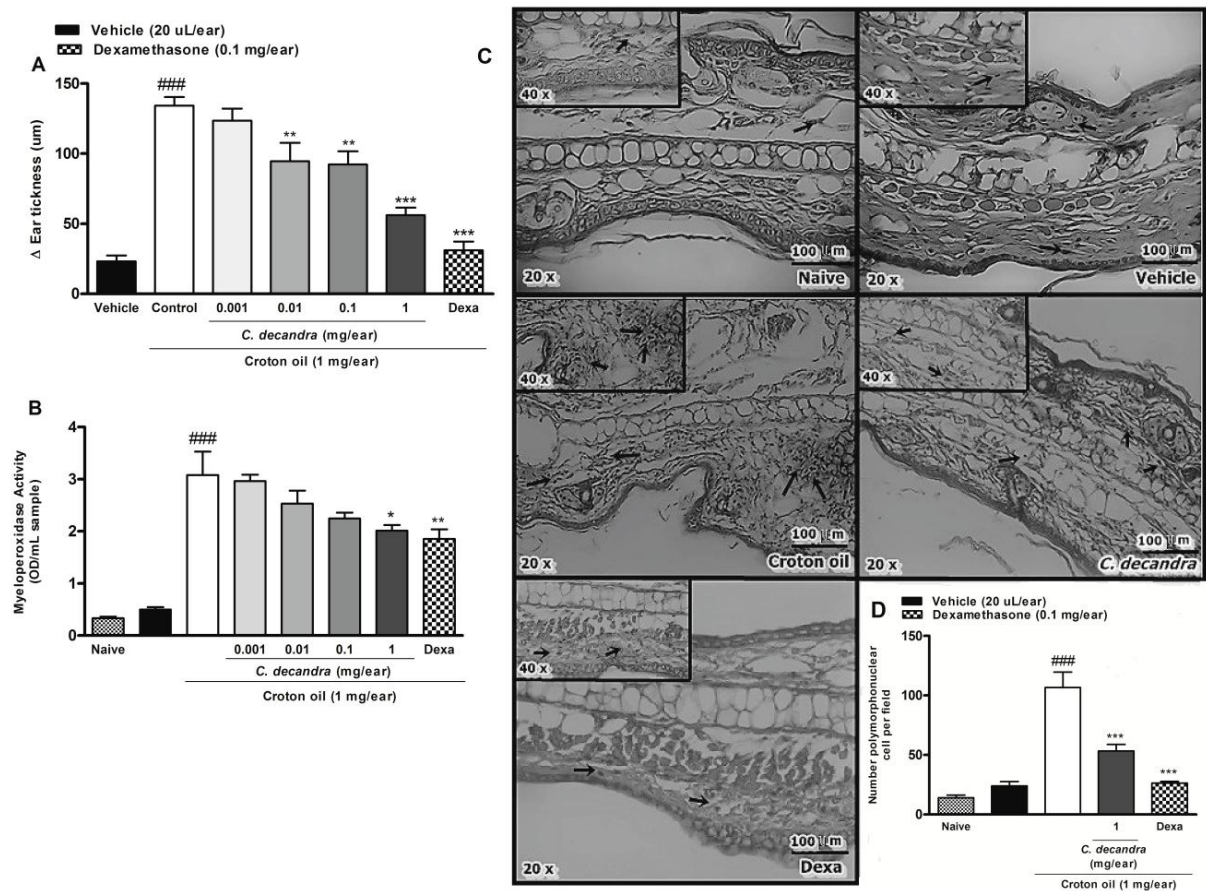


Fig. 2. Effect of ethanolic extract (0.001-1 mg/ear) from *C. decandra* and dexamethasone (Dexa) (0.1 mg/ear) topically administered on acute ear edema (A), MPO activity (OD/mL sample) (B), histological changes (hematoxylin-eosin 200 and 400x) (C) and number polymorphonuclear cells per field (D) on mice ear topically treated with croton oil. Ear edema and MPO activity were measured at 6 h after croton oil treatment. Each bar represents the mean+S.E.M. for 5-6 animals. The arrows indicate the presence of inflammatory cells in the ear tissue. The graphic symbols denote the significance levels when compared with the control, vehicle or naive groups. ### P <0.001 when compared with the vehicle (A) and naive (B) groups; * P <0.05, ** P <0.01 and *** P <0.001 when compared with the control group (one-way ANOVA followed post hoc Newman-Keuls test).

