

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PÂMELA DIAS FONTANA

AVALIAÇÃO DA IMUNOMODULAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO POR  
EXTRATOS DE *Musa paradisiaca* L., *Campomanesia xanthocarpa* (Mart) BERG E  
PELOS TRITERPENÓIDES EUFOL/LANOSTEROL

CURITIBA

2016

PÂMELA DIAS FONTANA

AVALIAÇÃO DA IMUNOMODULAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO POR  
EXTRATOS DE *Musa paradisiaca* L., *Campomanesia xanthocarpa* (Mart) BERG E  
PELOS TRITERPENÓIDES EUFOL/LANOSTEROL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde,  
da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial  
para a obtenção do título de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iara José de Messias-Reason  
Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Bovo

CURITIBA

2016

Fontana, Pâmela Dias

“Avaliação da imunomodulação do sistema complemento por extratos de *Musa paradisiaca* L. *Campomanesia xanthocarpa* (Mart) Berg e pelos triterpenóides Eufol/Lanosterol” / Pâmela Dias Fontana – Curitiba, 2016.

88 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Iara José de Messias Reason

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2016.

Inclui bibliografia

1. Sistema complemento. 2. *M. paradisiaca* L. Eufol. 3. *C. xanthocarpa*. I. Reason, Iara José de Messias. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.


CDD 615.321


## TERMO DE APROVAÇÃO

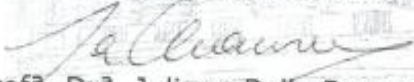
**PÂMELA DIAS FONTANA**

Título: "AVALIAÇÃO DA IMUNOMODULAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO POR EXTRATOS DE *Musa paradisiaca* L., *Campomanesia xanthocarpa* (Mart) BERG E PELOS TRITERPENÓIDES EUFOL/LANOSTEROL"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.

  
Profª. Drª. Iara José de Messias Reason  
Orientadora

  
Profª. Drª. Lorena Bavia  
Instituto Carlos Chagas / FIOCRUZ-PR

  
Profª. Drª. Juliana Bello Baron Maurer  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 29 de fevereiro de 2016.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por dispor de pessoas tão boas e generosas no meu caminho, dádivas que me permitiram ultrapassar, diariamente, todas as dificuldades para chegar a este momento de crescimento pessoal e profissional tão importante.

A minha querida orientadora, a professora Iara Messias-Reason, pela sabedoria, dedicação e paciência em todos os momentos, por me aceitar como orientanda e me permitir crescer como pesquisadora, através da experiência, mais que inesquecível, que o mestrado proporciona.

A minha co-orientadora, Fernanda Bovo, que foi quem mais me incentivou a participar da seleção de mestrado, confiando na minha aprovação, me ensinou a cada passo a superar os problemas e a buscar novas soluções perante as dificuldades. Sou muito grata por seu apoio, sua amizade e dedicação.

À professora Juliana Maurer por disponibilizar seu laboratório sempre que precisei, inclusive nos finais de semana. Mesmo não sendo minha orientadora, com paciência me guiou e me deu dicas valiosas inúmeras vezes durante os experimentos.

A banca por contribuir com seus conhecimentos e correções, permitindo o aprimoramento desta pesquisa.

A minha família querida, meus pais, Ademir e Neuza, responsáveis por tudo que sou, aos meus irmãos, Fabiana, Gabriela e João Victor, que mesmo fisicamente distantes, representam a constância do amor incondicional, amizade e companheirismo. Ao meu amor e companheiro, Wesley.

À professora da UNICENTRO Michele Mesomo, por disponibilizar os extratos aqui testados, pela realização das análises químicas e auxílio na correção da dissertação.

À doutoranda Thaís Oliveira e ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UEPG por disponibilizarem a mistura racêmica de Eufol/Lanosterol.

Aos colegas de laboratório, Vanessa, sempre querida, divertida e amiga, pela ajuda nos experimentos laboratoriais iniciais, e Fábio (Japa) pela contribuição na análise estatística de valor imensurável. Raquel e Breno, agradeço pela paciência e ensinamentos.

Aos demais companheiros do Laboratório NUPPLAMED e do HC: Andressa, Melina, Fabiana, Fábio, Vanessa, Alessandra e Sandra.

Aos colegas do mestrado, por toda ajuda e companheirismo, especialmente às colegas Kamilla e Elidiana.

À Coordenação do Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelo apoio e incentivo.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.

*Arthur Schopenhauer*

## RESUMO

O sistema complemento (SC) participa do processo de defesa do organismo desempenhando importante função na imunidade humoral e inata. O SC pode ser ativado por três vias: a via clássica (VC), a via alternativa (VA) e a via das lectinas (VL). Estas vias são ativadas por diferentes mecanismos que culminam numa cascata proteolítica, a qual promove a eliminação de microrganismos e desencadeia o processo inflamatório. Sua ativação exacerbada está relacionada com diversas doenças autoimunes e inflamatórias. Os extratos de *C. xanthocarpa*, *M. paradisiaca* L. e os triterpenóides Eufol/Lanosterol apresentam atividade anti-inflamatória comprovada na literatura científica, entretanto pouco se conhece a respeito do mecanismo de ação responsável por esse efeito. Neste trabalho investigou-se se extratos obtidos em diferentes condições de temperatura e pressão de *C. xanthocarpa* e *M. paradisiaca* L., assim como do Eufol/Lanosterol tem efeito modulador sobre a VC e VA do SC, como possíveis mecanismos de ação anti-inflamatória. A avaliação foi feita através de ensaios hemolíticos utilizando como fonte de complemento o soro humano. Os resultados obtidos mostraram que o extrato de *C. xanthocarpa* obtido a 150bar e 80°C apresenta forte atividade inibitória do SC, tanto pela VC quanto pela VA. O extrato de *M. paradisiaca* L. obtido a 30bar e 35°C inibiu a atividade da VA. Já o Eufol/Lanosterol demonstrou inibição de ambas as vias. Observou-se que as condições físicas de extração podem estar relacionadas com melhor atividade dos extratos visto que o extrato de *C. xanthocarpa* obtido à 80°C e 150bar apresentou atividade inibitória significativamente aumentada em ambas as vias VA e VC, em relação aos extratos da mesma espécie obtidos à 250bar e 80°C e 250bar e 40°C. Deste modo, podemos concluir que *C. xanthocarpa*, *M. paradisiaca* L. e o Eufol/Lanosterol, tem potencial para utilização no tratamento de doenças que tenham seu curso relacionado com a ativação do SC.

**Palavras-chave:** Sistema complemento. Inibição de hemólise. *M. paradisiaca* L. Eufol. *C. xanthocarpa*.

## ABSTRACT

The complement system (CS) participates in the defense process of the human body and is connected to natural and acquired immunity. This system can be activated by three biochemical pathways: the classical pathway (CP), the alternative pathway (AP) and the lectins pathway. These pathways are activated by different mechanisms that culminate in a proteolytic cascade responsible for the elimination of micro-organisms and triggers of the inflammatory process. The exacerbated activation is commonly linked with several autoimmune and inflammatory diseases. Although the anti-inflammatory activity of the *C. xanthocarpa* fruit extract, the *M. paradisiaca* inflorescence extract and the triterpenes Eufol/Lanosterol are described in scientific literature, the mechanisms of action are not explained. In the present work we investigate the inhibition of the CP and AP as the possible mechanisms of anti-inflammatory action for both the extracts and the triterpenes, by means of hemolytic assays using human serum as the source of complement. We verified that the *C. xanthocarpa* extracts present strong inhibitory activity of the complement-mediated hemolysis, through both CP and AP trials when obtained at 15mPa and 353,15°K. The *M. paradisiaca* L. extracts didn't present significant inhibition of the complement-mediated hemolysis in the CP trials, they did however present a considerable inhibitory activity when AP was evaluated using the extract obtained at 3mPa and 308,15°K. Eufol/Lanosterol demonstrated to inhibit both pathways, CP and AP. We also verified that the extraction conditions can be connected to the extracts' performance. The extract of *C. xanthocarpa* obtained at 353,15°K/15mPa presented significantly increased inhibitory activity, both through CP and AP when compared to the extracts obtained at 353,15°K /25mPa and 313,15°K/25mPa. We can therefore conclude *C. xanthocarpa*, *M. paradisiaca* and Eufol/Lanosterol all have potential for use in the treatment of diseases related to the CS activation.

**Key words:** Complement system. Hemolysis inhibition *M. paradisiaca* L. Euphol. *C. xanthocarpa*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - AS TRÊS VIAS DE ATIVAÇÃO DO SC: VIA CLÁSSICA, LECTINA E ALTERNATIVA CULMINANDO NA VIA TERMINAL OU COMUM. ....	22
<b>FIGURA 2</b> - FUNÇÕES BIOLÓGICAS DO SC.....	24
<b>FIGURA 3</b> - MECANISMOS DE REGULAÇÃO DO COMPLEMENTO. ....	26
<b>FIGURA 4</b> - FRUTOS (A) E ÁRVORE (B) DE <i>C. xanthocarpa</i> .....	28
<b>FIGURA 5</b> - FOLHAS COMPACTAS, PSEUDOCAULE E A INSERÇÃO DA PENCA DE FRUTOS SEGUIDOS DA HASTE PEDUNCULOSA CONTENDO A INFLORESCÊNCIA COM UMA BRÁCTEA ABERTA E AS FLORES DE <i>M. paradisiaca</i> L. ....	31
<b>FIGURA 6</b> - INFLORESCÊNCIA COMPLETA MOSTRANDO A COR VIOLÁCEA CARACTERÍSTICA COM UMA BRÁCTEA ABERTA E FLORES DE <i>M. paradisiaca</i> L. ....	32
<b>FIGURA 7</b> - (A) ÁRVORE <i>Synadenium grantii</i> Hook f. (B) ESTRUTURA QUÍMICA DOS TERPENOS EUFOL E LANOSTEROL. ....	36
<b>FIGURA 8</b> - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA UNIDADE EXPERIMENTAL PARA EXTRAÇÃO PRESSURIZADA E SUPERCRÍTICA. ....	43
<b>FIGURA 9</b> - ESQUEMA DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS DA VA E VC DO COMPLEMENTO. ....	49
<b>FIGURA 10</b> - EXPLICAÇÃO ESQUEMÁTICA DA INTERPRETAÇÃO DO ENSAIO HEMOLÍTICO COM RESULTADO DE ATIVAÇÃO (A) OU INIBIÇÃO (B) DO SC. ....	53
<b>FIGURA 11</b> - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DMSO UTILIZANDO HEMÁCIAS DE CARNEIRO (A) E COELHO (B). ....	55
<b>FIGURA 12</b> - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO HEMOLÍTICA 50% DO SHN, PARA HEMÁCIAS DE CARNEIRO (A) E COELHO (B). ....	56
<b>FIGURA 13</b> - TAXA DE HEMÓLISE DA VA DO SC SOB A AÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>C. xanthocarpa</i> , NA CONCENTRAÇÃO DE 333µg/ml. ....	57
<b>FIGURA 14</b> - TAXA DE HEMÓLISE DA VA DO SC SOB A AÇÃO DO EXTRATO CX1 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES. ....	60
<b>FIGURA 15</b> - TAXA DE HEMÓLISE DA VC DO SC SOB A AÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>C. xanthocarpa</i> , 333µg/mL, A: CX1, B: CX2, C: CX3. ....	61
<b>FIGURA 16</b> - TAXA DE HEMÓLISE DA ATIVAÇÃO DA VC DO SC SOB A AÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO CX1 DE <i>C. xanthocarpa</i> .....	63

<b>FIGURA 17</b> - TAXA DE HEMÓLISE DA ATIVAÇÃO DA VA DO SC SOB A AÇÃO DOS EXTRATOS M1 E M2 NA CONCENTRAÇÃO: 333 µg/ML. ....	65
<b>FIGURA 18</b> - TAXA DE HEMÓLISE DA ATIVAÇÃO DA VA DO SC SOB A AÇÃO DO EXTRATO M1 NAS CONCENTRAÇÕES: A: 333 µg/ml, B: 166,5 µg/ml, C: 83,250 µg/ml, D: 41,625 µg/ml, E; 20,813 µg/ml, F: 10,406 µg/ml, G: 5,203 µg/ml.....	66
<b>FIGURA 19</b> - TAXA DE HEMÓLISE DA ATIVAÇÃO DA VC DO SC SOB A AÇÃO DOS EXTRATOS M1 E M2 NA CONCENTRAÇÃO: 333 µg/mL. ....	67
<b>FIGURA 20</b> - TAXA DE HEMÓLISE DA ATIVAÇÃO DA VA DO SC SOB A AÇÃO DA MISTURA E1 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES. ....	70
<b>FIGURA 21</b> - TAXA DE HEMÓLISE DA ATIVAÇÃO DA VC DO SC SOB A AÇÃO DO E1 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES. ....	71

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - UTILIZAÇÃO TRADICIONAL DE DIFERENTES PARTES DA <i>M. paradisiaca</i> L.....	33
<b>TABELA 2</b> - ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE <i>M. paradisiaca</i> L.....	35
<b>TABELA 3</b> - COMPOSTOS VERIFICADOS NA FRAÇÃO VOLÁTIL DOS EXTRATOS M1/M2 DE <i>M. paradisiaca</i> L.....	68
<b>TABELA 4</b> - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO VOLÁTIL DOS EXTRATOS DO FRUTO DE <i>C. xanthocarpa</i> , CX1, CX2 e CX3.....	58
<b>TABELA 5</b> - APLICAÇÕES POPULARES DE <i>C. xanthocarpa</i> .....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A <sub>L</sub>	- Absorbância lida
A <sub>A</sub>	- Absorbância da amostra
A <sub>C</sub>	- Absorbância calculada
A <sub>s</sub>	- Absorbância obtida com 100%hemólise
AR	- Artrite reumatoide
ASA	- Ácido Acetilsalicílico
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CG	- Cromatografia gasosa
CH50%	- Concentração hemolítica 50%
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
DMSO	- Dimetilsulfóxido
CCV	- Coluna Cromatográfica a Vácuo
CO <sub>2</sub>	- Dióxido de Carbono
COX	- Cicloxigenase
CX1	- Extrato supercrítico do fruto <i>C. xanthocarpa</i> obtido à 150bar e 80°C
CX2	- Extrato supercrítico de fruto <i>C. xanthocarpa</i> obtido à 250bar e 40°C
CX3	- Extrato supercrítico de fruto <i>C. xanthocarpa</i> obtido à 250bar e 80°C
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	- Ácido etilenoglicol tetra-acético
EHC-VA	- Ensaio hemolítico do complemento - via alternativa
EHC-VC	- Ensaio hemolítico do complemento - via clássica
ELISA	- <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EtOH	- Etanol
FAO	- Food and Agricultural Organization of the United Nations
FDA	- Food and drug administration – United States
HÁ	- Tampão HEPES da via alternativa
HC	- Tampão HEPES da via clássica
HE	- Tampão HEPES, NaCl
HEPES	- N-(2-hidroxietil) piperazina N' (ácido 2-etano sulfônico)
HPN	- Hemoglobunúria paroxística noturna
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICH <sub>50</sub>	- Inibição da hemólise induzida pelo complemento em 50%
Ig	- Imunoglobulina
IFN	- Interferon
IL	- Interleucina
ITF	- Índice Terapêutico Fitoterápico
IUPAC	- União Internacional de Química Pura e Aplicada
LACTA	- Laboratório de Cinética e Termodinâmica Aplicada
LPS	- Lipopolissacarídeo bacteriano
LTDA	- Limitada

M1	- Extrato supercrítico de <i>M. paradisiaca</i> L. obtido à 30bar e 35°C.
M2	- Extrato supercrítico de <i>M. paradisiaca</i> L. obtido à 250bar e 40°C.
MAC	- Complexo de ataque à membrana
MASP	- Serino proteases associadas à MBL
MBL	- Lectina sérica ligadora de manose
MBM	- Museu Botânico Municipal
MPO	- Mieloperoxidase
MHS	- Mistura de soro humano
MS	- Espectrofotometria de massas
NO	- Óxido nítrico
NO <sub>2</sub>	- Dióxido de nitrogênio
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PKC	- Proteína quinase C
PBS	- Solução de salina tamponada
q.s.p.	- Quantidade suficiente para
S-	- Sobrenadante_
SC	- Sistema complemento
TCA	- Ácido tricloroacético
TFA	- Ácido trifluoroacético
THP <sub>1</sub>	- Linha celular da leucemia humana aguda monocítica
TLR	- Receptores <i>Toll-like</i>
TNF-α	- Fator de necrose tumoral
Tr	- Traços
TRIS	- Hidroximetil aminometano
UI	- Unidades internacionais
UV	- Ultravioleta
VA	- Via Alternativa
VL	- Via Lectina
VC	- Via Clássica

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1 SISTEMA COMPLEMENTO.....	19
2.1.1 Vias de ativação do SC .....	19
2.1.2 Regulação do Sistema Complemento .....	25
2.2 PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERAPIA .....	27
2.3 ESPÉCIE VEGETAL: <i>Campomanesia xanthocarpa</i> (Mart) Berg.....	28
2.3.1 Aplicações na Medicina Tradicional .....	29
2.3.2 Estudos Científicos.....	30
2.3.2.1 Atividades Biológicas Comprovadas de <i>C. xanthocarpa</i> .....	30
2.4 ESPÉCIE VEGETAL: <i>M. paradisiaca</i> L. ....	31
2.4.1 Utilização na Medicina Tradicional .....	33
2.4.2 Estudos Científicos.....	33
2.4.2.1 Atividades biológicas comprovadas de <i>M. paradisiaca</i> L. ....	33
2.5. EUFOL E LANOSTEROL .....	36
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	39
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	40
4.1 OBJETIVO GERAL .....	40
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	40
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
5.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DO FRUTO DE <i>C. xanthocarpa</i> (MART) O. BERG.....	41
5.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE INFLORESCÊNCIAS DE <i>M. paradisiaca</i> L. ....	42
5.3 OBTENÇÃO DA MISTURA DE EUFOL/LANESTEROL.....	44
5.4 EXPERIMENTOS IN VITRO AVALIANDO A ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO SC....	45
5.4.1 Teste de fixação do SC .....	45

5.4.2	Preparo das suspensões de eritrócitos de carneiro .....	45
5.4.3	Preparo das suspensões de eritrócitos de coelho .....	45
5.4.4	Obtenção de soro humano .....	46
5.4.5	Preparo das soluções-teste utilizadas nos testes de fixação do complemento ....	46
5.4.6	Padronização dos ensaios hemolíticos .....	47
5.4.7	Titulação do SHN .....	47
5.4.8	Ensaio para a avaliação da VC e da VA.....	48
5.4.8.1	Ensaio com 30min de pré-incubação para VC e VA .....	48
5.4.8.2	Ensaio sem pré-incubação para VC e VA .....	50
5.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	51
5.6	ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA .....	51
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>52</b>
6.1	PADRONIZAÇÃO DE DMSO/ TAMPÃO HE .....	54
6.2	TITULAÇÃO DO SHN E DETERMINAÇÃO DA CH50%.....	55
6.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS EXTRATOS CX1, CX2 e CX3 de <i>C. xanthocarpa</i> NA IMUNOMODULAÇÃO DA VIA ALTERNATIVA DO SC.....	57
6.4	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS EXTRATOS CX1, CX2 e CX3 de <i>C. xanthocarpa</i> NA IMUNOMODULAÇÃO DA VIA CLÁSSICA DO SC.....	61
6.5	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS EXTRATOS M1 E M2 de <i>M. paradisiaca</i> L. NA IMUNOMODULAÇÃO DA VIA ALTERNATIVA DO SC.....	65
6.6	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS EXTRATOS M1 E M2 de <i>M. paradisiaca</i> L. NA IMUNOMODULAÇÃO DA VIA CLÁSSICA DO SC.....	67
6.7	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA MISTURA RACÊMICA DE EUFOL E LANOLSTEROL (E1) NA IMUNOMODULAÇÃO DA VIA CLÁSSICA E ALTERNATIVA DO SC.....	70
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>73</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O sistema complemento (SC) é constituído por um conjunto de mais de 35 proteínas sintetizadas tanto no fígado como por macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e mesangiais renais (IBRAHIM, 2013; BELTRAME et al, 2015). Essas proteínas estão solúveis no plasma ou expressas na membrana celular e podem ser ativadas por três vias clássica (VC), alternativa (VA) e das lectinas (VL) (CRUVINEL et al, 2010; CARROL, SIM, 2011).

Para a ativação da VC ocorre a ligação do componente C1, composto de uma subunidade C1q, associada a duas moléculas C1r e duas moléculas C1s por ligações dependentes de cálcio, C1q é a subunidade que se liga à molécula de imunoglobulina (Ig) na porção Fc (Fragmento cristalino).

A ativação de VA é contínua, porém em baixa intensidade. Na presença de um ativador exógeno, ocorre sua amplificação, iniciando uma cascata proteolítica que após a ativação de C3, resulta na formação de C5 convertase em ambas as vias, que cliva a molécula de C5 em C5b e C5a. O C5b se liga a C6, C7 e C8, formando o complexo C5b-8, onde se liga C9, formando o C5b-9 ou complexo de ataque à membrana (MAC). O MAC se liga à membrana das células-alvo e formando poros permitindo um influxo exacerbado de água/íons que leva a lise celular e amplifica a resposta inflamatória (SHEN et al, 1997). Os produtos de clivagem C3a e C5a são anafilatoxinas e promovem a desgranulação de mastócitos, liberando aminas vasoativas e leucotrienos. A interação dessas anafilatoxinas com seus respectivos receptores C3aR e C5aR, em células endoteliais e granulócitos, estimula a quimiotaxia de leucócitos. Em conjunto, esses eventos contribuem para o processo inflamatório, com aumento da permeabilidade capilar e influxo de células característicos da anafilaxia (ITURRY-YAMAMOTO, PORTINHO, 2001; RICKLIN et al, 2010).

Assim, o SC é um dos efetores da imunidade humoral e do processo inflamatório (ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001). As principais consequências biológicas da ativação do SC são a defesa contra infecções piogênicas, a interação entre imunidade inata e adaptativa, quimiotaxia, fagocitose e adesão celular, participando de vários processos fisiológicos, como a eliminação de complexos

imunes, regeneração tecidual e o metabolismo lipídico (CARROLL, SIM, 2011; RICKLIN, LAMBRIS, 2013).

Portanto, considerando-se que a ativação do SC está associada ao processo inflamatório (BELTRAME et al, 2015), substâncias que modulem a sua ativação, especialmente promovendo inibição de uma ativação exacerbada, apresentam grande importância farmacológica. A inibição do SC representa importante ação anti-inflamatória, podendo ser utilizada no tratamento de várias doenças que apresentam ativação do SC no seu curso.

As plantas medicinais representam muitas vezes o principal, senão único, recurso terapêutico de algumas comunidades (MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002). A comunidade de Curral Velho, em Luís Correia, no Piauí (ARAUJO; LEMOS, 2015) e a comunidade rural de Inhamã, em Pernambuco (RODRIGUES, 2014) são exemplos de populações que tem o uso habitual de plantas medicinais. Ressalta-se que os jardins e quintais de residências, geralmente ignorados, podem ser opção de fonte de plantas com potencial nutricional e medicinal, podendo servir até mesmo como fonte de renda familiar (FERREIRA; CASTILHO, 2007).

Plantas com propriedades biológicas relevantes representam uma alternativa econômica em relação aos tratamentos recomendados pela medicina convencional, tanto através do uso *in natura* dos espécimes vegetais, como também pela fonte de novos fármacos que as mesmas representam (LAMEIRA; PINTO, 2008). Estima-se que um terço da população mundial tenha difícil acesso a medicamentos alopáticos essenciais (OMS, 2002), sendo então implícita a necessidade de investimento, estímulo ao uso e divulgação da medicina tradicional de forma racional como opção viável para o tratamento e prevenção de doenças e melhoria do sistema de saúde nestas regiões. Além disso, torna-se imprescindível o investimento de pesquisas para comprovação das propriedades relatadas em estudos etnobotânicos.

Princípios ativos obtidos de diferentes plantas de uso medicinal mostraram-se moduladores do SC (ALBAN et al., 2002). A investigação de substâncias capazes de modular o SC poderá ser promissora e gerar alternativas terapêuticas, especialmente para as doenças inflamatórias crônicas e autoimunes, cujos processos fisiopatológicos estão relacionados com ativação exacerbada do SC.

As espécies medicinais em estudo *M. paradisiaca* L. (inflorescência), *C. xanthocarpa* (fruto) e os terpenos Eufol/Lanosterol tem em comum a atividade

biológica anti-inflamatória relatada na literatura científica, com potencial efeito sobre o SC (MARKMAN, BACCHI, KATO, 2004; DUTRA et al, 2011; IMAM, AKTER, 2011; NISHA, MINI, 2013; KLAFKE et al, 2015).

Com o objetivo de elucidar se a atividade anti-inflamatória relatada esta relacionada à inibicao do SC, no presente estudo avaliou-se o efeito modulador sobre a VC e VA de extratos obtidos em diferentes condições de temperatura e pressão de *C. xanthocarpa* e *M. paradisiaca* L., assim como do Eufol/Lanosterol. Vale ressaltar que o método de extração utilizado para produção dos extratos foi supercrítico e propano comprimido, garantindo assim melhor qualidade e eficiência no processo de extração.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 SISTEMA COMPLEMENTO

O SC é composto por um conjunto de aproximadamente 35 proteínas séricas associadas a membranas celulares que têm por função proteger o organismo de agentes agressores, participando da imunidade inata e adaptativa (BELTRAME et al., 2015). Quando em contato com agentes ativadores, tais como microrganismos e complexos imunes, o SC é ativado levando à interação de vários componentes em uma reação em cascata altamente regulada.

O SC desempenha importante papel na defesa do organismo, porém sua ativação exacerbada pode levar a efeitos deletérios e injúria tecidual. O envolvimento do SC em várias doenças autoimunes e inflamatórias mostra a necessidade de se encontrar novos agentes capazes de modulá-lo inibindo sua ativação (WAGNER; FRANK, 2010). Apesar da variedade de produtos naturais que apresentam substâncias com diferentes atividades biológicas, como antivirais, analgésicas, antitumorais, antialérgicas, anti-inflamatórias e imunomoduladoras (NEWMAN; CRAGG, 2012; D'ORAZIO et al., 2012); no caso do SC, são escassas as substâncias naturais em uso (WAGNER; FRANK, 2010).

A heparina, polissacarídeo conhecido pelo seu uso como anticoagulante, é um exemplo de substância natural que possui atividade inibitória sobre o complemento, atuando em diferentes pontos de ativação do SC (SHARATH, 1985; EDENS, LINHARDT, WEILER, 1993; BAZARGANI et al., 2005).

#### 2.1.1 Vias de ativação do SC

A ativação do complemento pode ser iniciada através de três vias principais: clássica, alternativa e das lectinas (QU; RICKLIN; LAMBRIS, 2009) (FIGURA 1).

A ativação da VC ocorre essencialmente na presença de anticorpos secretados durante uma resposta imune humoral ou ainda anticorpos naturais que podem se ligar a epítopos antigênicos, formando complexo-imunes (BELTRAME et al., 2015). Essa via é ativada pela interação do componente C1q com a região Fc de IgM ou IgG na forma de complexo-imune. A ligação de C1q somente ocorre a

anticorpos complexados com antígeno e esta ligação requer íons cálcio e magnésio. Pelo fato da VC ser ativada essencialmente por complexos antígeno-anticorpo dependendo da produção prévia de anticorpos específicos, esta se associa a resposta imune humoral (ITURRY-YAMAMOTO, PORTINHO, 2001; CRUVINEL et al, 2010). O C1q pode também se ligar às proteínas C-reativa, amilóide sérica P e pentraxina 3, além de outros ligantes na superfície de células apoptóticas ou microbiana, ativando a VC (QU; RICKLIN; LAMBRIS, 2009).

A ligação de C1q ao alvo ativador (IgG ou IgM complexado com Ag) da VC induz a ativação das proteases R (C1r) e S (C1s) associadas a C1q que leva a clivagem dos componentes C2 e C4, seguindo a formação das C3 e C5 convertases e do complexo de ataque à membrana (MAC), resultante da ativação de C5 e da associação com C6, C7, C8 e moléculas de C9 (BELTRAME et al., 2015).

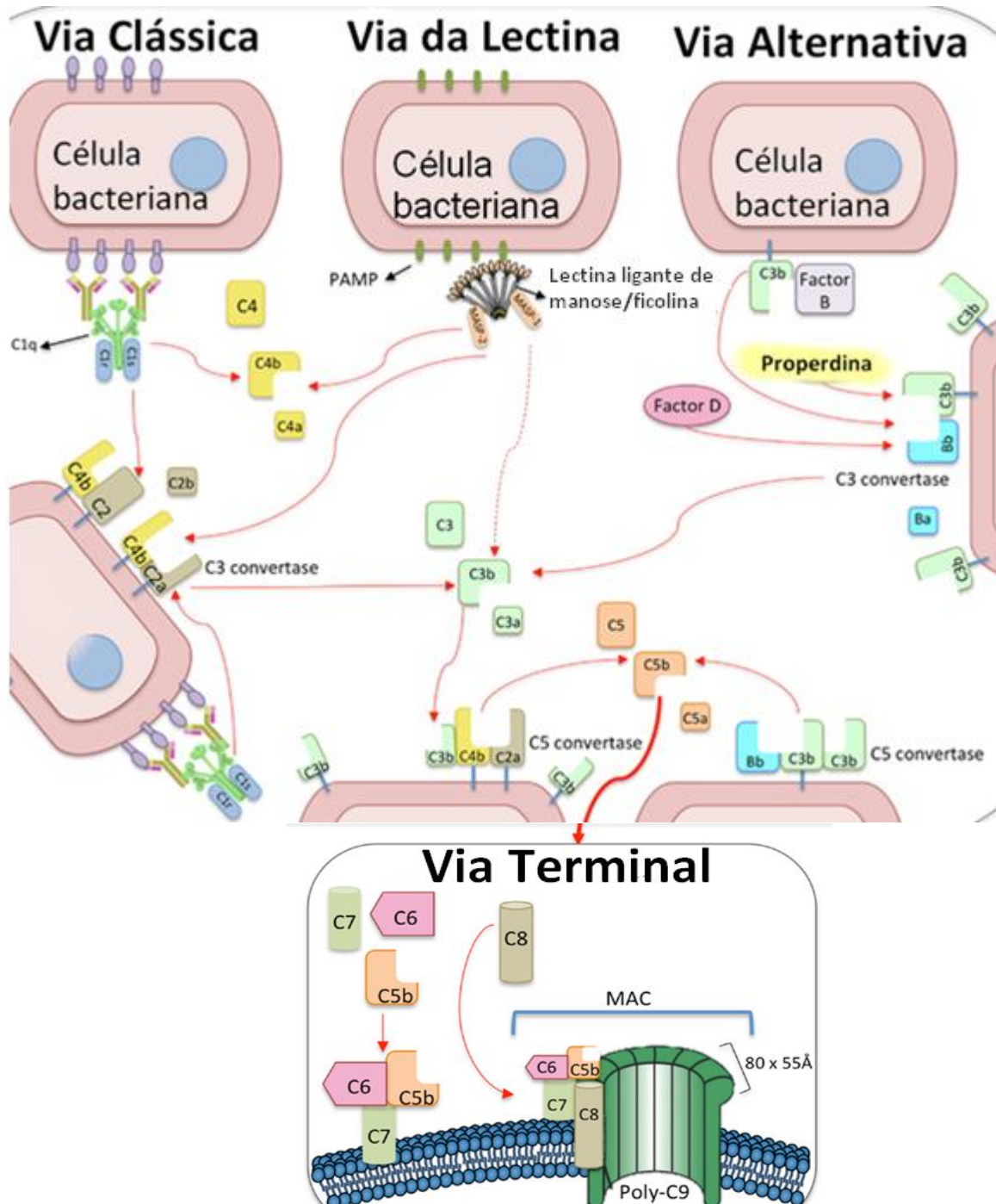
Certos agentes como fungos, bactérias, alguns tipos de vírus e helmintos especialmente com ausência de ácido siálico na membrana, são ativadores da VA, através da ligação de uma ou mais moléculas de C3b na sua superfície (ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001).

A ativação da VA é dependente do fator D, fator B, da properdina e de C3 (FIGURA 1). A VA é auto-ativada, na ausência de anticorpos, de forma contínua e em níveis basais pela clivagem espontânea de C3 no plasma. Esta é iniciada pela hidrólise espontânea da ligação tioéster de C3 que ocorre numa proporção de 1% do C3 total/hora, gerando moléculas de C3 conformacionalmente alteradas, designadas de C3(H<sub>2</sub>O), que se ligam ao fator B. O fator B, pré-ativador de C3 é clivado pelo fator D, uma enzima que circula no organismo na forma ativada, nos fragmentos B<sub>b</sub> e B<sub>a</sub>. O fragmento B<sub>b</sub> associa-se ao C3 ativado e através do seu domínio de serina protease cliva moléculas adicionais de C3, gerando C3b e a C3 convertase da via alternativa (THURMAN; ROLERS, 2006).

Assim, a via alternativa é auto-ativada, na ausência de anticorpos, de forma contínua e em níveis basais pela clivagem espontânea de C3 no plasma. Essa via também pode ser acionada diretamente pela properdina, várias outras proteínas, lipídios, carboidratos e estruturas de superfícies invasoras, como microrganismos, fungos, bactérias, vírus e células tumorais (QU; RICKLIN; LAMBRIS, 2009). A membrana da hemácia de coelho possui também esta propriedade ativadora da VA (PLATTS-MILLS; ISHIZAKA, 1974). A properdina, por sua vez, também estabiliza as

convertases de C3 (complexo C3bBb) e de C5 da VA (ITURRY-YAMAMOTO, PORTINHO, 2001; HARBOE, MOLLNES, 2008; KOUSER et al., 2013). A VA também culmina na formação do MAC causando lesão em membranas celulares, ativação da opsonização e fagocitose de microrganismos e células apoptóticas.

As lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos. A VL, de maneira semelhante à VA, não depende de anticorpo para que seja ativada (LAPPEGARD et al., 2014). Essa via é ativada quando a lectina ligante de manose (MBL), ficolinas e colectinas, se ligam a carboidratos e grupos acetilados que são comuns em microrganismos, incluindo bactérias, vírus e protozoários (BELTRAME et al., 2015). A VL é homóloga a VC, sendo diferenciadas pelo mecanismo de ativação, que na VL é determinado pelo reconhecimento de carboidratos e grupos acetilados na superfície de microrganismos pela Lectina Ligante Manose (MBL), ficolinas e colectinas 10 e 11, as quais encontram-se associadas às serino proteases (MASP1 e MASP2). Com a ativação dessas proteases ocorre a clivagem dos componentes C2 e C4, formação da C3 convertase e C5 convertase, culminando na formação do MAC (ITURRY-YAMAMOTO, PORTINHO, 2001; CRUVINEL et al, 2010).