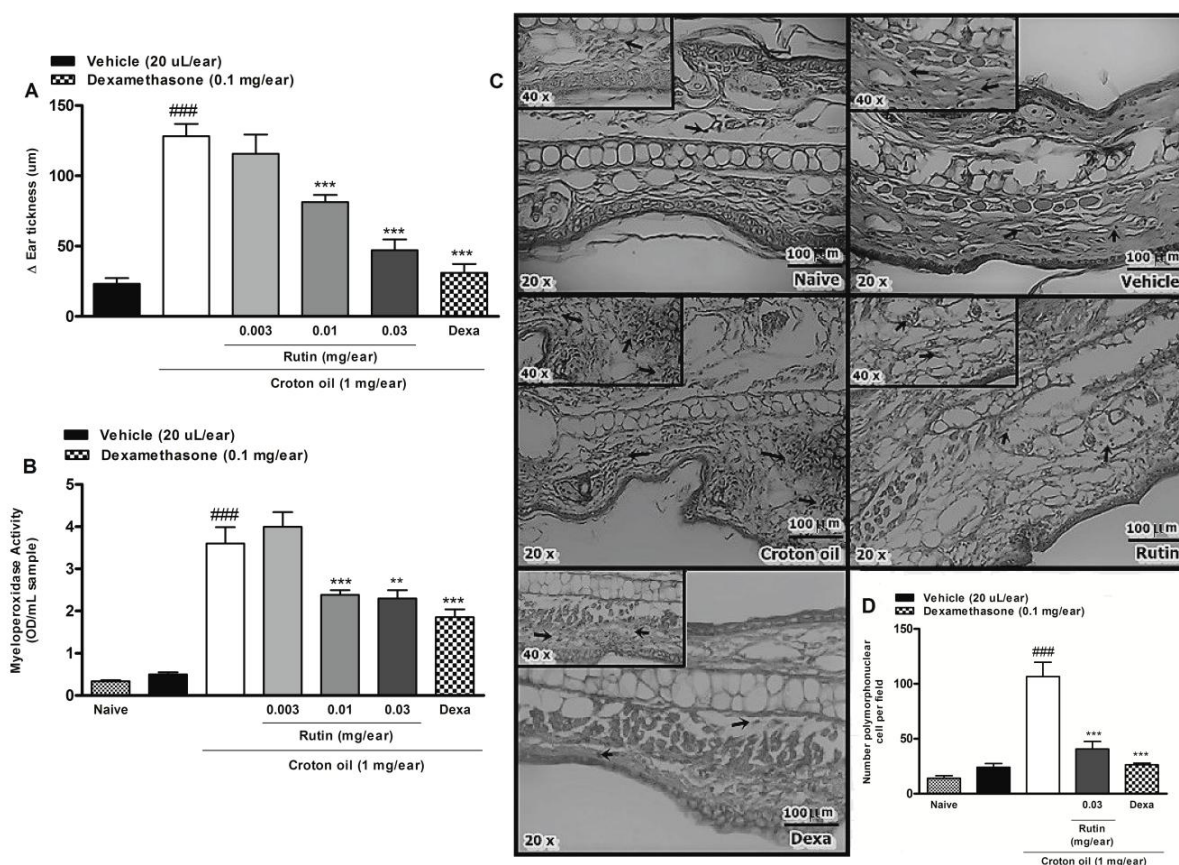


Fig. 3. Effect of rutin (0.003-0.03 mg/ear) and dexamethasone (Dexa) (0.1 mg/ear) topically administered on acute ear edema (A), MPO activity (OD/mL sample) (B), histological changes (hematoxylin-eosin 200 and 400x) (C) and number polymorphonuclear cells per field (D) on mice ear topically treated with croton oil. Ear edema and MPO activity were measured at 6 h after croton oil treatment. Each bar represents the mean+S.E.M. for 5-6 animals. The arrows indicate the presence of inflammatory cells in the ear tissue. The graphic symbols denote the significance levels when compared with the control, vehicle or naive groups. ###P<0.001 when compared with the vehicle (A) and naive (B) groups; **P<0.01 and ***P<0.001 when compared with the control group (one-way ANOVA followed post hoc Newman-Keuls test).

4. Discussion

The medicinal plants have been recognized as a safe and effective source for the treatment of inflammatory skin diseases, replacing conventional drugs such as corticosteroids and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (Cesca et al., 2012).

Casearia decandra has been used in traditional folk medicine in the treatment of several skin inflammatory disorders. The present study demonstrated, by first time, the anti-inflammatory activity of the crude extract of *C. decandra* leaves, in an inflammatory model of ear edema in animals. This anti-inflammatory effect may be related to its antioxidant activity, confirming its use in the treatment of skin inflammatory disorders.

Topical application of the crude extract of *C. decandra* significantly inhibited the ear swelling in a model of contact dermatitis induced by croton oil. The extract was also able to reduce the migration of polymorphonuclear leukocytes to the site of inflammation at all doses used. In addition to these results, histological analysis of mouse ear biopsies collected confirms the reduction of leukocyte migration and edema promoted by the crude extract.

For the HPLC analysis, it was demonstrated the presence of the phenolic compound, rutin, which is in high amount (27.81 mg / g). This evidence led us to test whether rutin would be, at least in part, the active compound responsible for the anti-inflammatory activity observed in the crude extract of *C. decandra*. Therefore, the isolated compound rutin obtained from the *C. decandra* crude extract was subjected to two types of topical inflammation, and was also able to reduce edema and an infiltration of inflammatory cells.

Thus, the ethnopharmacological report of the plant used in anti-inflammatory disorder may be partly due to the antioxidant and anti-inflammatory activities found by rutin. The anti-inflammatory effect of rutin was recently established and can be explained, at least in part, by inhibiting of inflammatory mediators production which play an important role in neutrophil recruitment and activation demonstrated that rutin showed inhibitory effect on paw edema formation. (Selloum et al.,2001). These discoveres support the idea of a mechanism of action for the plant similar to nonsteroidal anti-inflammatory pathways in steroid related to the formation of inflammatory mediators derived from arachidonic acid (Ferreira et al., 2011).

It is therefore possible that the total phenolic constituents can contribute to the anti-inflammatory activity of *C. decandra*. The results showed high amounts of phenolic compounds and considerable amount of flavonoids present in the crude extract. The extract also inhibited the radical DPPH *in vitro* and there was power to reduce the Fe³⁺ ion demonstrating the antioxidant potential of this species. Since it is already proven in the literature that plant extracts rich in secondary metabolites

reduce inflammation by eliminating superoxide participating in the inflammation cascade (Vatten and Shett.,2005), we can correlate this activity to the anti-inflammatory activity.

5. Conclusion

In this study it was found that the extract of leaves of *C. decandra* showed anti-edema and anti-inflammatory activity in a model of contact dermatitis induced by croton oil. These results may be related to the high amount of rutin quantified by HPLC and provide some scientific support to justify the popular use of *C. decandra* for skin affections.

Acknowledgments

The authors would like to thank Liliane de Freitas Bauermann for advice and José Cardoso Marchiori (Department of Forest Sciences, Federal University of Santa Maria, 13159) for providing the identification of *C. decandra*. The authors thank also the financial support of CNPq/CAPES (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) /Brazil.

References

- Adami. M., et al., 2012. Simvastatin ointment, a new treatment for skin inflammatory conditions, *J. Dermatol. Sci.* 66, 127–135.
- Berker K., et al., 2010. Total Antioxidant Capacity Assay Using Optimized Ferricyanide/Prussian Blue Method. *Food Anal Methods.* 3, 154-68.
- Brum.T.F., et al., 2016. Ethnopharmacological study and topical anti-inflammatory activity of crude extract from *Poikilacanthus glandulosus* (Nees) Ariza leaves, *J. Ethnopharmacol.* 193, 60–67.
- Cesca TG, 2012. Antinociceptive, anti-inflammatory and wound healing features in animal models treated with a semisolid herbal medicine based on *Aleurites moluccana* L. Willd. Euforbiaceae standardized leaf extract: semisolid herbal. *J Ethnopharmacol.* 143:355–362.

- Chandra, S., Mejia, E.G., 2004. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinine reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (Camellia sinensis) teas. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3583–3589.
- Choi, C.W., et al., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci.* 163, 1161–1168.
- Chung, M. J.; Walker, P. A. and Hogstrand, C., 2006. Dietary phenolic antioxidants, caffeic acid and Trolox, protect rainbow trout gill cells from nitric oxide-induced apoptosis. *Aquat Toxicol.* 80, 321-328.
- Evaristo, I.M.; Leitão, M.C., 2001. Identificação e quantificação por DAD-HPLC, da fracção fenólica contida em folhas de *Quercus suber* L. *Silva Lusitana*, 9, 135-141.
- Ferreira, P.M., et al., 2011. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 83, 1373–1384.
- Gonçalves, T.O., et al., 2009. Hidroquinona: Princípio antioxidante e tóxico de *Casearia decandra* (Salicaceae). Reunião Anual da SBQ, 1 cd-rom, Fortaleza, Brasil.
- Huang, G.J., et al., 2012. “A concise synthesis of viscolin, and its anti-inflammatory effects through the suppression of iNOS, COX-2, ERK phosphorylation and proinflammatory cytokines expressions,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 48, pp. 371–378.
- Lorenzi, H., 2006. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: De consumo in natura. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, p. 640.
- McGrath, J.C., et al., 2010. Editorial: Guidelines for reporting experiments involving animals: The ARRIVE guidelines, *Br. J. Pharmacol.* 160, 1573–1576.
- Menezes, F.G., 2004. Avaliação farmacológica e toxicológica de diferentes espécies do Gênero *Casearia*. São Paulo, 153 p. Tese (Doutorando em Farmacologia), USP.
- Oliveira, S.M., et al., 2014. Antinociceptive effect of 3-(4-fluorophenyl)-5-trifluoromethyl-1H-1-tosylpyrazole. A Celecoxib structural analog in models of pathological pain. *Pharmacol., Biochem. Behavior.* 124, 396-404.
- Piana, M. et al., 2016. Topical anti-inflammatory activity of *Solanum corymbiflorum* leaves. *J. Ethnopharmacol.* 17, 16-21.
- Pietta PG 2000. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63:1035- 42.
- Selloum L, et al., 2001. Effects of flavonols on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils. *Arch Biochem Biophys*;395: 49–56.

Vattem D.A, Shetty K., 2005. Biological functionality of ellagic acid: a review. J Food Biochem. 29(3):234-266.

WARD, P.A, 2010. The inflammatory response – An overview. In: SERHAN, CN, WARD, PA, GILROY DW. Fundamentals of Inflammation . 1 st ed. Cambrigde Unversity Press., cap. 1, p. 1-16.

Woisky, R.G., Salatino, A., 1998. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. J. Apic. Res. 37, 99–10.