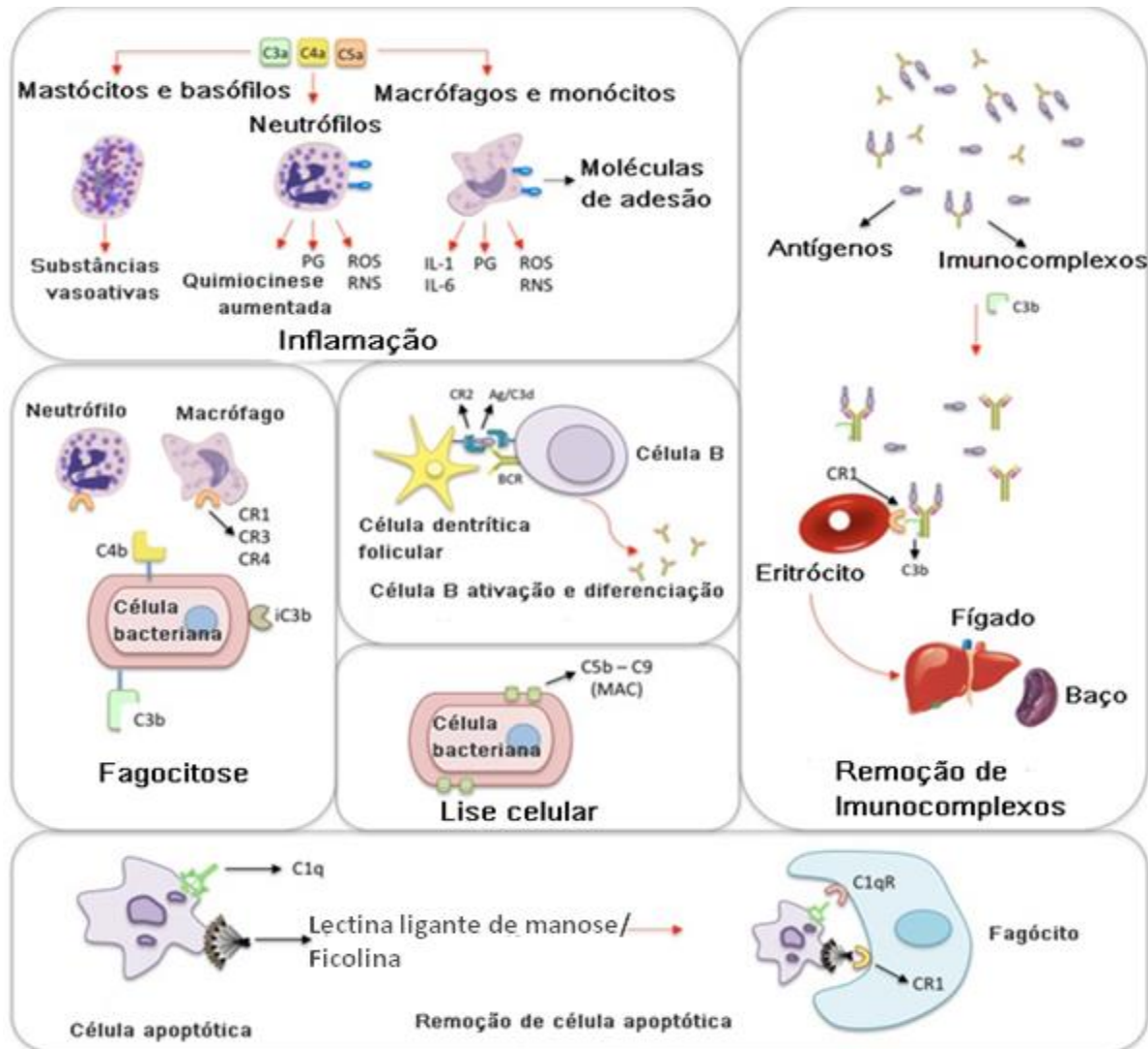
**FIGURA 1** - AS TRÊS VIAS DE ATIVAÇÃO DO SC: VIA CLÁSSICA, LECTINA E ALTERNATIVA CULMINANDO NA VIA TERMINAL OU COMUM.

FONTE: Adaptado pelo autor de BELTRAME et al., 2015.

De maneira similar, as três vias levam a ativação de C3 e de C5, após geração das C3 e C5 convertases. A formação do MAC é iniciada com o fragmento C5b ligando-se às moléculas subsequentes C6, C7 e C8 (FIGURA 1). Em seguida, há o recrutamento de 10 a 18 moléculas de C9, que se polimerizam e formam o

MAC, promovendo a formação de poros na membrana celular, influxo de água e íons e, finalmente, lise celular (LAPPEGARD et al., 2014; BELTRAME et al., 2015;).

Os fragmentos menores, liberados durante a ativação da cascata, têm efeitos biológicos importantes especialmente na reação inflamatória. Sabe-se que ativação do SC gera as anafilatoxinas C3a, C4a e C5a. A ligação de C3a, C4a e C5a a receptores de mastócitos e basófilos leva a liberação de histamina e outros mediadores vasoativos que promovem a quimiotaxia e aumento da permeabilidade vascular que caracterizam a inflamação. C5a possui ação quimiotática para mastócitos. Ocorre também liberação de prostaglandinas, espécies reativas de Oxigênio e Nitrogênio, assim como a expressão de moléculas de adesão e a produção de citocinas é aumentada. Monócitos e macrófagos apresentam respostas similares e secretam ainda, interleucinas 1 e 6 (IL1 e IL6) (FIRUGA 2) (LAPPEGARD et al., 2014; BELTRAME et al., 2015). A IL1 e a IL6 são citocinas pró-inflamatórias, primeira produz inflamação sistêmica ativando a ciclooxigenase-2 (COX2), com a formação de prostaglandinas, causando febre, a segunda está vinculada à ativação de neutrófilos, diferenciação de linfócitos-T citotóxicos e células matadoras naturais, é considerada um marcador importante de lesão tecidual durante procedimentos cirúrgicos, traumas e infecção. (OLIVEIRA et al, 2011). Outros fragmentos resultantes da clivagem dos componentes apresentam importantes atividades biológicas, como opsonização e fagocitose, C4b e C3b e complexos imunes podem agir como moléculas opsonizantes. Neutrófilos e macrófagos expressam os receptores CR1, CR2, e CR4 que se ligam a C3b, C4b, e iC3b, promovendo a aderência de microrganismos às células fagocíticas do hospedeiro, levando à fagocitose (BELTRAME et al, 2015).



**FIGURA 2 - FUNÇÕES BIOLÓGICAS DO SC.**

NOTA: Inflamação: A ativação do SC gera anafilatoxinas, entre elas, estão a C3a, C4a e C5a. A ligação de C3a, C4a, e C5a aos receptores nos mastócitos e basófilos leva a liberação de histamina e outros mediadores vasoativos. Em resposta à ativação pelas anafilatoxinas, os neutrófilos liberam prostaglandinas (PG), espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS, respectivamente) assim como aumentam a expressão de moléculas de adesão e quimiocinese. Monócitos e macrófagos mostram uma resposta similar e secretam interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6). Fagocitose: iC3b, C4b, e C3b envolvem microrganismos e imunocomplexos, tendo atividade opsonizante. Neutrófilos e macrófagos expressam receptores para o complemento (CR1, CR2, e CR4), os quais se ligam à C3b, C4b, e iC3b. Isso promove a aderência de microrganismos que serão fagocitados. A ativação e diferenciação das células B: o reconhecimento de C3 pelo antígeno tem um importante papel na ativação e diferenciação das células B. A ligação cruzada entre o receptor do complemento 2 (CR2) e o receptor da célula B (BCR) através do complexo C3d-antígeno diminui a limitação da célula B levando a migração celular, interação entre células T/B e anticorpo. Lise celular: anticorpos específicos, MBL/ficolinas, e hidrólise espontânea de C3 ativam o complemento na superfície de microrganismos infectantes e levam a formação do MAC, o que causa a lise celular. Limpeza de imunocomplexos: imunocomplexos ativam o SC. O C3 gerado se liga aos complexos e a CR1 presente na superfície dos eritrócitos. Durante o tráfico de eritrócitos através dos sinusóides do fígado e do baço, fagócitos removem os complexos imunes vinculados levando a sua limpeza. Remoção de células apoptóticas: Lectina ligadora de manose, ficolíinas e C1q ligam-se a detritos da célula apoptóticas, os quais são removidos através de ligação com os receptores C1qR e CR1 em células fagocíticas.

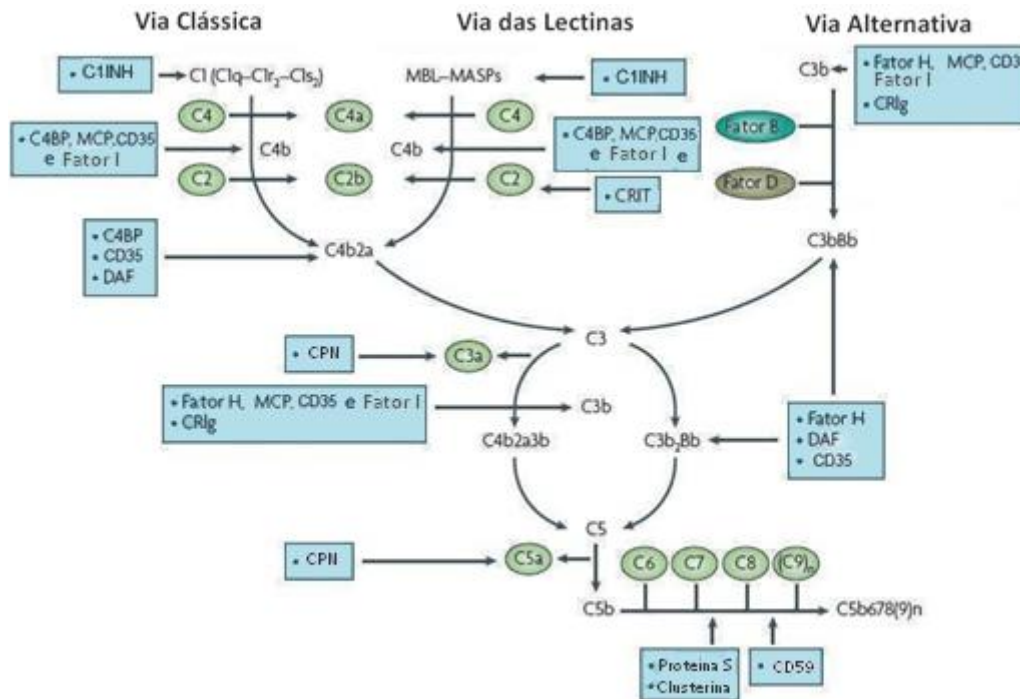
FONTE: Adaptado pelo autor de BELTRAME et al., 2015.

### 2.1.2 Regulação do Sistema Complemento

A regulação da cascata do SC é mediada por proteínas circulantes e de membrana que previnem sua ativação em células autólogas e a limitam em células de microrganismos e complexos antígeno-anticorpo. Na ausência de componentes da VA ou VC podem ocorrer deficiências na ativação do complemento, como no caso de deficiências genéticas de C1q, C4, C2 e C3. A atividade proteolítica de C1r e C1s é inibida por uma serino-protease plasmática, inibidor de C1 (C1INH), que simula o substrato normal de C1r e C1s, impedindo sua atividade, também inativa as MASP1 e MASP2 da via das lectinas que são estruturalmente semelhantes a C1r e C1s (FIGURA 3) (WAGNER; MICHAEL, 2010). A deficiência de C1INH está relacionada com o angioedema hereditário, que se caracteriza por um quadro de crises agudas ocasionais de edema nas extremidades. Já a atividade das C3 e C5 convertases é inibida pela ligação de proteínas regulatórias ao C3b e C4b na superfície celular. Na superfície de células normais, as proteínas de membrana MCP (ou CD46) e DAF (Fator de Aceleração de Decaimento) inativam C3b impedindo ativação do complemento e efeito deletério no próprio organismo (ITURRY-YAMAMOTO, PORTINHO, 2001; GOMES, LIMA, 2008).

Na VA, a ausência de properdina e/ou do fator D, alteração genética ligada ao cromossomo X, resulta no aumento da susceptibilidade à infecções por meningococos, frequentemente fatal. O Fator H conecta-se à resíduos de ácido siálico na célula hospedeira e também se liga ao C3b. O fator H é um co-fator para a proteólise de C3b pelo Fator I que controla a formação das convertases nas membranas das células do hospedeiro degradando o C3b na VA. O Fator I inativa C4b através de clivagem proteolítica que também exige um cofator solúvel, este co-fator é a proteína C4b-ligante (C4BP: C4 binding protein) (WAGNER; MICHAEL, 2010). As membranas autólogas são preservadas através da ação das proteínas DAF e CD59, proteínas ancoradas à membrana, regulam a formação das convertases de C3 e C5 e impedem a polimerização de C9, respectivamente. Um defeito nesse processo na membrana dos eritrócitos torna-os mais susceptíveis à lise pelo complemento, podendo levar ao desenvolvimento da hemoglobinúria paroxística noturna (HPN), doença caracterizada pela lise dos eritrócitos com

liberação de hemoglobina na urina (ITURRY-YAMAMOTO, PORTINHO, 2001; GOMES, LIMA, 2008).



**FIGURA 3 - MECANISMOS DE REGULAÇÃO DO COMPLEMENTO.**

NOTA: Fase solúvel: C1INH (C1 inibitor protein) é um inibidor de C1 que serve como um substrato para a serino proteases C1r e C1s, formando um complexo para inativação completa de C1. O Fator I inativa C4b e C3b através de clivagem proteolítica, está exige um cofator solúvel para C4b e C3b, estes co-fatores são as proteína C4b-ligante (C4BP: C4 binding protein) para C4b e para C3b, o fator H. Ambos (C4BP e fator H) atuam acelerando a degradação das C3 convertases, C4b<sub>2</sub>a e C3b<sub>8</sub>Bb, da VC e VA, respectivamente. A CPN (carboxi-Npeptidase) inativa as anafilatoxinas C3a e C5a. A proteína-S e a clusterina se ligam ao complexo C5b-C7 impedindo a fusão na membrana celular e polimerização de C9. Na membrana celular: O fator I apresenta como co-fatores o CD35 (ou CR1) e MCP (ou CD46) na clivagem de C4b e C3b. CD 35 também acelera a degradação das C3 convertases. O DAF (ou CD55) acelera a degradação das C3 convertases nas três vias de ativação. O CD59 (ou Pronectina) interfere na polimerização do C9. O CR1g (regulador do complemento da superfamília das imunoglobulinas), presente em macrófagos e células de Kupffer, liga-se ao C3b e bloqueia C3- e C5- convertases da via alternativa. O CRIT (Proteína trispanning *inibidora do receptor* de C2) liga-se ao C2 e impede sua clivagem por C1s, interferindo na geração da C3 convertase da via clássica.

FONTE: Adaptado de WAGNER e MICHAEL, 2010.

## 2.2 PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERAPIA

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial faz uso de plantas medicinais, muitas vezes por ser o único recurso disponível (OMS, 2002). De fato, o uso de plantas medicinais pelo homem ocorre desde a antiguidade, sendo que muitos manuscritos registraram a utilização de ervas e outros vegetais na alimentação e tratamento de diversas doenças (MACIEL; PINTO; VEIGA, et al, 2002; DEVIENNE, RADDI; POZETTI 2004; JAWLA, KUMAR, KHAN, 2012).

O conhecimento referente às plantas medicinais contribui para o desenvolvimento da medicina, auxiliando na pesquisa científica de espécies vegetais que representam possíveis fontes de novos medicamentos fitoterápicos, assim como princípios ativos para desenvolvimento de medicamentos alopáticos, agregando significativo valor social e econômico (IMAM; AKTER, 2011).

A fitoterapia consiste no uso medicinal de vegetais frescos, drogas vegetais ou extratos e frações obtidos dessas matérias primas (SILVA *et al.*, 2006). Já o medicamento fitoterápico é elaborado exclusivamente de matérias-primas vegetais ativas (RIBEIRO; LEITE; DANTAS-BARROS, 2005). Existem ainda os fitofármacos que são moléculas puras obtidas de plantas que apresentam atividade farmacológica (YUNES; PEDROSA; CECHINEL, 2001). Entre esses, pode-se citar a pilocarpina, utilizada no tratamento de xerostomia pela sua capacidade de estimular a salivação e no glaucoma, por diminuir a pressão ocular e a vincristina, utilizada como quimioterápico na leucemia aguda, entre outros tipos de câncer. Esses fitofármacos são provenientes do jaborandi (*Pilocarpus spp.*) e das folhas de vinca (*Catharanthus roseus* L.), respectivamente (SIMÕES, 2007; ALMEIDA, KOWALSKI, 2010; ANVISA, 2013;).

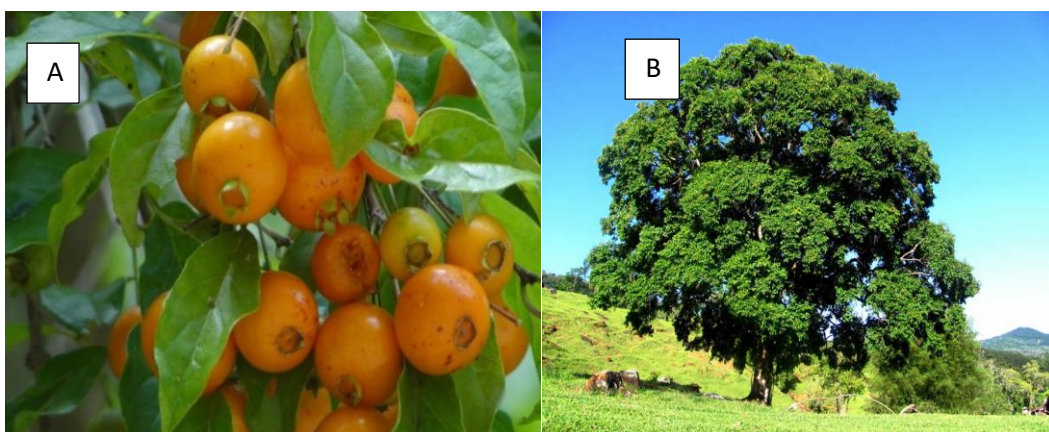
Os fitoterápicos são produtos de venda livre e movimentam cerca de 22 bilhões de dólares em todo mundo (YUNES; PEDROSA; CECHINEL, 2001). O Acheflan® é exemplo de fitoterápico anti-inflamatório desenvolvido no Brasil, obtido das folhas e ramos da espécie *Cordia verbenacea*, conhecida como erva-baleeira (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). Porém como ocorre com outros produtos, o Acheflan® não tem seu mecanismo de ação esclarecido, sendo assim, o desenvolvimento de pesquisas que possam contribuir na elucidação dos mecanismos da ação anti-

inflamatória desta espécie e outras é de fundamental importância, uma vez que estas plantas medicinais são matéria prima renovável e podem ser obtidas de forma simples e econômica, portanto sendo visadas como um forte alvo para investimentos com intuito de desenvolver opções de tratamento para doenças que tem seu curso relacionado à resposta imune mediada pelo SC.