5. CONCLUSÃO

- ✓ Nos testes realizados a fim de dosar polifenóis e flavonoides, a espécie apresentou uma concentração significativa dos compostos no EB.
- ✓ A planta teve efeito antioxidante que foi caracterizado pelo método de captura de radicais livres (DPPH) e poder redutor. Os compostos polifenólicos possivelmente estão relacionados à atividade antioxidante;

- ✓ Através da análise por CLAE foi revelado a presença de rutina no EB de *C. decandra*.
- ✓ O ensaio do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton mostrou que o extrato bruto de *C. decandra*, causou inibição dose dependente do edema;
- ✓ A aplicação tópica do EB das folhas de *C. decandra* reduziu a infiltração leucocitária, avaliados pelo método enzimático e histológico.
- ✓ Os compostos fenólicos com atividade antioxidante presente no extrato avaliados na espécie *C. decandra* contribuíram para a atividade antiinflamatória da planta;

Diante dos resultados obtidos neste estudo foi possível confirmar o uso da espécie para fins medicinais, conhecer as principais classes de metabólitos secundários presentes nas folhas de *C. decandra*, identificando pela primeira vez capacidade antioxidante e atividade anti-inflamatória desta espécie.

REFERÊNCIAS

- ABSY, M.L., SCAVONE, O. Sobre a morfologia e anatomia de *Casearia sylvestris* Swartz. **Boletim de Zoologia e Biologia Marinha** 30:641-676, 1973.
- ADEGOKE, G.O. et al. Antioxidants and lipid oxidation in food - a critical appraisal. **Journal of Food Science and Technology**, v. 35, n.4, p. 283-298, 1998.
- AGARWAL A., Gupta S., Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. **Curr Opin Obstet Gynecol** 18:325-332, 2006.

ALBERTS B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 3a. ed. Artes Médicas, Porto Alegre, 1997.

APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. **Bot. J. Linn. Soc.**, Oxford, v. 161, p. 105-121, 2009.

ARAÚJO, E.C. et al. Uso de plantas medicinais por pacientes com câncer nos hospitais públicos em João Pessoa (Pb). **Revista Espaço para a Saúde**, v.8, nº 2, p. 44-52, 2007.

ARDESTANI, A.; YAZDANPARAST, R. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. **Food chemistry**, v. 104. P.21-29,2007.

AURICCHIO, M. T., BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 62, 55-61, 2003.

BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para descoberta de fármacos. **Química Nova**, v.32, n.3, p. 679-688, 2009.

BARROSO, G. M. et al. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, v. 1, 304 p, 2002.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.P. Estresse Oxidativo: Relação entre Geração de Espécies Reativas e Defesa do Organismo. **Química Nova**, V. 29, n1, 113-123, 2006.

BASILE, A.C. et al. Pharmaceutical assay of *Casearia sylvestris*– I: preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, 30:185-197, 1990.

BEDI, M.; SHENEFELT, P. Herbal therapy in dermatology. **Archives of dermatology**, v. 138, n. 2, p. 232, 2002.

BENTO, S.T. et al. Hidroquinona e hidroquinona glicosilada (GC/EM) em *Casearia decandra* Jacq. e avaliação da atividade antifúngica. **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, 2013.

BLAZSÓ, G.; GÁBOR, M. Effects of prostaglandin antagonist phloretin derivatives on mouse ear edema induced with different skin irritants. **Prostaglandins**, v. 50, p. 161-168, 1995.

BOLZANI, V.S. et al. Search for antifungal and anticancer compounds from native plant species of Cerrado and Atlantic Forest. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 71:181-187, 1999.

BORGES, M.H. et al. Neutralization of proteases from Bothrops snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon** 39:1863-1869, 2011.

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

BRUNETON J. Elementos de fitoquímica y de farmacognosia. Zaragoza: Acribia; 594p, 1991.

BUTLER, M.S. Natural products to drugs: Natural product – derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, n.25, p.475-516,2008.

CALABRÒ M.L. *et al.* The rutin/ β -cyclodextrin interactions in fully aqueous solution: spectroscopic studies and biological assays. **J Pharm Biomed Anal.** 2005;36(5):1019-27.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-Inflammatory Compounds of Plant Origin. Part I. Action on Arachidonic Acid Pathway, Nitric Oxide and Nuclear Factor γ B (NF- γ B). **Planta Medica**, v. 69, n. 11, p. 973-983, 2003.

CALIXTO, J.B.; Campos, M.M.; Otuki, M.F.; Santos, A.R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Medica**, v. 70, p. 93-103, 2004.

CARVALHO, E. S. *et al.* Diterpeno $\Delta^{13(16),14}$ – diênico do caule de *Casearia sylvestris* Swartz. In: **JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS**, 8,2007, São Paulo. Anais eletrônicos São Paulo, 1 CD- ROM, 2007.

CASTANHO, E. Atividade antiúlcera gástrica de espécies vegetais do gênero. Ciências Biológicas. **Revista PIBIC**, Osasco, v. 5, n. 6, p. 7-14, 2011.

CHATGILIALOGLU, C.; O'NEILL, P. Free radicals associated with DNA damage. **Experimental Gerontology**. v. 36, n. 9, p.1459-1471, 2001

CHEUNG, L.M.; CHEUNG, P.C.K.; OOI, V.E.C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chemistry**, v. 81, 249–255, 2003.