Devido ao risco reduzido de efeitos adversos vinculados ao uso de plantas medicinais, a pesquisa referente à medicina tradicional e conseqüentemente às plantas medicinais passou a ser incentivada pela OMS, assim como a utilização das espécies vegetais pela população (SANTOS *et al.* 2012).

### 2.3 ESPÉCIE VEGETAL: *Campomanesia xanthocarpa* (Mart) Berg

A *C. xanthocarpa* é uma árvore (FIGURA 4A) de até 15m, tronco tortuoso, decídua, com copa densa arredondada, folhas verde-escuras simples, inteiras e opostas, flores esbranquiçadas e fruto globoso. Pertence à família Myrtaceae e é conhecida popularmente como guabiroba, guavira ou guabirobeira-do-campo. É uma espécie natural da região sul do Brasil, encontrada também na Argentina, Paraguai e Uruguai (LORENZI, 1992; ALICE, 1995; GOGOSZ, 2010). Seu fruto (FIGURA 4B), rico em vitamina C, possui polpa suculenta e odor característico, é consumido geralmente *in natura* ou na forma de sucos e doces. É rico em cálcio, zinco, ferro, magnésio, cobre e potássio (VALLILO, 2008). Possui teor energético baixo devido a reduzida concentração de lipídios, apenas 0,12 g em 100g do fruto (LORENZI, 1992; BIAVATTI, 2004; SILVA *et al.*, 2008).



**FIGURA 4** - FRUTOS (A) E ÁRVORE (B) DE *C. xanthocarpa*.

FONTE: Adaptadas pelo autor de Germano Woehl Junior, Instituto Rã-bugio para preservação da biodiversidade (2013).

O fruto da “guabiroba” é um alimento funcional, sua rica composição, inclui compostos bioativos, como fibras, flavonoides, saponinas e taninos, que podem estar relacionados com as atividades terapêuticas relatadas (MARKMAN; BACCHI; KATO, 2004). Estudos verificaram presença considerável de compostos fenólicos (1616 ppm/100g) e ácido ascórbico (233,56mg/100g) (SANTOS et al, 2009). Estudos químicos das folhas da *C. xanthocarpa* isolaram as substâncias quercetina, miricetina e rutina (SCHMEDA-HIRSCHMANN, 1995), flavonoides que se destacam pelo seu alto potencial antioxidante, antitumoral e efeitos protetores do sistema cardiovascular (BEHLING et al, 2004).

### 2.3.1 Aplicações na Medicina Tradicional

Existem relatos na literatura da utilização das folhas e dos frutos de *C. xanthocarpa* na medicina tradicional no combate a diversas doenças tais como reumatismo, hiperlipidemia e obesidade (TABELA 1) (ALICE, 1995; RODRIGUES, 2001; DICKEL, RATES, RITTER, 2007).

**TABELA 1** - APLICAÇÕES POPULARES DE *C. xanthocarpa*.

Parte da planta	Aplicações	Fonte
Fruto	Dor de barriga e tosse (1), obesidade (2); reumatismo (3), hiperlipidemia (2, 3); emagrecedor (4).	1-AMORIM, 2009; 2-DICKEL, RATES, RITTER, 2007; 3-RODRIGUES, 2001; 4-BADKE et al, 2011.
Folha	Adstringentes, melhoram o fluxo intestinal, cistites, uretrites e prolapso do reto (1); antidiarréicas (2); usado para “lavar” crianças com febre (3)	1-MENTZ, LUTZEMBERGER, SCHENKEL, 1997; 2- ALICE, 1995; 3-LINDENMAIER, PUTSKE, 2011.
Casca	Adstringentes, melhoram o fluxo intestinal, cistites, uretrites e prolapso do reto (1); antidiarréicas (2);	1-MENTZ, LUTZEMBERGER, SCHENKEL, 1997; 2- ALICE, 1995;

FONTE: Elaborado pelo autor (2016).

## 2.3.2 Estudos Científicos

### 2.3.2.1 Atividades Biológicas Comprovadas de *C. xanthocarpa*

O fruto e as folhas possuem propriedades medicinais, tais como ação anti-inflamatória, antidiarreica e antisséptica (ALICE, 1995; RODRIGUES; CARVALHO, 2001; DICKEL, RATES, RITTER, 2007).

Estudos *in vitro* e *in vivo* comprovaram alguns dos usos populares tradicionais da espécie, entre esses, pode-se citar a atividade antitrombótica e antifibrinolítica do extrato do fruto da “guavirova” administrado oralmente em ratos (TREVISAN et al., 2012). Outras atividades descritas incluem atividade hipolipêmica e atividade anti-inflamatória (KLAFKE et al., 2010; VIECILI et al, 2014).

Extrato hidroalcoólico de folhas de *C. xanthocarpa* demonstrou eficácia na prevenção de ulcera gástrica sem produzir toxicidade em ratos utilizando doses de até 5g/kg (MARKMAN; BACCHI; KATO, 2004). Observou-se também que o extrato de folhas inibiu a atividade da enzima xantina-oxidase “*in vitro*”, apresentando, portanto, atividade antioxidante (THEODULOZ et al., 1988). Estudos recentes do extrato do fruto de *C. xanthocarpa* demonstraram em modelo experimental de inflamação vascular efeitos comparáveis ao do ácido acetilsalicílico (ASA), com redução dos níveis dos marcadores pró-inflamatórios IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , sem o efeito ulcerogênico que é vinculado ao ASA. Sendo, portanto, essa atividade antioxidante e anti-inflamatória superior a verificada com o uso do ASA (KLAFKE et al, 2015).

Atividade antimicrobiana do óleo essencial de folhas de *C. xanthocarpa* foi demonstrada contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella cholerasuis* e *Candida albicans* (MARKMAN et al., 2002; MARIN et al. 2008). Além disso, utilizando-se extrato do fruto obtido por extração supercrítica com CO<sub>2</sub> observou-se atividade contra a bactéria gram-positiva *S. aureus* (CZAIKOSKI et al., 2015).

## 2.4 ESPÉCIE VEGETAL: *M. paradisiaca* L.

A *M. paradisiaca* L. foi identificada por Linnaeus em 1753. Pertence ao gênero *Musa* que compreende cerca de 70 espécies e à família *Musaceae* (PILLAY; TENKOUANO, 2011). É uma planta perene com importante valor socioeconômico devido ao valor nutricional do seu fruto, popularmente conhecido como banana (FIGURA 4), apresentando alto consumo em todo mundo (BORGES, OLIVEIRA, 2000; FINGOLO, 2012). A espécie teve origem no continente asiático e foi levada para a África e, em seguida, para as Américas Central e do Sul, sendo característica de regiões tropicais, estando presente em cerca de 80 países (FAO, 2015).

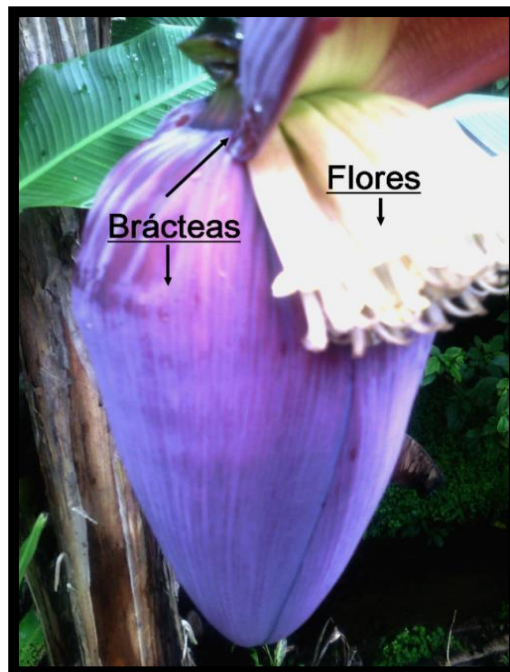


**FIGURA 5** - FOLHAS COMPACTAS, PSEUDOCAULE E A INSERÇÃO DA PENCA DE FRUTOS SEGUIDOS DA HASTE PEDUNCULOSA CONTENDO A INFLORESCÊNCIA COM UMA BRÁCTEA ABERTA E AS FLORES DE *M. paradisiaca* L.  
Fonte: O autor (2016).

A bananeira é uma herbácea de grande porte, com tronco aéreo de 2 a 9 metros de altura, com folhas compactadas que crescem diretamente do tronco e um

pseudocaule que culmina com a inflorescência de coloração violácea (FIGURA 5). A região onde se localiza a inflorescência representa a parte masculina da planta e a base que origina o cacho, onde podem se formar até 150 bananas, representa a parte feminina. (PILLAY; TENKOUANO, 2011).

O Brasil se destaca como o quinto maior produtor mundial de banana e como o país com a maior área plantada. É uma das frutas mais comercializadas no mundo, devido a sua facilidade de propagação, por ser uma cultura de ciclo curto, com rápida maturação, alto rendimento de produção em relação à área plantada, fácil manipulação e armazenamento (FAO, 2014; GUIMARÃES et al, 2014).



**FIGURA 6** - INFLORESCÊNCIA COMPLETA MOSTRANDO A COR VIOLÁCEA CARACTERÍSTICA COM UMA BRÁCTEA ABERTA E FLORES DE *M. paradisiaca* L.  
Fonte: O autor (2016).

A inflorescência da bananeira (FIGURA 6), conhecida como “coração da banana” ou “umbigo”, apesar de rica em fibras e minerais, geralmente é descartada durante a colheita do fruto (COELHO et al., 2001; FINGOLO, 2011; SILVA, SARTORI, OLIVEIRA, 2014).

### 2.4.1 Utilização na Medicina Tradicional

Existem relatos da utilização dos frutos, inflorescências, folhas, cascas, raízes e pseudocaule de *M. paradisiaca* L. na medicina tradicional, via oral e tópica, no tratamento e na prevenção de diferentes doenças, principalmente no combate a problemas respiratórios, gástricos, cutâneos e diabetes. A espécie é considerada uma planta segura, sem contraindicações e sem toxicidade (IMAM, AKTER, 2011; NISHA, MINI, 2013).

A TABELA 2 ilustra alguns exemplos de usos tradicionais, relatados na literatura de diferentes partes da bananeira.

**TABELA 2** - UTILIZAÇÃO TRADICIONAL DE DIFERENTES PARTES DA *M. paradisiaca* L.

<b>Parte vegetal utilizada</b>	<b>Relatos populares</b>
Pseudocaule	Combate à cálculos renais (1), hanseníase (5), hemorroidas (1,5), picadas de insetos, epilepsia e febre (5), tuberculose (1).
Inflorescências	Asma, bronquite e tosse (2, 3, 4, 5, 7). Combate à disenteria, úlceras estomacais, diabetes e menorragia (3,4 e 5).
Polpa dos frutos	Disenteria, constipação, diarreia (7), hipertensão e doenças cardíacas (8).
Folhas	Atividade anti-inflamatória (6), Tratamento de queimaduras e desordens cutâneas (5 e 7)
Casca do fruto	Tratamento de queimaduras, traumatismos e nevralgias (1).
Raíz	Anti-helmíntico, tratamento de doenças venéreas e desordens sanguíneas (7). Tratamento de desordens digestivas (5).

FONTE: Elaborado pelo autor (2016).

NOTA: (1) PRASAD, BHARATHI, SRINIVASAN (1993); (2) ARAUJO e LEMOS (2015); (3) MAHMOOD, OMAR e NGAH (2012); (4) SENS (2002), (5) JAWLA, KUMAR e KHAN (2012), (6) QUILEZ, GARCIA e SAÉNZ (2006); (7) IMAM e AKTER (2011).

### 2.4.2 Estudos Científicos

#### 2.4.2.1 Atividades biológicas comprovadas de *M. paradisiaca* L.

Através de estudos *in vitro* e *in vivo*, alguns dos usos populares tradicionais da espécie *M. paradisiaca* L. foram comprovados (TABELA 3) (SANTOS *et al.* 2012). Entre esses, pode-se citar a alta efetividade do fruto no combate a diarreia (RABBANI *et al.* 2001), tratamento de úlcera gástrica (LEWIS; FIELDS; SHAW,

1999), controle de hipertensão (PERFUMI; MASSI; CARO, 1994), como cicatrizante (AGARWAL et. al., 2009) e antioxidante (VIJAYAKUMAR, PRESANNAKUMAR, VIJAYALAKSHMI, 2008; SHODEHINDE, OBOH, 2013).

As inflorescências apresentam atividade antimalária (BAGAVAN et al. 2011), galactagoga (MAHMOOD; OMAR; NGAH, 2012), antibacteriana (PADAM et al. 2012), hipoglicêmica (JAWLA, KUMAR, KHAN, 2012; NISHA, MINI, 2013), antioxidante *in vivo* e *in vitro* (LOGANAYAKI, RAJENDRAKUMARAN, MANIAN, 2010; SHENG et al, 2011; PADAM et al. 2012; NISHA, MINI, 2013; NISHA, MINI, 2014), além de atividade anti-inflamatória (NISHA; MINI, 2013) e antiasmática (BOVO, 2013).

Também se observou atividade anti-inflamatória no extrato da raiz (BISWAS et al, 2012). Já a seiva do pseudocaule demonstrou potente atividade antilítica em camundongos (PRASAD; BHARATHI; SRINIVASAN, 1993) e hepatoprotetora em ratos (NIRMALA et al, 2012). Outros estudos mostraram que o extrato de frutos verdes e de folhas de *M. paradisiaca* L. reduziu a glicemia em ratos normais e diabéticos (OJEWOLE; ADEWUNMI, 2003; KAPPEL et al, 2013).

**TABELA 3** - ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *M. paradisiaca* L.

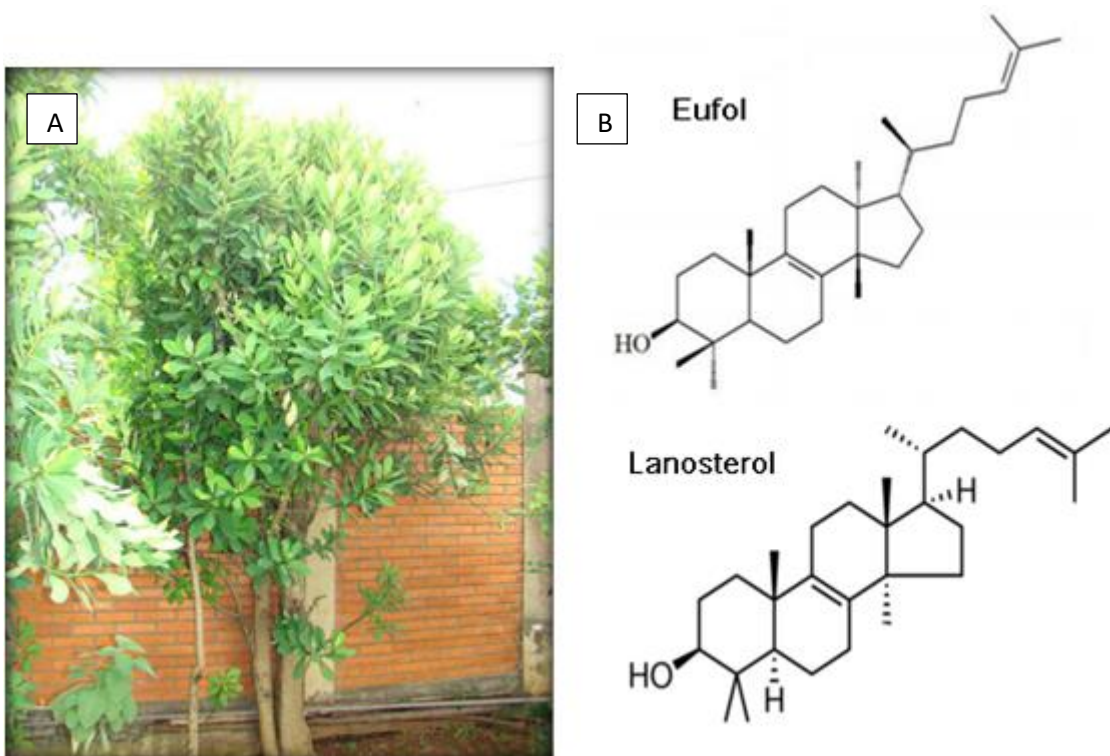
<b>Parte da planta</b>	<b>Atividade Biológica</b>	<b>Fonte</b>
Fruto	Anti-diarreico (1), hipotensivo (2), antiúlcera gástrica (3), cicatrizante (4); antioxidante (5 e 6)	1-RABBANI et al., 2001; 2-PERFUMI, MASSI, CARO, 1994; 3-LEWIS; FIELDS; SHAW, 1999; 4- AGARWAL et. al., 2009; 5-VIJAYAKUMAR, PRESANNAKUMAR e VIJAYALAKSHMI, 2008; 6- SHODEHINDE; OBOH, 2013.
Inflorescência	Antimalárica (1); galactagoga (2); antibacteriana (3); hipoglicêmica (4 e 5); antioxidante (6); atividade anti-inflamatória (9) e atividade antiasmática (10).	1- BAGAVAN et al. 2011; 2- MAHMOOD; OMAR; NGA, 2012; 3- PADAM et al., 2012; 4- JAWLA, KUMAR e KHAN, 2012; 5- NISHA; MINI, 2013; 6- SHENG et al, 2011; 7- PADAM et al. 2012; 8-NISHA; MINI, 2014); 9- NISHA; MINI, 2013); 10- BOVO, 2013.
Folha	Anti-hiperglicêmica (1 e 2)	1- OJEWOLE e ADEWUNMI 2003; 2-KAPPEL et al, 2013.
Seiva do Pseudocaule	Antiféptico (1) e hepatoprotetora (2)	1- PRASAD; BHARATHI; SRINIVASAN, 1993; 2- NIRMALA et al, 2012.
Raiz	Anti-inflamatória (1)	1- BISWAS et al, 2012.