CONNAY, A.H. *et al.* Inhibitory effect of curcumin and some related dietary compounds on tumor promotion and arachidonic acid metabolism in mouse skin. **Advances in enzyme regulation**, v.31, p.385-396, 1991.

CORRÊA, M.P. Dicionário de Plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1978.

DATTNER, A. From medical herbalism to phytotherapy in dermatology: back to the future. **Dermatologic Therapy**, v. 16, n. 2, p. 106-113, 2003.

DECKER, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, New York, v.55, n.11, p.396-407, 1997.

DE MOURA, *et al.* Trypanocidal activity of isolated naphthoquinones from *Tabebuia* and some heterocyclic derivatives: a review from an interdisciplinary study. **Journal of the Brazilian Chemistry Society** 12: 325-338, 2001.

DOMITROVIC R. *et al.* Differential hepatoprotective mechanisms of rutin and quercetin in CCl₄-intoxicated BALB/cN mice. **Acta Pharmacol Sin.** 2012;33(10):1260-70.

ESALQ – **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**. Disponível em <http://www.esalq.usp.br/trilhas/medicina/am28.htm>. Acesso em: 06 ago. 2016.

ESTEVES, I. *et al.* Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 191-196, 2005.

FACINO, R. M.; CARINI, G.; ALDINI, G. Antioxidant activity of nimesulide and its main metabolites. **Drugs**, v.46, p.15-21, 1993.

FELIPPE JR., J.; PERCÁIO, S. Radicais livres em medicina intensiva. **Rev. Bras. Terap. Intens.**, 3(3):66-72, 1991.

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

GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Grow-Hill, 2006.

FYHRQUIST-VANNI, N.L., ALENIUS, H., LAUERMA, A. Contact dermatitis. **Dermatol Clin**, v. 25, p. 613-23, 2007.

FREINKEL, R.; WOODLEY, D. **The biology of the skin**. Taylor & Francis, 2001.

GABOR, M. Models os acute inflammation in the ear. In: WINYARD, P.G. e WILLOUGHBY, D.A. **Inflammation Protocols**, New Jersey: Humana Press., 129-131, 2003.

GABOR, M. Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications. **Budapeste: Akadémiai Kiadó**, 2000.

GONÇALVES, T.O.*et al.* Hidroquinona: Princípio antioxidante e tóxico de *Casearia decandra* (Salicaceae). **Reunião Anual da SBQ**, 1 cd-rom, Fortaleza, Brasil, 2009.

GUTTERIDGE, J. M; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, p. 561-564, 2010.

HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. **Oxford: Clarendon Press**; 1989.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 59. P. 1609-1623, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine, 3ed. **New York: Oxford University Press**, 1999.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet**, v. 355, n. 9210, p.1179-1180, 2000.

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: Encyclopedia of Life sciences. **Nature Publishing Group**, v. 1, p.1-7, 2001

HARMAN, D. **Free radical theory of aging**. **Mutat. Res.**, v. 275, p. 257-266, 1992.

HUANG, J.; PLASS, C; GERHAEUSER, C. Cancer Chemoprevention by Targeting the Epigenome. **Current Drug Targets**, v. 12 (13), p. 1925-1956, 2011.

HUNTER, M. S. et al. Four new clerodane diterpenes from the leaves of *Casearia guianensis* wich inhibit the interaction of leukocyte function antigen 1 with intercellular adhesion molecule 1. **Journal of Natural Products**, v. 60, p.894-899, 1997.

IGNOATO, M. C. et al. **Quim. Nova**, 35, 2241, 2012.

ITOKAWA, H. et al. Antitumor principles from *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae), structure elucidation of new clerodane diterpenes by 2-D NMR spectroscopy. **Chemical Pharmacological Bulletin** 36:1585-1588, 1988.

JACKSON L.W. Et al. Oxidative stress and endometriosis. **Hum Reprod**; 20: 2014-2020, 2005.

JANBAZ K.H, SAEED S.A, GILANI A.H. Protective effect of rutin on paracetamol- and CCl₄-induced hepatotoxicity in rodents. **Fitoterapia**.73(7-8):557-63, 2002.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Nacional, 777p, 1988.

JUDD, W.S. et al. Plant systematics. A Phylogenetic approach. 3ed. **Sinauer Associates Inc.**, Massachusetts, 2007.

JÚNIOR, A. W., SIMIONATTO, E. L.; STEFANELLO, M. A. Composição do óleo essencial das folhas e flores de *Casearia decandra*. **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, 2007.

KINGSTON, D.G. Modern natural products drug Discovery and its relevance to biodiversity conservation. **Journal of Natural Products**, v.74, p.456-511, 2011.

KUPPER, T.S. Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues. Mechanisms and Speculations. **Journal of Clinical Investigation**. v.86, p. 1783-1789, 1990.

LAIHIA, J.K., TAIMEN, P., KUJARI, H., LEINO, L. Topical cis-urocanic acid attenuates edema and erythema in acute and subacute skin inflammation in the mouse. **British Journal of Dermatology**, v.167, p. 506-513, 2012.

LAPA, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O.;SCHENKEL, E. P., et al (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. Florianópolis: UFSC, p.181-196, 2000.

LEBWOHL, M. Psoriasis. **Lancet**, v. 361, p. 1197–1204, 2003.