FONTE: Adaptado pelo autor de STALDONI, 2015.

As atividades biológicas e terapêuticas citadas na literatura científica são relacionadas à riqueza em compostos bioativos como fibras, flavonoides e taninos (BHASKAR *et al.* 2011). Nas inflorescências de *M. paradisiaca* L. a presença de antocianinas foi identificada por PAZMINO-DÚRAN et al. (2001); saponinas, flavonoides e esteroides por JAWLA, KUMAR e KHAN (2012) e também por MAHMOOD, NGAH e OMAR (2011) e ácido gálico, quercetina e epicatequina por NISHA e MINI (2013).

## 2.5. EUFOL E LANOSTEROL

O Eufol e o Lanosterol são triterpenos tetracíclicos (FIGURA 7B) que podem ser isolados do látex de plantas pertencentes à família Euphorbiaceae. Pertencem a essa família plantas como a *Euphorbia tirucalli*, típica do nordeste brasileiro, conhecida como Avelóz, e a *Synadenium granti* Hook (FIGURA 7A) conhecida como cega-olho, leitossinha, janaúba ou ainda cola-nota (LORENZI, MATOS, 2002; BOCHNER, SOUZA, 2008).



**FIGURA 7** – (A) ÁRVORE *Synadenium granti* Hook f. (B) ESTRUTURA QUÍMICA DOS TERPENOS EUFOL E LANOSTEROL.

FONTE: Adaptado pelo autor de OLIVEIRA et al, 2013.

O látex branco produzido pelas Euphorbiaceas é irritante para a pele e mucosas (OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2004). A ingestão do látex em altas doses pode causar vômitos, diarreias, hemorragias devido à irritação da mucosa gástrica, vasoconstrição, contorções abdominais e hipóxia tecidual (BARBOSA, 2009; VARRICCHIO et al, 2008). Apesar da toxicidade verificada na literatura, existem relatos da utilização terapêutica do látex de Euphorbiaceas desde a idade média. Seu uso tradicional despertou o interesse da comunidade científica devido aos efeitos curativos relatados (SAPIÊNCIA, 2010).

O uso popular do látex é bastante difundido, sendo utilizado no tratamento de câncer, asma, doenças reumáticas, úlceras e inflamação (BETANCUR-GALVIS et al, 2002). A espécie conhecida como cega-olho tem seu látex utilizado tradicionalmente na forma de “garrafada” (diluição de 18 gotas em 1 litro de água) contra os diversos tipos de câncer (ORTENCIO, 1997). Pesquisas realizadas seguindo a formulação tradicional utilizando o látex de *S. grantii* comprovaram atividade anti-úlceras, com 90% de proteção gástrica em ratos (COSTA, 2012) e atividade antitumoral, reduzindo em 40% o volume de tumores tipo melanoma em ratos (OLIVEIRA et al, 2013).

O Brasil é o quarto lugar no número de publicações científicas sobre o Avelóz, sendo o Japão o primeiro, seguido pela Índia. A primeira patente relacionada às atividades biológicas da Avelóz data de 1912. Vários depósitos de patentes, datados de 2004, são referentes ao uso do látex no tratamento de vários tipos de câncer e AIDS (SILVA et al, 2013).

Diferentes estudos relataram ações farmacológicas de frações purificadas do látex bruto de *E. tirucalli*, como anti-inflamatória, anti-herpes e de citotoxicidade contra células tumorais gástricas (BETANCUR-GALVIS et al, 2002; BANI et al, 2007; LIN et al, 2012). Uma patente depositada em 2008 se refere ao uso farmacêutico de terpenóides tetracíclicos da família lanosta-8,24-dien-3-ols, que inclui o Eufol e o Lanosterol, como agentes anti-inflamatórios, antitumorais e analgésicos pela inibição da ativação das proteínas-quinase específicas de serina/treonina, especialmente a proteína quinase C (PKC) (PIANOWSKI, 2011).

Em experimento utilizando o Lanosterol *in vitro*, observou-se atividade anti-inflamatória com a diminuição da agregação de proteínas em quadro de catarata, onde se verificou redução na severidade dos sinais inflamatórios, indicando o lanosterol como uma molécula chave na prevenção e tratamento desta doença (ZHAO et al, 2015).

Diferentes estudos têm demonstrado importante atividade farmacológica do Eufol, em modelo de inflamação em roedores, este triterpeno inibiu os níveis de expressão de mediadores pró-inflamatórios, assim como a atividade da mieloperoxidase (MPO), enzima presente em leucócitos que atua na formação de espécies reativas de oxigênio e na resposta imune inata (ROMAN; WENDLAND; POLANCZYK, 2008). Os autores relataram resultados satisfatórios nos testes

toxicológicos, sendo o Eufol bem tolerado pelos animais. Outro estudo demonstrou a inibição da Ciclo-oxigenase-2 (COX-2), enzima presente em trauma tissular e inflamação (HILARIO; TERRERI; LEN 2006). Em modelo de colite com administração de Eufol por gavagem em ratos, verificou-se diminuição do processo inflamatório e da gravidade da doença (DUTRA et al, 2011). Nesse contexto, o Eufol tem sido considerado como um potencial analgésico seguro e natural no manejo da inflamação e da dor.

### 3 JUSTIFICATIVA

As plantas medicinais são fonte para os medicamentos fitoterápicos que constituem um mercado que movimenta cerca de 22 bilhões de dólares anualmente e são essenciais no combate de doenças que afetam a população (YUNES; PEDROSA; CECINEL FILHO, 2001).

A extração utilizando fluídos supercríticos se mostra vantajosa pela eliminação dos solventes utilizados no final do processo e pela segurança e inércia da maioria dos gases utilizados, representando menores chances de efeitos colaterais em experimentos biológicos relacionados ao processo de extração. Além disso, a literatura indica que os extratos obtidos através dessa técnica apresentam maior rendimento e menor risco ambiental. Desta forma, o uso da tecnologia de extração com fluidos supercríticos e comprimidos representa um método alternativo com vantagens sobre os tradicionais (MESOMO, 2013).

As espécies medicinais em estudo *M. paradisiaca* L. (inflorescência), *C. xanthocarpa* (fruto) e a mistura racêmica dos terpenos Eufol/Lanosterol tem em comum atividade anti-inflamatória relatada na literatura científica, com potencial efeito sobre o SC.

Considerando-se que a ativação do SC está associada ao processo inflamatório, a pesquisa de substâncias que modulem a sua ativação, especialmente promovendo inibição de uma ativação exacerbada, apresentam grande importância farmacológica. A investigação de substâncias capazes de modular o SC poderá ser promissora e gerar alternativas terapêuticas, especialmente para as doenças inflamatórias crônicas e autoimunes, cujos processos fisiopatológicos estão relacionados com ativação exacerbada do SC.

Nesse contexto, os resultados deste estudo poderão corroborar para o melhor conhecimento das propriedades farmacológicas e medicinais das espécies: *M. paradisiaca* L., *C. xanthocarpa* e dos triterpenos Eufol/Lanosterol.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* a atividade imunomoduladora sobre o sistema complemento de extratos de *M. paradisiaca* L., *C. xanthocarpa* e do Eufol/Lanosterol obtidos de *Synadenium granti* Hook F.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar através de uma microtécnica *in vitro* o efeito de extratos de inflorescências de *M. paradisiaca* L. obtidos por extração utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico e propano comprimido sobre as vias alternativa e clássica do SC;
- Comparar as atividades imunomoduladoras de extratos de inflorescências de *M. paradisiaca* L. obtidos por extração utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico e propano comprimido;
- Comparar as atividades imunomoduladoras sobre as vias alternativa e clássica do SC de três extratos obtidos a partir do fruto de *C. xanthocarpa* por extração supercrítica utilizando CO<sub>2</sub> como solvente em diferentes condições de temperatura e pressão;
- Determinar o efeito dos terpenóides Eufol/Lanosterol sobre a ativação das vias alternativa e clássica do SC.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DO FRUTO DE *C. xanthocarpa* (MART) O. BERG

Os extratos obtidos via extração supercrítica utilizando CO<sub>2</sub> como solvente foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Cinética e Termodinâmica Aplicada (LACTA), da Universidade Federal do Paraná. A matéria prima utilizada neste estudo, frutos de *C. xanthocarpa*, foi coletada na região de Guarapuava, Paraná, Brasil, safra 2013/2014. A identificação taxonômica foi realizada pelo no Museu Botânico Municipal de Curitiba-PR (MBM) sendo identificada pelo biólogo Eraldo Barbosa, com o número de registro do MBM: 396716.

Os frutos foram lavados e posteriormente secos em estufa com circulação de ar a temperatura de 40°C ± 2°C, durante 48 horas. O material seco foi mantido em sacos plásticos de polietileno de baixa densidade (1 kg) e armazenado a -18°C ± 2°C até seu uso.

Antes da extração, as amostras secas foram moídas com auxílio de um multiprocessador comercial de alimentos e separadas com peneiras da série de Tyler (Bertel, Brasil), aberturas 12 mesh (27,0 %), 16 mesh (20,0 %), 32 mesh (30,0 %) e 42 mesh (22,0 %), com ajuda de um agitador mecânico (Bertel, Brasil).

As extrações pressurizadas e supercríticas foram realizadas em escala laboratorial, onde o aparato experimental consiste de um extrator encamisado de alta pressão (7,98 × 10<sup>-5</sup> m<sup>3</sup> volume interno, L = 016 m and  $\phi = 2,52 \times 10^{-2}$  m) ligado a um banho termostático a uma válvula agulha com regulagem micrométrica para controle da vazão no interior de extrator, a uma bomba de seringa de alta pressão (ISCO, modelo 500D, Lincoln, NE 68504, USA) e a sensores e transdutores de pressão e temperatura. A Figura 3 mostra o diagrama esquemático da unidade experimental baseado no procedimento de extração apresentado por MESOMO et al. (2013).

Os extratos finais obtidos receberam as seguintes siglas:

CX1 - Extrato supercrítico do fruto *C. xanthocarpa* obtido à 150bar e 80°C;

CX2 - Extrato supercrítico de fruto *C. xanthocarpa* obtido à 250bar e 40°C;

CX3 - Extrato supercrítico de fruto *C. xanthocarpa* obtido à 250bar e 80°C;

## 5.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE INFLORESCÊNCIAS DE *M. paradisiaca* L.

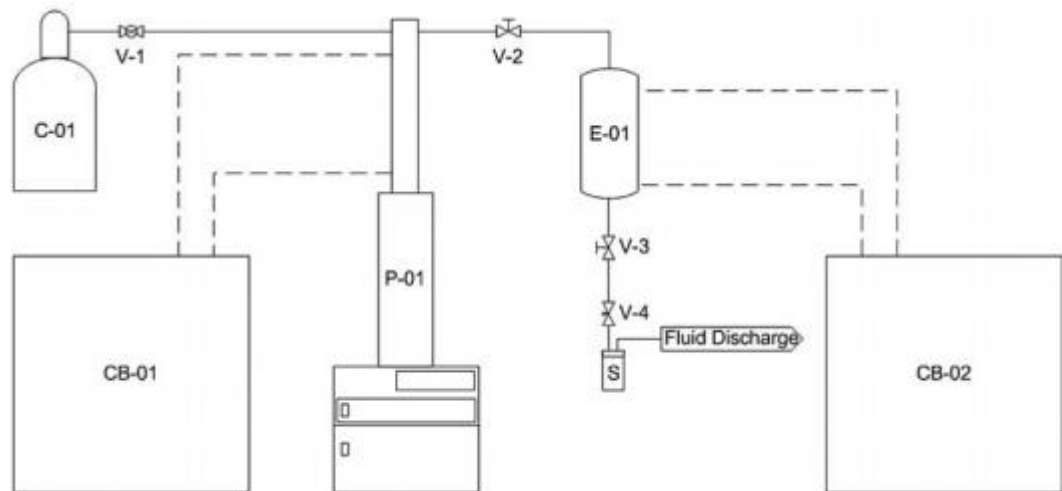
Os extratos obtidos por extração supercrítica utilizando Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>) supercrítico e o propano como solventes foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Cinética e Termodinâmica Aplicada (LACTA), da Universidade Federal do Paraná.

A matéria prima utilizada neste estudo, inflorescências da banana (*M. paradisiaca* L), foi coletada na região de Pinhão, Paraná, Brasil, no mês de agosto de 2014. A identificação taxonômica foi realizada pelo no Museu Botânico Municipal de Curitiba-PR (MBM) sendo identificada pelo biólogo Osmar dos Santos Ribas, com o número de registro do MBM: 367379.

As inflorescências foram separadas em folhas e flores e secas em estufa com circulação de ar a temperatura de 40°C ± 2°C, durante 48 horas. O material obtido foi mantido em sacos plásticos de polietileno de baixa densidade (1 kg) e armazenado a -18°C ± 2°C até sua utilização.

Antes da extração, as amostras secas foram moídas com auxílio de um multiprocessador comercial de alimentos e separadas com peneiras da série de Tyler (Bertel, Brasil), aberturas 12 mesh (23,5 %), 16 mesh (23,5 %), 32 mesh (34,5 %) e 48 mesh (18,5 %), com ajuda de um agitador mecânico (Bertel, Brasil).

As extrações pressurizadas e supercríticas foram realizadas em escala laboratorial, onde o aparato experimental consiste de um extrator encamisado de alta pressão (7,98 × 10<sup>-5</sup> m<sup>3</sup> volume interno, L = 016 m and  $\phi = 2,52 \times 10^{-2}$  m) ligado a um banho termostático a uma válvula agulha com regulagem micrométrica para controle da vazão no interior de extrator, a uma bomba de seringa de alta pressão (ISCO, modelo 500D, Lincoln, NE 68504, USA) e a sensores e transdutores de pressão e temperatura. A FIGURA 8 mostra o diagrama esquemático da unidade experimental baseado no procedimento de extração apresentado por MESOMO (2013).



**FIGURA 8** - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA UNIDADE EXPERIMENTAL PARA EXTRAÇÃO PRESSURIZADA E SUPERCRÍTICA.

FONTE: MESOMO (2013).

NOTA: C-01:cilindro do fluido de extração; CB-01 e CB-02:banhos termostáticos; P01:bomba tipo seringa; E-01:extrator; S:armadilha para coleta do extrato; V-1:válvula tipo esfera; V-2 e V-3:válvulas tipo agulha; V-4:válvula tipo agulha micrométrica; linhas pontilhadas: fluido de troca térmica; linhas contínuas: fluido comprimido de extração+extrato.

Para a extração supercrítica e subcrítica foram usados  $\text{CO}_2$  (White Martins S.A., 99.5% pureza na fase líquida) e propano (White Martins S.A., 99.5% pureza na fase líquida) como solventes. As extrações foram realizadas com fluxo constante de  $2,0 \pm 0,2 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$  para ambos os solventes. Para todas as condições, o extrator foi carregado com aproximadamente  $20,0 \pm 0,2 \text{ g}$  das inflorescências secas e moídas, com teor de umidade de  $8,50 \pm 0,51\%$  formando um leito fixo. Os experimentos foram realizados nas temperaturas de  $40^\circ \text{C}$  e pressão de  $25 \text{ MPa}$  para as extrações com  $\text{CO}_2$ , e  $35^\circ \text{C}$  e pressão de  $3 \text{ MPa}$  para as extrações usando propano. As amostras de extrato foram coletadas em frascos âmbar e pesadas para em um tempo total de processo de 180 minutos (CORREA, 2016).

Os extratos finais obtidos neste processo foram identificados com as seguintes siglas:

M1 - Extrato supercrítico de *Musa paradisiaca* L. obtido à  $30 \text{ bar}$  e  $35^\circ \text{C}$  (Propano).

M2 - Extrato supercrítico de *Musa paradisiaca* L. obtido à  $250 \text{ bar}$  e  $40^\circ \text{C}$  ( $\text{CO}_2$ ).

### 5.3 OBTENÇÃO DA MISTURA DE EUFOL/LANESTEROL

A mistura racêmica de Eufol e Lanosterol foi gentilmente cedida pelo laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) para avaliação de sua ação sobre o SC, e recebeu a sigla E1 para sua identificação nos experimentos. As substâncias foram obtidas da espécie *Synadenium grantii* Hook. f. (Euphorbiaceae), coletada em Ponta Grossa, PR, e sua identificação taxonômica foi realizada pelo Museu Botânico Municipal de Curitiba-PR, número de registro MBM: 363509.

Para obtenção de Eufol/Lanosterol, o látex fresco (48g, densidade 1,22g/mL) obtido de *S. grantii* foi particionado utilizando coluna cromatográfica a vácuo (CCV - gel de sílica 60, malha 35-70) eluído com hexano, seguido por CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e MeOH como solventes (polaridade crescente). As frações resultantes foram mantidas sob refrigeração (4°C). A fração hexânica foi submetida ainda a um particionamento líquido-líquido com hexano (FH) e metanol (FM).