LEMOS, A. H. Controle e Prevenção de Doenças pela Medicina Natural e **Ortomolecular**.São Paulo: EditoraAtheneu, 331p, 2006.

LIMA, R. K.et al. 2012. Bactericidal and antioxidant activity of essential oils from *Myristicafragrans*Houtt and *Salvia microphylla* H.B.K. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 89, 523-528, 2012.

LORENZI, H.; SOUZA, V.C. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, SP: **Instituto Plantarum**, p.329 a 333, 2005.

LORENZI, H. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: De consumo in natura. São Paulo: **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, p. 640, 2006.

LUE B-M, et al. Antioxidant properties of modified rutin esters by DPPH, reducing power, iron chelation and human low density lipoprotein assays. **Food Chem**;123(2):221- 30, 2010.

MACIEL, M.A.M.et al.Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p. 429-438, 2002.

MAGALHÃES, V. G. *Convenção sobre a diversidade biológica (CDB): A Necessidade da revisão do seu texto substituindo o termo “Recursos genéticos” por “recursos biológicos” nos Arts 1, 9, 15, 16 E 19.* **Revista Eletrônica de Direito**. v.1, Março, 2006.

MAHMOUD A.M. Influence of rutin on biochemical alterations in hyperammonemia in rats. **Exp Toxicol Pathol**. 64(7–8):783-9, 2012.

MARINS, K et al. Atividade antimicrobiana das folhas de *Casearia decandra* Jacq. Antimicrobial activity of the leaves of *Casearia decandra* Jacq. **Rev. Bras. Farm.** 92(4): 295-298, 2011.

MARIOT M.P.; BARBERI R.L. Metabólitos secundários e propriedades medicinais da espinheira-santa (*Maytenus illicifolia* Mart. ex Reiss. e *M. aquifolium* Mart.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s. V.9,p.89-99, 2007.

MARQUETE, R. **O gênero casearia jacq. No estado do rio de janeiro (brasil) – flacourtiaceae**. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro Escola Nacional de Botânica Tropical . RIO, 2005.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v.454 (7203), p.428-35, 2008.

MEYER, S. et al. Use of phytopharmaceutical agents in dermatology. Indications, therapeutic approaches and side effects. **Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete**, v. 56, n. 5, p. 483, 2000.

MILES, A.M.; GRISHAM, M.B. **Methods enzymol.**, v.234, p.555-572, 1994.

MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia: Processos Gerais**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, p. 109-151, 2008.

MONTORO, P. et al. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. **Food Chem.**, v.24, n.1, p.105-111, 2004.

MOSADDIK, M.A. et al. Screening of some Australian Flacourtiaceae species for in vitro antioxidante, cytotoxic and antimicrobial activity. **Phytomedicine**, v. 11, p. 461-466, 2004.

MUELLER, M. M. Inflammation in epithelial skin tumours: old stories and new ideas. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 6, p. 735-744. ISSN 0959-8049, 2006.

NASCIMENTO, M. S. **Abordagem fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante e anti-inflamatória do extrato e frações da entrecasca da *Mimosa hostilis Benth.*** 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências fisiológicas) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-77, 2007.

NGO C. et al. Reactive oxygen species controls endometriosis progression. **Am J Pathhol** :175: 225-234, 2009.

OLIVEIRA, A. M. et al. Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* and its clerodane diterpen (caseargrewiin F) protect against DNA damage at low concentrations and cause DNA damage at high concentrations in mice's blood cells. **Mutagenesis**, v. 24, n. 6, p. 501-506, 2009.

OMS. **National Policy on Tradicional Medicine and Regulation of Herbal Medicines**. Disponível em <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js7916e/>. Acesso em: 5 set. 2016, 2005.

PARK, K.K. et al. Inhibitory effects of chlorophyllin, hermin and tetrakis (4-benzoic acid) porphtrin on oxidative DNA damage and mouse skin inflammation induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate as a possible antitumor promoting mechanisms. **Mutation Research**, v. 542, p. 89-97, 2003.

PIETROVSKI, E.F. et al. Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myetaceae) leaves. **Jornal of pharmacy and Pharmacology**, v.60, p.479-487, 2008.

PIO, C. M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Instituto de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, v.3, 1984.

PLANTAS BRASILEIRAS, 2002. **Banco de Dados – Plantas Medicinais do Brasil**. Disponível em: <http://www.brasilian-plants.com/br/database.cfm> Acesso em: 10 out. 2016.

PORTAL BRASIL. **SUS tem fitoterápicos para doenças simples**. Disponível em <http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2012/11/09/sus-tem-fitoterapicos-para-doencas-simples>. Acesso em: 15. Out. 2016.

PRAKASAM, A.; SETHUPATHY, S.; PUGALENDI K. V. Effect of *Casearia esculenta* root extract on blood glucose and plasma antioxidant status in streptozotocin diabetic rats. **Pol. J. Pharmacol.** v.55, p. 43–49, 2003.

PRAKASH, C.V.S.; HOCH, J.M.; KINGSTON, D.G.I. Structure and stereochemistry of new cytotoxic clerodane diterpenoids from the bark of *Casearia lucida* from the Madagascar rainforest. **Journal of Natural Products**, v.65, p.100 -107, 2002.