Parte da FH (6,5 g) foi submetida a uma coluna cromatográfica (CC), contendo sílica 35–70 mesh (61g) e cromatografada empregando os eluentes Hex, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e MeOH obtendo-se 207 sub-frações. As frações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) e reunidas com base na semelhança de fator de retenção R<sub>f</sub> das manchas observadas. A sub-fração FH 1-26 (hexano:clorofórmio, 8:2, v/v), foi novamente particionada em CC com sílica 35–70 mesh, gerando 142 sub-frações. Da sub-fração 118-122 (hexano:clorofórmio, 7:3, v/v), após cromatografia empregando o modo flash de eluição obteve-se o substância E1 (Eufol/Lanosterol – 0,020g, hexano-diclorometano, 7:3, v/v). As estruturas destes compostos foram elucidadas através de análises espectroscópicas de IV e RMN de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H e comparação com dados da literatura (OLIVEIRA et al, 2013).

## 5.4 EXPERIMENTOS IN VITRO AVALIANDO A ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO SC

### 5.4.1 Teste de fixação do SC

As atividades da VC e da VA do SC foram analisadas através do teste hemolítico de fixação de complemento. Os resultados obtidos foram expressos em relação à percentagem de hemólise, sendo comparados com diferentes controles e/ou tratamentos, com ausência e presença de soluções-teste em diferentes concentrações, como descrito por ALBAN et al. (2002).

### 5.4.2 Preparo das suspensões de eritrócitos de carneiro

Para avaliação da hemólise promovida pela VC foi utilizado sangue de carneiro obtido comercialmente e armazenados em solução anticoagulante EDTA.Na<sub>2</sub>.

Para o preparo da suspensão de eritrócitos da VC, 5mL do sangue de carneiro foram centrifugados por 5 min a 1440 x g. e a papa de hemácias obtida foi submetida a três lavagens seguidas com solução de NaCl 0,9 % (m/v) e uma vez com tampão HEPES (HEPES 10Mm, NaCl 150Mm, CaCl<sub>2</sub> 0,11Mm, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, pH 7,4), este tampão foi identificado com a sigla HC (tampão HEPES da VC). Após a última centrifugação, os eritrócitos foram ressuspensos com o tampão HC, obtendo a concentração de 2,4% (v/v) ( $2,5 \times 10^8$  céls/mL). Para sensibilização dos eritrócitos de carneiro foi adicionado volume igual de hemolisina (soro de coelho anti-hemácia de carneiro Laborclin, Curitiba, PR, Brasil) na concentração 1:4000 e o material foi incubado por 30min à 37°C. No final da sensibilização, a suspensão de eritrócitos de carneiro na concentração de 1,2% ( $1,25 \times 10^8$  céls/mL) foi utilizada para avaliação da VC.

### 5.4.3 Preparo das suspensões de eritrócitos de coelho

Para a avaliação da hemólise promovida pela VA foi utilizado sangue de coelho obtido comercialmente e armazenados em solução anticoagulante EDTA.Na<sub>2</sub>.

Para a avaliação da VA, 5 mL de sangue de coelho foram centrifugados por 5min a 1440 x g. Os eritrócitos foram então recolhidos e lavados três vezes com

solução de NaCl 0,9% (m/v) e um vez com o tampão HEPES/EGTA com Mg<sup>2+</sup> (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 7 mM, EGTA 10 mM, pH 7,4). Este tampão foi denominado tampão HA (HEPES - VA). Após a última centrifugação, os eritrócitos foram ressuspensos no tampão HA, obtendo-se uma suspensão de eritrócitos na concentração final de 2,4% (v/v) que foi posteriormente utilizada para avaliação da VA.

#### 5.4.4 Obtenção de soro humano

Um pool de sangue humano, foi utilizado como fonte dos componentes do SC. O sangue total foi obtido de doadores voluntários saudáveis e, em seguida, foi armazenado sobre refrigeração (2-8°C) até coagulação total, centrifugado por 20 min à 3500 x g e 12°C. Após preparação do pool das amostras de soro de humano normal (SHN) foi separado em alíquotas em micro tubos plásticos e mantido sob refrigeração à -80°C, até sua utilização.

#### 5.4.5 Preparo das soluções-teste utilizadas nos testes de fixação do complemento

Para a preparação das soluções-teste a serem utilizadas nos testes de fixação do complemento, os extratos M1, M2, CX1, CX2, CX3 e E1 foram solubilizados em tampão HEPES 10 mM, NaCl 150 mM (HE) e Dimetilsulfóxido (DMSO 20%) na concentração de 333 µg/ mL de CX1, CX2, CX3, M1 e M2, para os extratos de *C. xanthocarpa*, *M. paradisiaca* L. e 500 µg/ mL para E1. A partir dessas soluções, foram realizadas as diluições em série (fator 2) das amostras, originando as demais concentrações a serem testadas nos experimentos: 166,5 µg/mL, 83,250 µg/mL, 41,625 µg/mL, 20,813 µg/mL, 10,406 µg/mL, 5,203 µg/mL e 2,602 µg/mL de *C. xanthocarpa* e *M. paradisiaca*; e 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,25 µg/ml, 15,63 µg/ml e 7,81 µg/ml de Eufol/Lanosterol (peso de extrato obtido em volume de solvente). Essas correspondem as concentrações finais das soluções-teste no experimento.

Heparina suína (5.000 UI/mL) foi utilizada como controle positivo de inibição do SC em ambas as vias, o Zimosan como controle positivo de ativação do SC da VA na concentração de 0,5mg/mL diluído em tampão (HE) e Triton X 100 como controle positivo de ativação do SC na VC.

#### 5.4.6 Padronização dos ensaios hemolíticos

Para a avaliação da ativação do SC pelas VC e VA foi padronizada a concentração do solvente onde as amostras seriam diluídas (Tampão HE/DMSO).

O ensaio foi iniciado com a preparação de suspensões de hemácias de coelho 2,4% em tampão HA e carneiro 1,2% em tampão HC. Foram incubados 50 µL de cada suspensão de hemácias com 20 µL de DMSO nas concentrações de 1%, 5%, 10%, 20%, 50% e 100%, diluídos em tampão HE. A essas suspensões acrescentou-se ainda 50 µL de tampão (Tampão HA para VA e HC para VC). Os tubos foram incubados por 30 min a 37°C em estufa térmica e centrifugados por 5 min a 1440 x g. Foram transferidos 70 µL do sobrenadante para placas de 96 poços de fundo chato (Techno Plastic products AG® - TPP- Trasadingen - Suíça) e a leitura foi realizada a 405 em espectrofotômetro de microplacas (marca Bio Tek, modelo EPOCH, Winooski, EUA) (ALBAN et al, 2002).

Foram utilizados como controle positivo (100% hemólise): suspensões de hemácias de coelho e carneiro incubadas com 70µl de Triton X 100 e como controle negativo (0% de hemólise) suspensões de hemácia de coelho ou carneiro com solução tampão.

As porcentagens de hemólise das diferentes concentrações de DMSO e amostras testadas foram calculadas comparando-se as absorbâncias obtidas frente ao controle positivo (100% hemólise).

A maior concentração de DMSO não hemolítica foi utilizada como solvente dos extratos testados nas concentrações especificadas no item 5.4.4.

#### 5.4.7 Titulação do SHN

Para a realização da titulação do SHN, foi realizada uma curva de titulação para determinação do título de SHN (quantidade de SHN necessária para provocar 50% de hemólise dos eritrócitos de carneiro e coelho) a ser utilizado nos ensaios. Para isso, alíquotas de 50 µL de SHN diluídas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800) em tampão HC foram adicionadas a 50 µL de suspensão de eritrócitos de carneiro 1,2 % (v/v) previamente sensibilizada com hemolisina para a VC, ou eritrócitos de coelho 2,4% com tampão HA para a VA. Acrescentou-se ainda a cada amostra, 20 µL do tampão correspondente a cada via (ALBAN et al, 2002).

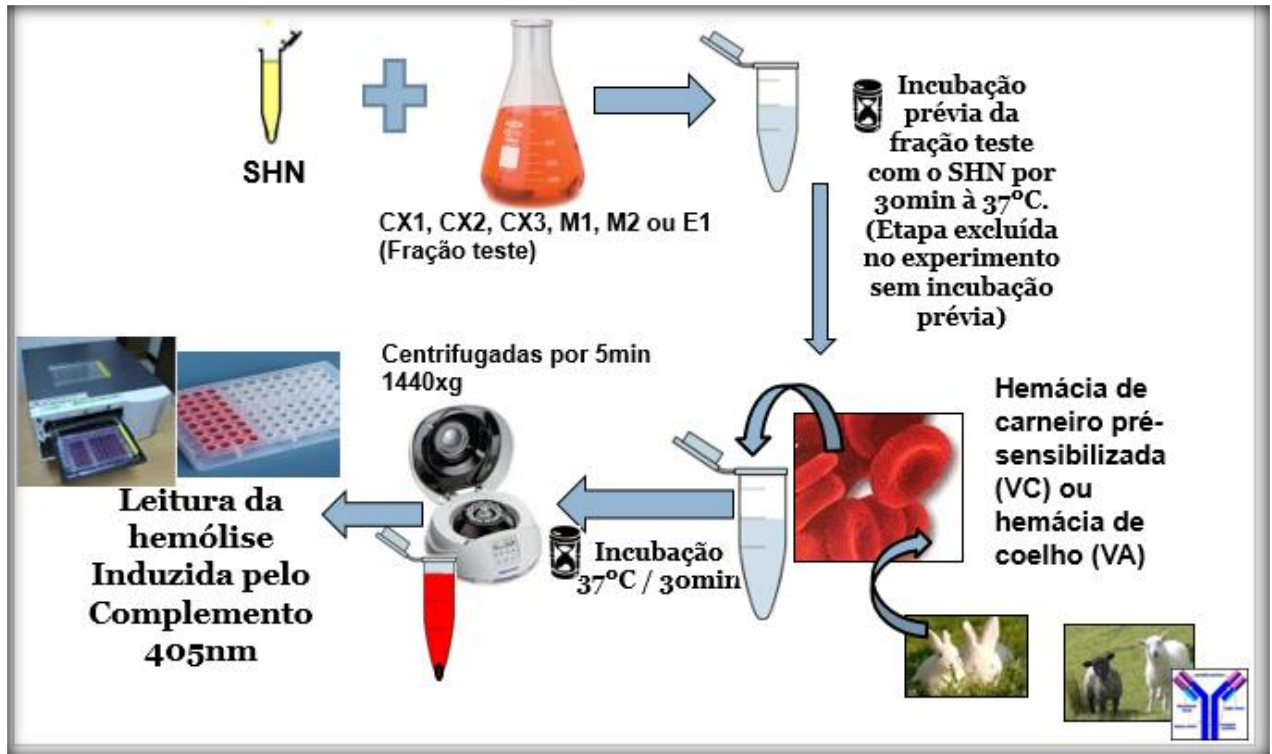
Os tubos foram então incubados por 30 min a 37°C e submergidas em gelo, logo em seguida a centrifugação foi realizada por 5 min a 1440 x g. Findo esse processo, 70 µL do sobrenadante foi transferido para placas de 96 poços de fundo chato (Techno Plastic products AG® - TPP- Trasadingen - Suíça) e a leitura foi realizada a 405 nm em espectrofotômetro de microplacas (marca Bio Tek, modelo EPOCH, Winooski, EUA). O experimento foi realizado em triplicata.

Os controles positivos e negativos foram os mesmos relatados no item 5.4.6.

#### 5.4.8 Ensaio para a avaliação da VC e da VA

##### 5.4.8.1 Ensaio com 30min de pré-incubação para VC e VA

Para a realização do ensaio de avaliação da VC e da VA com prévia incubação, foram incubados 20µL de frações testes dos extratos: M1, M2, CX1, CX2, CX3 e o E1, diluídos nos respectivos tampões de cada via do SC, com 50 µL de SHN por 30 minutos, a 37°C em estufa térmica. Em seguida, 50 µL da suspensão de eritrócitos (de carneiro pré-sensibilizadas com hemolisina para VC ou de coelho para VA) foram adicionados. As amostras foram incubadas novamente por 30 min a 37°C (FIGURA 9).



**FIGURA 9 – ESQUEMA DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS DA VA E VC DO COMPLEMENTO.**

NOTA: Este processo foi executado para avaliação da VA e VC do complemento, primeiramente com a incubação prévia do SHN junto à fração teste e em um segundo experimento, sem a etapa de incubação prévia. Para a VC utilizou-se hemácias de carneiro pré-sensibilizadas com hemolisina e para a VA hemácias de coelho.

Finda a incubação, as amostras foram então retiradas da estufa e submergidas em gelo, para a garantia de parada total da ação do complemento e em seguida, centrifugadas (1440xg, 5min) e os sobrenadantes foram transferidos para placa com 96 poços. A absorbância a 405nm foi medida utilizando um leitor de microplacas (BioTek, model EPOCH, Winooski, VT, USA). Os controles utilizados nos experimentos foram:

- Controle 1- SHN+hemácias + tampão= 100% de lise;
- Controle 2- SHN+tampão= Absorbância do soro;
- Controle 3- Hemácias e tampão= 0% de hemólise;
- Controle 4- Amostras e tampão= absorbância das amostras;
- Controle 5- Amostras+hemácias + tampão= controle de hemólise das amostras;
- Controle 6- heparina+hemácias+SHN= controle da inibição da hemólise;
- Controle 7- zimozan+hemácias+soro= controle da ativação da VA do SC;
- Controle 8- Triton X 100 + Hemácias = controle da hemólise (100%).

Os valores de absorvâncias foram tabulados conforme a fórmula:

$$A_L - A_A = A_C$$

Onde:

$A_L$  é a absorvância lida (amostra + complemento + hemácias)

$A_A$  é absorvância obtida apenas pela amostra (controle 4)

$A_C$  é a absorvância calculada

As porcentagens de hemólise foram calculadas pela fórmula abaixo:

$$\% \text{ de hemólise} = \frac{A_C}{A_S} \cdot 100$$

Onde:

$A_C$  é a absorvância calculada

$A_S$  é a absorvância obtida com 100% de hemólise (controle 1)

#### 5.4.8.2 Ensaio sem pré-incubação para VC e VA

Para a realização do ensaio avaliação da VC e da VA sem prévia incubação, adicionou-se 50  $\mu$ L de suspensão de eritrócitos (coelhos ou carneiro) a 20  $\mu$ L das frações dos extratos testes (M1, M2, CX1, CX2, CX3 e E1) e 50  $\mu$ L de SHN (1:32 VC ou 1:16 VA). Este material foi incubado por 30min à 37°C. As amostras foram então retiradas da estufa e submergidas em gelo, para a garantia de parada total da ação do complemento. Em seguida, essas foram centrifugadas (1440xg, 5min) e os sobrenadantes transferidos para placa com 96 poços. A absorvância a 405nm foi medida utilizando um leitor de microplacas (BioTek, model EPOCH, Winooski, VT, USA). As absorvâncias foram calculadas da mesma forma que o ensaio com 30min de pré-incubação, e também foram utilizados os mesmos controles.

## 5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O Teste Tuckey foi utilizado para análise de comparação das médias dos diferentes experimentos. Foram considerados significativos resultados com  $p < 0,05$ . A análise foi realizada através do software GraphPad Prism (versão 2013).

## 5.6 ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA

As atividades referentes aos bioensaios utilizando animais de laboratórios foram realizadas de acordo com as normas do Comitê de Ética de Experimentação Humana da Universidade Federal do Paraná.

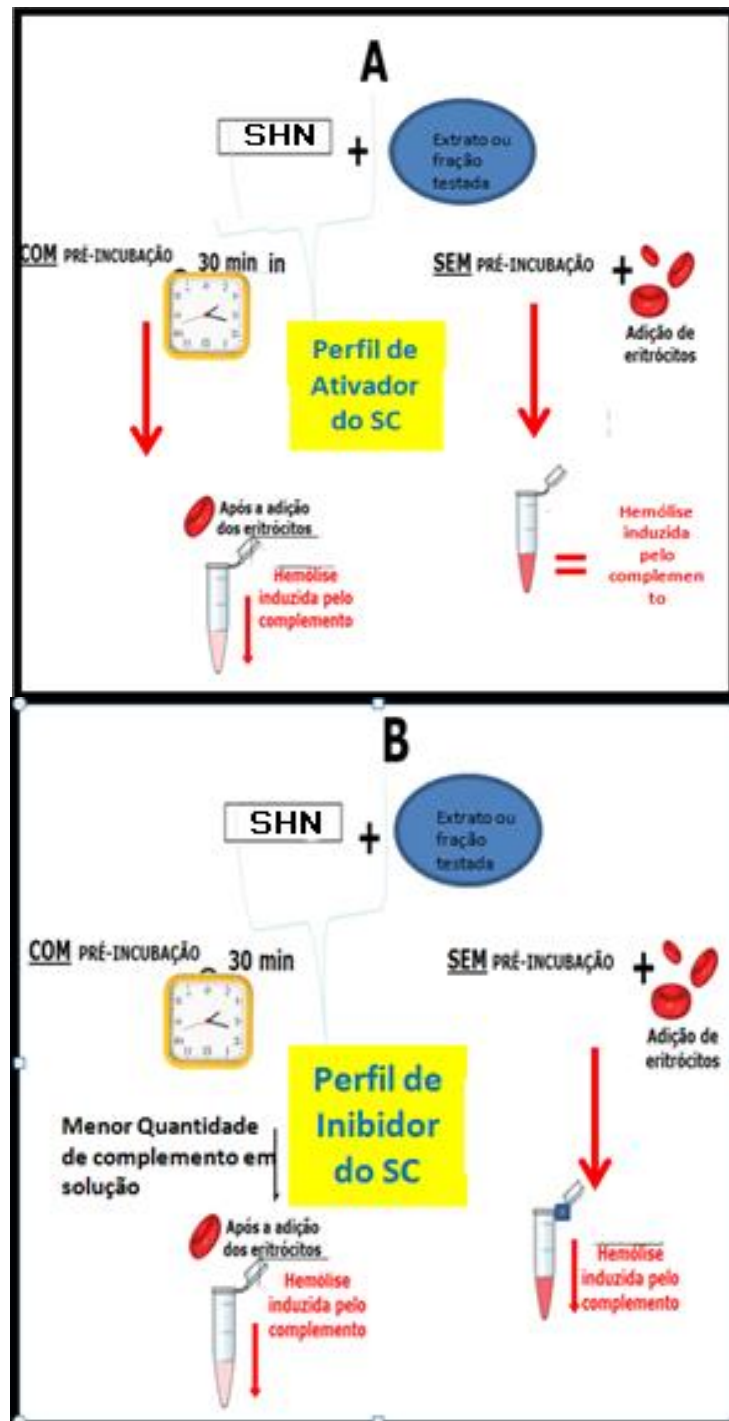
## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ativação do SC gera vários fragmentos solúveis e não solúveis, que apresentam importantes funções biológicas, como as anafilotoxinas que atuam como mediadores da inflamação, promovendo recrutamento e ativação de células inflamatórias (DUTTA; DAS; BANERJI, 1983). Além disso, a ativação do SC induz a opsonização e fagocitose de patógenos e está envolvida em vários processos fisiológicos, como a eliminação de complexos imunes, regeneração tecidual e o metabolismo lipídico (CARROLL, SIM, 2011; RICKLIN, LAMBRIS, 2013).

Conseqüentemente, a imunomodulação do SC representa importante estratégia, especialmente no que se refere à resposta inflamatória. Ressalta-se que tanto a inibição quanto a ativação do SC representam atividades importantes para o desenvolvimento de novos medicamentos.

Para avaliar a atividade de extratos vegetais e moléculas isoladas de vegetais, muitos estudos utilizam o ensaio hemolítico conhecido como teste de fixação do complemento. O teste de fixação do complemento, quando realizado de maneira convencional, com incubação prévia, não permite distinguir se os compostos testados promovem uma inibição ou ativação do complemento, uma vez que em ambos os casos se observa uma redução da porcentagem de hemólise aparente, principalmente em relação à VC do SC (LENZI, 2011).

Assim, no presente estudo, os extratos/frações testados foram avaliados quanto a sua capacidade de modulação tanto da VC quanto da VA do SC, através do ensaio hemolítico descrito por YAMADA et al (1985), com modificações sugeridas por ALBAN et al (2002). A partir dos resultados obtidos é possível inferir se os extratos testados atuam como inibidores ou ativadores do complemento (FIGURA 10).



**FIGURA 10** - EXPLICAÇÃO ESQUEMÁTICA DA INTERPRETAÇÃO DO ENSAIO HEMOLÍTICO COM RESULTADO DE ATIVAÇÃO (A) OU INIBIÇÃO (B) DO SC.

NOTA: (A) A ativação ocorre quando as frações/extratos testados desencadeiam a cascata do CS, podendo provocar o consumo dos componentes do CS presentes em solução. Assim, depois de 30 min de incubação uma quantidade menor de compostos do complemento continua a ser ativada por eritrócitos sensibilizados. Amostras de HPS mais as frações/extratos testados foram incubadas durante 30 min (com pré-incubação) ou 0 minutos (sem pré-incubação) e os valores de hemólise foram calculados. (B) A inibição ocorre quando uma fração ou extrato testado impede a ativação do CS e nesse caso os valores de hemólise obtidos são semelhantes, independentemente do tempo de incubação.

FONTE: Adaptado pelo autor de LENZI, 2011.

O método se baseia na hemólise de eritrócitos causada pelo complemento presente no soro humano. Quando os eritrócitos são lisados liberam a hemoglobina na solução, gerando coloração vermelha que pode ser mensurada por espectrofotômetro no comprimento de onda de 405nm. (ALBAN et al, 2002; LENZI, 2011).

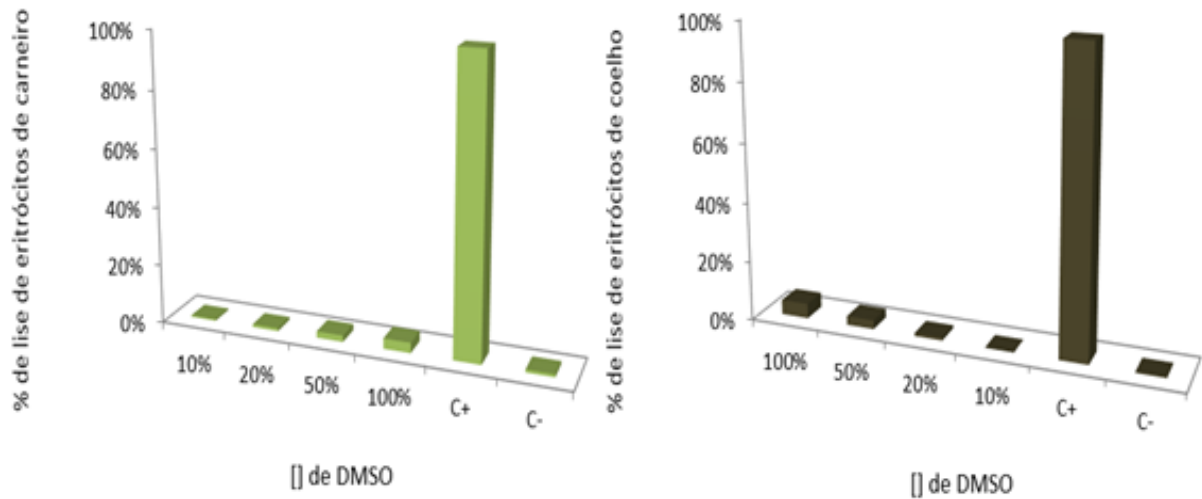
Várias substâncias ou moléculas são capazes de modular o SC. Componentes de cápsulas bacterianas, como lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) são ativadores da VC e da VA. Já polissacarídeos sulfatados, como a heparina, dextran sulfato ou fucanas são inibidores de ambas as vias (ALBAN et al., 2002). O zimosan, polissacarídeo preparado da parede celular de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* tem a capacidade de ativar a VA do SC através da opsonização de partículas com componentes do SC (C3b, C3bi), após contato com soro sanguíneo sem fibrinogênio. Esses fragmentos são reconhecidos por receptores de membrana dos neutrófilos CR1 e CR3, promovendo o processo de fagocitose (SATO, SANO, IWAKE, 2003; ROSAS et al, 2015).

## 6.1 PADRONIZAÇÃO DE DMSO/ TAMPÃO HE

O dimetilsulfóxido (DMSO) é um solvente utilizado comumente para diluição de medicamentos hidrossolúveis, lipossolúveis e como conservante celular, sendo empregado também como medicamento para redução da pressão intracraniana e de lesões do sistema nervoso central, dentre outras aplicações (MASTRO *et al.*, 2001; JACOB; TORRE, 2009).

O DMSO pode possuir capacidade hemolítica em altas doses, portanto, fez-se necessário testá-lo, separadamente, nos ensaios para verificar seu comportamento frente às hemácias testadas.

Os resultados obtidos mostraram que o DMSO na concentração de até 20% em tampão HE não provocou hemólise significativa tanto para eritrócitos de carneiro (FIGURA 11A) como para eritrócitos de coelho (FIGURA 11B) e, portanto, essa concentração foi escolhida para solubilização das amostras testes do presente estudo. Resultado que corrobora com estudo de BLYTHE et al. (1986) que indica que concentrações >20% de DMSO podem causar hemólise *in vivo*.



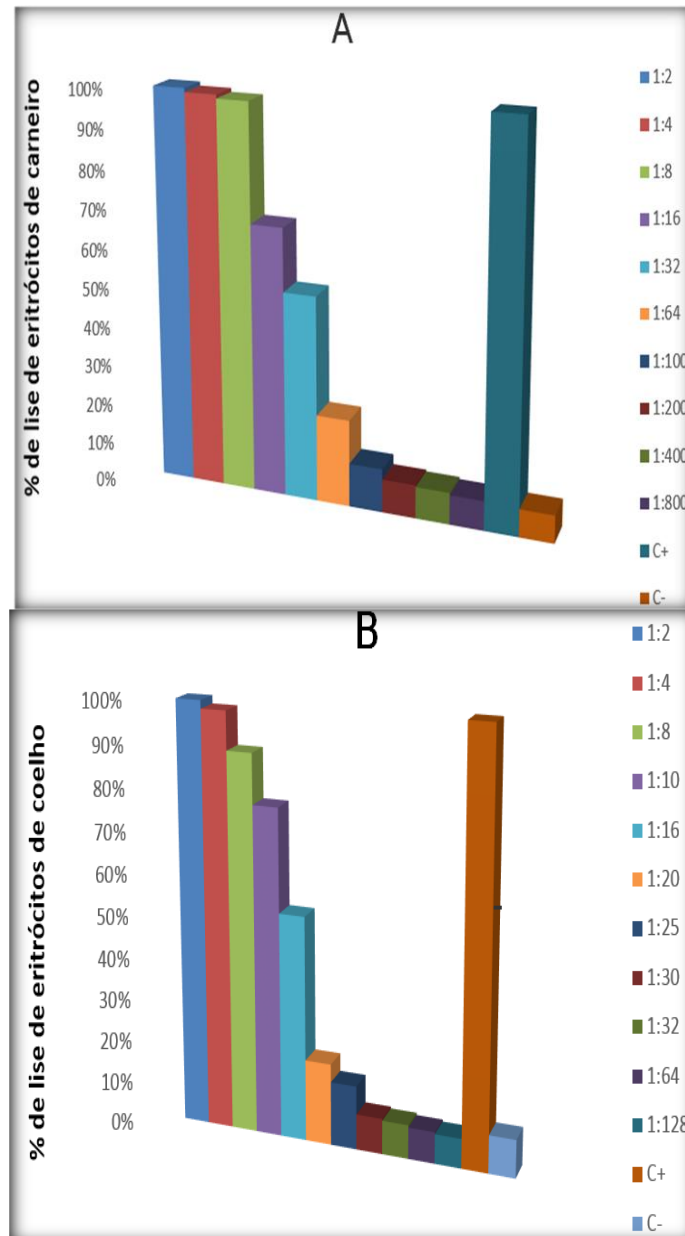
**FIGURA 11** - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DMSO UTILIZANDO HEMÁCIAS DE CARNEIRO (A) E COELHO (B).

FONTE: O autor (2016).

NOTA: Em ambos os gráficos \*C+ representa o controle de lise 100% com Triton e C- o controle de lise 0% com tampão.

## 6.2 TITULAÇÃO DO SHN E DETERMINAÇÃO DA CH50%

A determinação da CH50% de SHN a ser utilizada nos ensaios da VC e da VA, ou seja, a concentração de SHN necessária para provocar 50% lise de eritrócitos de carneiro ou coelho foi realizada e os resultados demonstrados nas Figuras 12A e 12B.



**FIGURA 12** – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO HEMOLÍTICA 50% DO SHN, PARA HEMÁCIAS DE CARNEIRO (A) E COELHO (B).

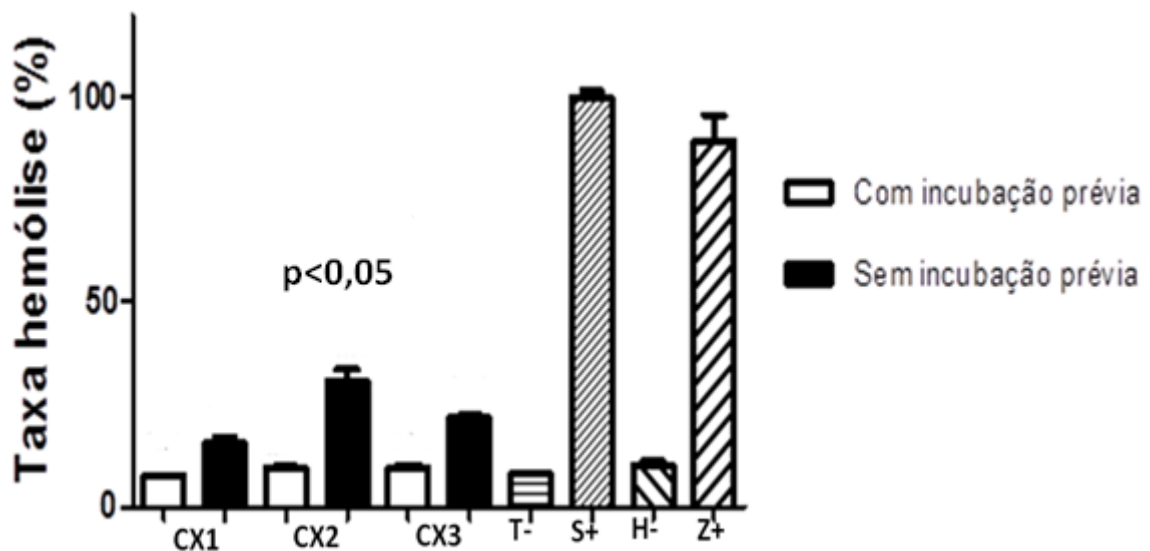
FONTE: O autor (2011)

NOTA: A CH 50% encontrada na diluição 1:32 (A) e para as hemácias de coelho encontrada na diluição 1:16(B).

Os resultados mostram que o título do soro para a VC foi encontrado na diluição 1:32 (FIGURA 12A) e a para a VA o título foi de 1:16 de SHN (FIGURA 12B), esses títulos foram utilizados nos ensaios teste.

### 6.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS EXTRATOS CX1, CX2 e CX3 de *C. xanthocarpa* NA IMUNOMODULAÇÃO DA VIA ALTERNATIVA DO SC

O efeito dos extratos CX1, CX2 e CX3 sobre a VA do SC foi avaliado na concentração de 333 µg/ml. Os resultados mostraram que os três extratos testados apresentaram diminuição significativa da hemólise tanto nos experimentos com incubação prévia como sem incubação (FIGURA 13). A interpretação desses dados (FIGURA 10) mostra que os extratos são capazes de inibir o SC através da VA nas concentrações testadas.



**FIGURA 13** - TAXA DE HEMÓLISE DA VA DO SC SOB A AÇÃO DOS EXTRATOS DE *C. xanthocarpa*, NA CONCENTRAÇÃO DE 333µg/ml.

FONTE: O autor (2016).

NOTA: T: Controle 4, (tampão) e H: Controle 6 (Heparina), controles de inibição da ativação do SC, S: Controle 1 (SHN) e Zi: Zimosan, controles positivos de ativação do SC. O número 1 representa o experimento sem incubação prévia. \*\*\* significativo em relação ao controle S. ( $p < 0,05$ .)

Cada valor é expresso como a média do ensaio em triplicata  $\pm$  desvio padrão.

Houve uma diferença estatisticamente significativa entre a inibição de hemólise obtida com CX1 em relação a CX2 e CX3, demonstrando que o extrato CX1 promoveu uma inibição mais eficiente da VA. Esses dados sugerem que diferentes temperaturas e pressões na operação de extração podem influenciar a ação dos extratos sobre o SC, provavelmente devido à obtenção de diferentes composições obtidas nos extratos quando há variações desses parâmetros, como se observa na Tabela 4, vários componentes obtidos estão exclusivamente presentes

em CX1. O  $\alpha$ -gurjuneno, allo-aromadendreno,  $\alpha$ -bisaboleno e o guaiol estão ausentes em CX2 e CX3. Estes compostos podem estar relacionados a uma melhor atividade de inibição do SC.

Czaikoski et al (2015) verificou que utilizando o método de extração supercrítico, em diferentes condições de temperatura e pressão, diferentes substâncias e concentrações variáveis puderam ser identificadas na fração volátil dos extratos analisados (TABELA 4).

**TABELA 4** - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO VOLÁTIL DOS EXTRATOS DO FRUTO DE *C. xanthocarpa*, CX1, CX2 e CX3.

COMPOSTOS	CX1	CX2	CX3
Alfa-bisaboleno	0,38	-	-
Alfa-gurjuneno	0,31	-	-
Alfa-sabineno	7,53	8,62	8,62
Allo-aromadendreno	0,40	-	-
Aromadendreno	0,39	-	-
Beta-chamigreno	0,97	0,95	0,82
Beta-sabineno	7,34	8,35	7,73
Cadian-1,4-dieno	1,28	1,39	1,31
Cariofileno	7,49	10,61	9,03
Epi- $\alpha$ -cadinol	1,54	1,23	1,32
Germacreno B	4,67	5,49	4,78
Guaiol	0,77	-	-
Hinesol	1,35	1,21	1,29
Humuleno	3,55	4,43	3,89
Oxido Cariofileno	1,04	-	1,01
Selina-3,7(11) dieno	4,04	4,53	4,31
Spatulenol	1,33	1,12	1,23
$\gamma$ -cadineno	1,77	1,87	1,76
$\gamma$ -Eudesmol	8,42	9,70	10,16
$\alpha$ - e $\beta$ -Eudesmol	22,83	24,81	25,89
$\alpha$ -Cadineno	3,25	3,58	3,34
$\delta$ - Cadineno	4,43	4,99	4,70

NOTA: A determinação foi realizada por Cromatografia gasosa – Espectrometria de massas (CG-MS), os cálculos feitos por normalização e os resultados foram expressos em porcentagem. Os extratos supercríticos do fruto *C. xanthocarpa* aqui analisados foram obtidos às seguintes condições de pressão e temperatura: 150bar e 80°C (CX1); 250bar e 40°C (CX2) e 250bar e 80°C (CX3).

FONTE: Adaptado pelo autor de CZAIKOSKI et al, 2015.