RAO, T. S. et al. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, v.17, p. 723–41, 1993.

RASLAN, D. S. et al. Anti-PLA2 action test of *Casearia sylvestris* Sw. **Bolletín Chimie et Farmacie**, v. 141, n. 6, p. 457-460, 2002.

ROLIM, A. et al. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Benth (Olacaceae) Commercial Extract. **Journal of AOAC International**. v. 88, n. 4, 2005.

ROMAN, R. M.; Wendland, A. E.; Polanczyk, C. A.; **Arq. Bras. Cardiol**, 91, 12, 2008.

RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of própolis: role caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, v.73,p.21-29, 2002.

SANTOS, F. V. **Avaliação da mutagenicidade in vivo e in vitro de compostos obtidos de plantas nativas do cerrado**. 2006. 152 p. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) -Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, 2006.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Simões, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, p.403-434, 2010.

SCHMITZ, L.M.; Bacher, S. Novel molecular targets in the search for antiinflammatory agents. **Phytochemistry Reviews**, v. 4, p. 19–25. 2005.

SHEN, Y.C. et al. Three new clerodane diterpene derivatives from *Casearia membranacea*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v.52, 1263-1268, 2005.

SCHOENFELDER, T. et al. Antihyperlipidemic effect of *Casearia sylvestris* methanolic extract. **Fitoterapia**, v. 79, p. 465-467, 2008.

SERHAN, N.C.; SAVIL, J. Resolution of Inflammation: The beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, n.12, p.1191-1197, 2005.

SERTIÉ, J. A. A.; CARVALHO, J. C. T.; PANIZZA, S. Antiulcer activity of the crude extract from the leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n. 2, p. 112-119, 2000.

SIES, H. Antioxidants in disease mechanisms and therapy. **USA: Academic Press.Advances in Pharmacology**, v.38, p.707, 1997.

SILVA, G.A.A.B ; BAUER, L. Análise do óleo essencial de *Casearia sylvestris* Sw. **Revista Brasileira de Farmácia** 6:327-331, 1970.

Silva, M.C. e CARVALHO, J.C.T. Inflamação. In: CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos Anti – inflamatórios – aspectos clínicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. 1a ed. Ribeirão Preto: **Tecmedd**,. Cap. 4. p. 49-68, 2004.

SILVA, C. G. et al Evaluation of antioxidante activity of Brazilian plants. **Pharmaceutical Research**, v. 52, p. 229-233, 2005.

SILVA, A. C. et al. Inhibition of NTPDase, 5`-nucleotidase, Na⁺/K⁺-ATPase and acetylcholinesterase activities by subchronic treatment with *Casearia sylvestris*. **Phytomedicine**, v. 13, p. 509-514, 2006.

SILVA, S. L. et al. Antimicrobial activity of ethanol extract from leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 5, p. 347-351, 2008.

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

SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 4.ed. Florianópolis: **DA Longman Scientific & Technical**, p. 1-4, 1993 UFSC, 2003.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, Florianópolis: Ed. da UFSC, 6.ed., p.1102, 2010.

SIQUEIRA, J.C. **Utilização popular das plantas do cerrado**. Loyola, São Paulo, 1981.

SOUSA,C.M.M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. V.30.p 351-355, 2007.

STEVENS, P.F. 2001. **Angiosperm Phylogeny Website Version 9**. [http://www.mobot.org/MOBOT/research/ APweb/](http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/). Acesso em 10. Jul. 2016.

THAMBI, P. T. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the flowers of *Tabernaemontana coronaria* (L) R. Br. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, n. 3, p. 352-55, 2006.

TOLEDO, A. C. O. et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta Bragança Paulista**, V.21, n. 1/2, p.7-13, jan./dez. 2003.

VALLE, E.H. *et al.* Anti-inflammatory effect of 3-O-[(6'-O-Palmitoyl)- β -D-glucopyranosyl Sitosterol] from *Agave angustifolia* on ear Edema in mice. **Molecules**, v.19, p. 15624-15637, 2014.

VALKO, M. Free radicals metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**. V. 160, p. 1-40, 2006.

VALKO, M. Free radicals and antioxidants in normal physiological function and human disease. **The Internacional Biochemistry & Cell Biology**. V. 39, p. 44-84, 2007.

VANCINI R.L.; LIRA C.A.B. **Radical livre, estresse oxidativo e exercício**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

ZHANG, L., TINKLE, S.S. Chemical activation of innate and specific immunity in contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 115, 168-176, 2000.

VELASCO, M.V.R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 44, n. 2, p. 233-248, abr./jun., 2008.

VIEGAS JUNIOR C., BOLZANI V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, V.29, n2, p.326-337, 2006

VILEGAS W., PIZZA C., Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). **J Agric Food Chem** 49: 3796-3801, 2001.

Yang J, Guo J, Yuan J. *In vitro* antioxidant properties of rutin. **LWT - Food Sci Technol**. 2008;41(6):1060-6.

YAMAURA, K. et al. Repeated application of glucocorticoids exacerbate pruritus via inhibition of prostaglandin D2 production of mast cells in a murine model of allergic contact dermatitis. **J Toxicol Sci**, v. 37, p. 1127-1134, 2012.