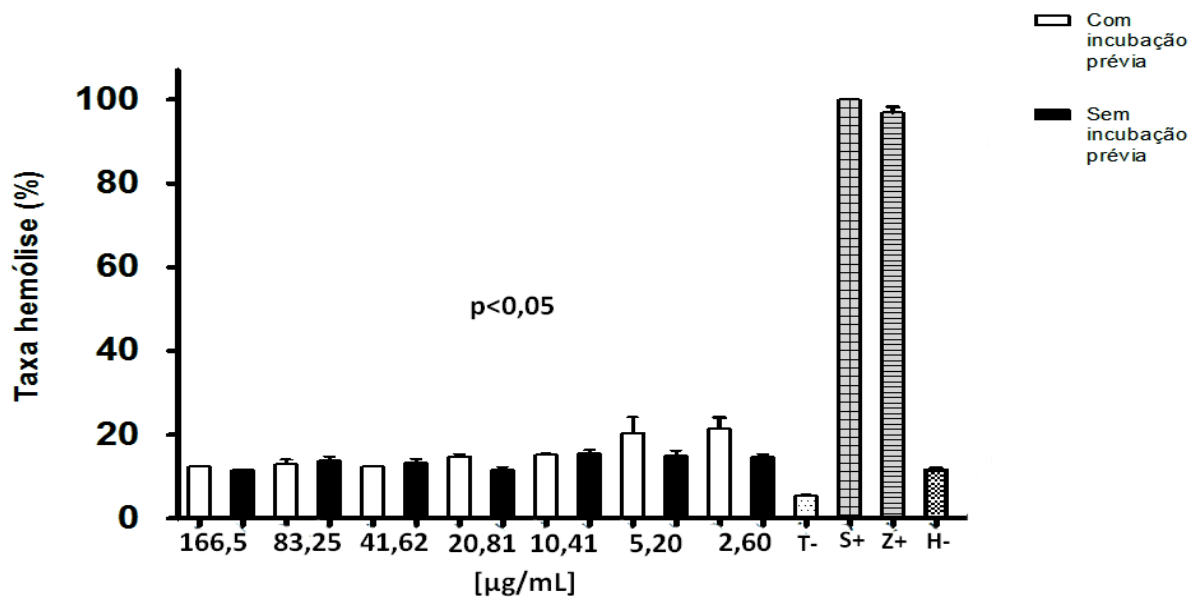
As folhas da espécie *C. xanthocarpa* tem atividade anti-inflamatória já comprovada cientificamente (KLAFKE et al., 2015). Nesse estudo, os autores demonstraram aumento dos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 superior ao ASA (ácido acetilsalicílico) em camundongos.

Os extratos CX1, CX2 e CX3 apresentam em sua composição química os sesquiterpenos: humuleno e cariofileno (Tabela 4). Esses compostos, isolados da espécie *Cordia verbenácea*, apresentaram atividade anti-inflamatória através da inibição de Ciclooxigenase 2 (COX<sub>2</sub>) (FERNANDES, 2007). Assim, os dados obtidos no presente estudo sugerem que alguns desses compostos podem ter ação inibitória sobre o SC o que corroboraria a ação anti-inflamatória desses, relatada na literatura.

Por sua vez, o cariofileno tem ação inibitória sobre o crescimento de fungos e apresenta atividade antibacteriana (CANTRELL et al, 2005). Outro composto identificado nos extratos,  $\gamma$ -eudesmol, é um sesquiterpeno natural com bioatividades antiespasmódicas (CHIOU; LING; CHANG, 1997), antiepilética e antibacteriana (COSTA et al., 2008) e contra a doença de Alzheimer (TEBAA et al, 2011).

Outro estudo envolvendo o óleo essencial de *Copaifera reticulata*, rico em sesquiterpenos, (PLOWDEN, 2004) demonstrou atividade anti-inflamatória desse óleo utilizando como ensaio o edema induzido carragenina em camundongos (FERNANDES, 2007). Uma das justificativas para a atividade anti-inflamatória relatada pelo autor é a inibição do SC pelos constituintes desses óleos (FERNANDES, 2007).

Devido a maior inibição da VA do SC verificada pelo CX1 em relação aos demais extratos testados, realizou-se novas análises a fim de verificar se essa inibição era concentração dependente. Foi realizado um experimento com diferentes concentrações de CX1: 166,5  $\mu\text{g/ml}$ , 83,250  $\mu\text{g/ml}$ , 41,625  $\mu\text{g/ml}$ , 20,813  $\mu\text{g/ml}$ , 10,406  $\mu\text{g/ml}$ , 5,203  $\mu\text{g/ml}$  e 2,602  $\mu\text{g/ml}$  utilizando o mesmo método anteriormente descrito (FIGURA 14).



**FIGURA 14** - TAXA DE HEMÓLISE DA VA DO SC SOB A AÇÃO DO EXTRATO CX1 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.

FONTE: O autor (2016).

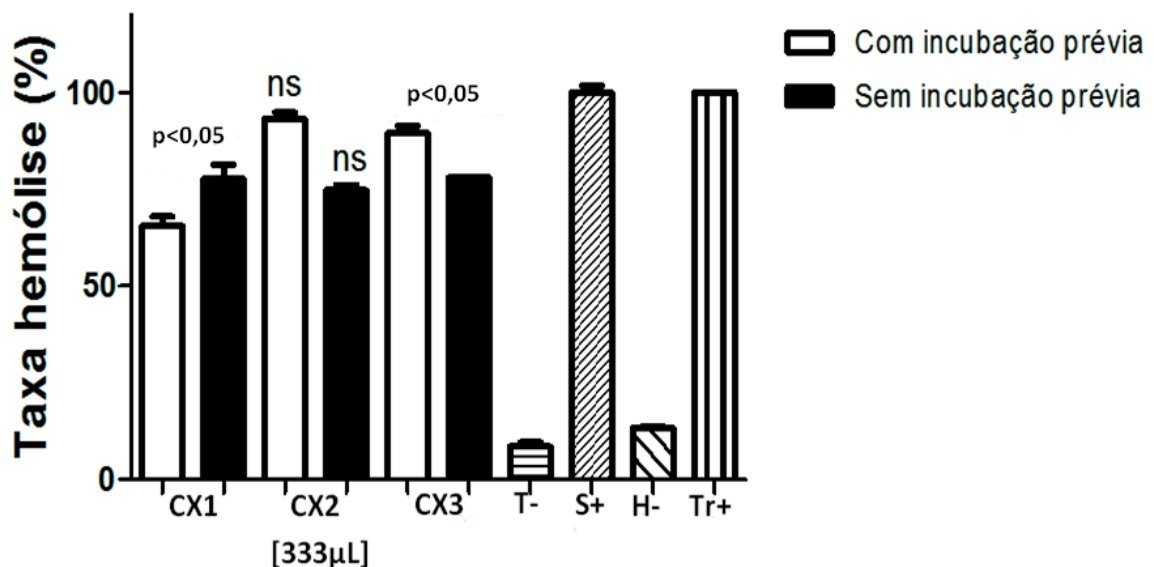
NOTA: Os controles utilizados foram T: Tampão controle negativo, S: Controle positivo, SHN, hemólise 100%, H: Heparina sódica, controle de inibição do SC; Z: Zimozan e Tr: Triton, controle de ativação e hemólise total. O número 1 representa o experimento sem incubação prévia. Todas as concentrações testadas apresentaram atividade inibitória significativa em relação ao controle 100% lise (S) ( $p < 0,05$ ). Cada valor é expresso como a média do ensaio em triplicata  $\pm$  o desvio padrão.

Os resultados demonstraram que apesar de todas as doses testadas apresentarem diferenças significativas de redução de hemólise em relação aos controles, não houve diferenças significativas entre as diferentes concentrações testadas (FIGURA 14). Esses dados indicam que a inibição produzida por CX1 em relação à VA do SC não é concentração-dependente no intervalo das doses testadas, sugerindo que a dose mínima de 2,602 µg/ml seja suficiente para promover inibição significativa da VA.

Através da análise dos resultados obtidos nas diferentes concentrações de CX1 frente à VA do SC, verificou-se a impossibilidade do cálculo da concentração do extrato necessária para inibir 50% da hemólise (IC50%), uma vez que não foi possível obter uma curva adequada para o cálculo fidedigno da IC50%.

#### 6.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS EXTRATOS CX1, CX2 e CX3 de *C. xanthocarpa* NA IMUNOMODULAÇÃO DA VIA CLÁSSICA DO SC

A concentração dos extratos CX1, CX2 e CX3 utilizada inicialmente para a avaliação do efeito sobre a VC do SC foi de 333µg/ml. Os resultados mostraram que dentre os três extratos testados, somente CX1 e CX3 apresentaram diminuição significativa da hemólise nos experimentos com e sem incubação prévia ( $p < 0,05$ ) (FIGURA 15), indicando que ambos os extratos CX1 e CX3 apresentam propriedades inibitórias do SC através da VC na concentração testada. Porém, CX2 não apresentou inibição significativa da hemólise em relação aos controles no experimento com incubação prévia, mostrando que, na concentração testada, esse extrato não atua na inibição da VC. Uma diferença estatisticamente significativa foi observada entre a inibição de hemólise verificada para CX1 em relação a CX3, demonstrando inibição mais eficiente da VC pelo CX1 (FIGURA 15).



**FIGURA 15** - TAXA DE HEMÓLISE DA VC DO SC SOB A AÇÃO DOS EXTRATOS DE *C. xanthocarpa*, 333µg/mL, A: CX1, B: CX2, C: CX3.

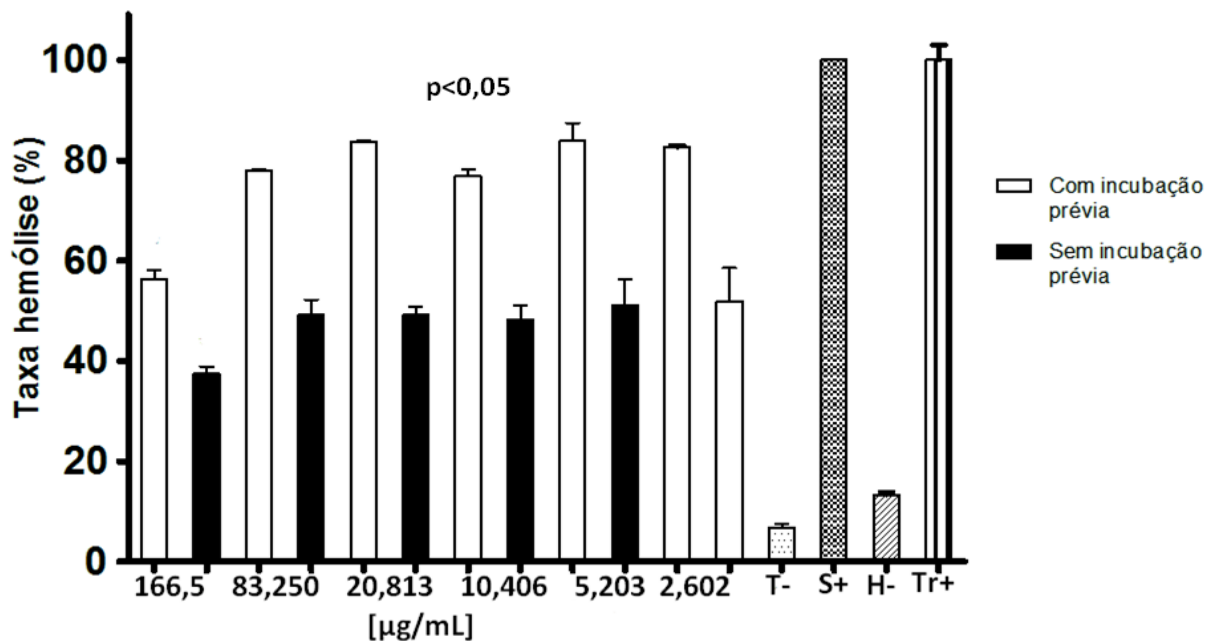
FONTE: O autor (2016).

NOTA: Os controles utilizados foram o T: Tampão e H: Heparina como controles da inibição da ativação do SC e S: SHN e o Tr: Triton, como controle positivo de ativação do SC e hemólise total, respectivamente. O número 1 representa o experimento sem incubação prévia. (\*\*\*)Significativo em relação ao controle S, ns=não significativo).

Uma das justificativas para a maior eficiência de inibição do SC por CX1 em relação aos outros dois extratos testados, tanto para VA como VC, é a composição química do mesmo. Pois CX1 apresenta diversos componentes que não estão presentes nos extratos CX2 e no CX3, tais como os sesquiterpenos Alfa-gurjuneno, Aromadendreno, Allo-aromadendreno, Alfa-bisaboleno e o Guaiol (TABELA 4). Alguns componentes presentes em CX1, tais como o Aromadendreno e o Alo-aromadendreno também estão presentes na espécie *Cordia verbenaceae*, conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias, com comprovada inibição de COX 2 e fonte do fitoterápico Acheflan® (GILBERT; FAVORETO, 2012). Outro exemplo é o Alfa-gurjuneno, sesquiterpeno presente em CX1 que é um dos componentes majoritários do óleo essencial de *Piper amalago* (KASSUYA et al, 2015), o qual tem comprovada atividade anti-inflamatória (BOONE; MOTA, 2011). Portanto, esses resultados mostram que à temperatura de 80°C e 150bar de pressão (condições de extração de CX1) ocorre a extração de compostos que são importantes para a ação inibitória do SC exercida por *C. xanthocarpa* relatada no presente estudo.

Devido a maior inibição da VC do SC verificada pelo CX1 em relação aos demais extratos testados, realizaram-se novas análises a fim de verificar se a inibição produzida por CX1 sobre a VC seria concentração-dependente. Foram realizados experimentos com as seguintes concentrações de CX1: 166,5 µg/ml, 83,250 µg/ml, 41,625 µg/ml, 20,813 µg/ml, 10,406 µg/ml, 5,203 µg/ml e 2,602 µg/ml, utilizando-se a mesma metodologia anteriormente descrita.

Os resultados mostraram diminuição estatisticamente significativa da hemólise nas concentrações de 333 µg/ml e 166,5 µg/ml em relação às demais concentrações testadas (FIGURA 16). Esses dados sugerem que a concentração de CX1 a ser utilizada é um fator importante para a inibição do SC através da VC, sugerindo que doses a partir de 166,5 µg/ml seriam mais eficientes para uso anti-complemento.



**FIGURA 16** - TAXA DE HEMÓLISE DA ATIVAÇÃO DA VC DO SC SOB A AÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO CX1 DE *C. xanthocarpa*.

FONTE: O autor (2016).

NOTA: Controles de inibição do experimento foram identificados como T: Tampão e H: Heparina. E os controles de ativação e hemólise total foram, respectivamente, S: SHN e o Tr: Triton. O número 1 representa o experimento sem incubação prévia. Houve diferença significativa entre todas as concentrações testadas em relação ao controle (S) e \*diferença entre as concentrações testadas (Valores considerados significativos quando  $p < 0,05$ ).

Os resultados aqui demonstrados sugerem que os extratos testados, especialmente CX1, podem ser promissores no desenvolvimento de novos tratamentos para doenças inflamatórias onde o SC é ativado, tais como as doenças autoimunes. A presença dos sesquiterpenos no extrato CX1 pode justificar a ação inibitória sobre o SC.

O fitoterápico anti-inflamatório *Acheflan*® indicado no tratamento de processos inflamatórios locais, foi padronizado em 2,3-2,9% de humuleno (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). Este medicamento apesar de ter suas propriedades anti-inflamatórias reconhecidas e amplamente divulgadas, não tem seu mecanismo de ação esclarecido em bula. Considerando-se que o humuleno está presente nos três extratos testados e que os três mostraram ser capazes de inibir a VA do SC, é possível que o mecanismo anti-inflamatório do *acheflan*® seja também associado a inibição do SC. Porém, mais estudos a esse respeito devem ser realizados a fim de esclarecer essa questão.

Conforme relatado por CZAIKOSKI *et al* (2015) CX1, CX2 e CX3 apresentam fenólicos em sua composição. Dentro do grupo de compostos fenólicos, estão os

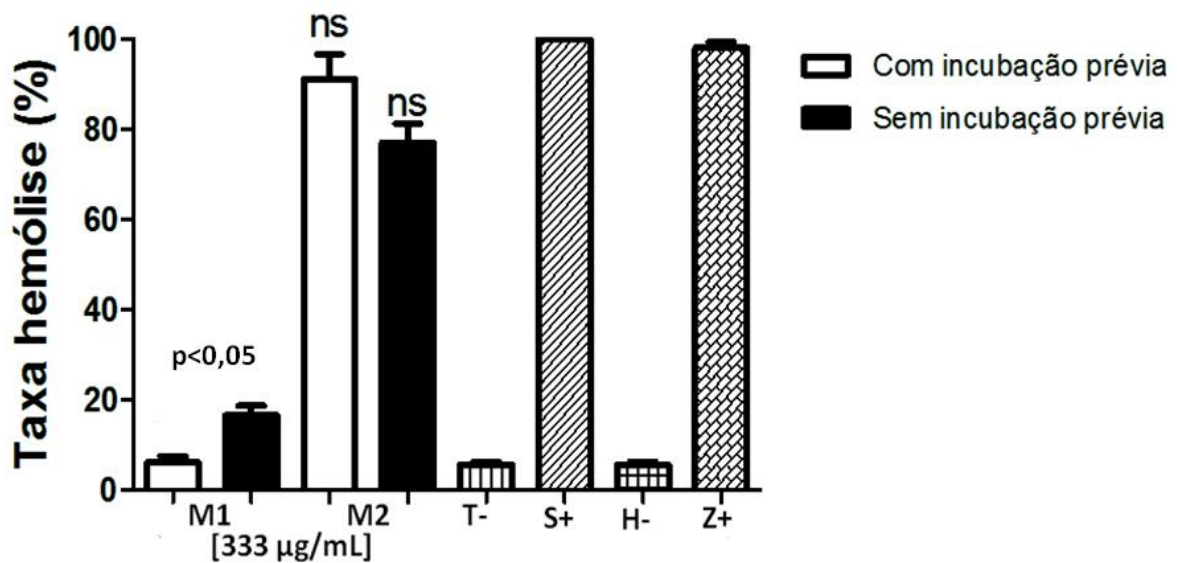
flavonoides