YANAMATO, Y.; GAYNOR, R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107 (2), p.135-142, 2001

YUNES, R. A.; CALIXTO, J.B. In: **Plantas medicinais – sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argost, 500pp, 2001.

Anexo 1- Artigo submetido ao periódico: Journal of Ethnopharmacology

Manuscript Details

Manuscript number	JEP_2017_220
Title	Casearia decandra Jacq. crude extract presents topical anti-inflammatory and antioxidant activity
Article type	Research Paper

Abstract

Casearia decandra, popularly known as "guaçatonga" is widely used in popular medicine to treat inflammatory conditions. The aim of this study was to evaluate an in vivo anti-inflammatory activity and to correlate this activity with the non-extracting antioxidant compounds of C. decandra leaves. In order to verify the topical anti-inflammatory effect of from leaves of Casearia decandra, it was tested in mice croton oil induced inflammation. Our findings show that topical application of C. decandra extract was significantly active in inhibiting both o edema (Inhibitory dose 50 % (ID50) = 0.02 (0.006-0.09) mg.ear, inhibition = 70±5% and myeloperoxidase activity (MPO) inhibition = 42±4% in mice ear treated with croton oil. The treatment with the product also presents satisfactory results. Rutin caused a reduction in edema formation (78±10%) and myeloperoxidase activity (MPO) inhibition = 30±8%. In addition, one feature presented antioxidant potential by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and reducing power which may be related to a presence of the compound. Taken together, these results suggest a topical anti-inflammatory activity for C. decandra species confirming its popular use for the local treatment of cutaneous inflammatory disorders.

Keywords	Casearia decandra, Guaçatonga, Antioxidant activity, Anti-inflammatory activity
Taxonomy	Pharmacognosy, Skin Pharmacology, Medicinal Use of Plants
Corresponding Author	Bianca Belke
Corresponding Author's Institution	Universidade Federal de Santa Maria
Order of Authors	Bianca Belke, Camila Camponogara, Thiele Faccim de Brum, ROBERTA DA SILVA JESUS, Mariana Piana, Aline Boligon, Sara Oliveira, Liliane Bauermann

Submission Files Included in this PDF**File Name [File Type]**

Cover-letter Bianca Belke.doc [Cover Letter]

Graphycal abstract Bianca Belke.pdf [Graphical Abstract]

Manuscript final.docx [Manuscript File]

AuthorChecklist.pdf [Checklist]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

Anexo 2 – Aprovação do projeto de pesquisa pelo comitê de ética no uso de animais da Universidade Federal de Santa Maria



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE Casearia decandra EM UM MODELO AGUDO DE INFLAMAÇÃO DE PELE EM CAMUNDONGOS", protocolada sob o CEUA nº 8970291015, sob a responsabilidade de **Sara Marchesan de Oliveira e equipe; Camila Camponogara Dalla Pozza** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFMS) na reunião de 25/02/2016.

We certify that the proposal "Topical anti-inflammatory activity of the crude extract and fractions Casearia decandra in a acute model of skin inflammation in mice.", utilizing 276 Heterogenics mice (276 males), protocol number CEUA 8970291015, under the responsibility of **Sara Marchesan de Oliveira and team; Camila Camponogara Dalla Pozza** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFMS) in the meeting of 02/25/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [03/2016](#) a [08/2017](#)

Área: [Bioquímica E Biologia Molecular](#)

Origem: [Biotério Central UFSM](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [4 a 4 semanas](#)

N: [276](#)

Linhagem: [Swiss](#)

Peso: [25 a 30 g](#)

Resumo: A pele é o revestimento externo do corpo, na qual exerce diversas funções fisiológicas essenciais à vida. Apresenta um papel importante na manutenção e desenvolvimento de defesa, uma vez que está constantemente sujeita a estímulos externos, podendo desencadear uma resposta inflamatória. Para que a resposta inflamatória torne-se evidente, é necessário que ocorra diversos mecanismos hemodinâmicos. No entanto, uma falha em um dos mecanismos envolvidos na resposta inflamatória pode predispor ao desenvolvimento de doenças inflamatórias da pele. As doenças inflamatórias de pele mais comuns incluem dermatite atópica e psoríase. Ambos os distúrbios podem ter um alto impacto sobre a qualidade de vida do paciente. Pelo fato de os tratamentos, como por exemplo, os corticoides, atualmente disponíveis para tratar doenças inflamatórias crônicas de pele, produzir uma infinidade de efeitos colaterais, como, retenção de líquidos, aumento da pressão arterial, problemas gástricos, crescimento de pelos no rosto, osteoporose, entre outros, torna-se necessária a busca de alternativas de tratamentos eficazes e seguros. Assim, este trabalho tem por finalidade investigar a propriedade anti-inflamatória tópica do extrato bruto e frações de Casearia decandra em um modelo agudo de inflamação de pele em camundongos. Para os experimentos serão utilizados camundongos Swiss albinos machos (25-30 g). A inflamação aguda de pele será induzida pela aplicação tópica única de óleo de cróton A atividade da enzima mieloperoxidase que marca a infiltração de neutrófilos também será avaliada e confirmada por métodos histológicos.

Local do experimento: Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia - LabNeuro

Santa Maria, 23 de fevereiro de 2017

Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria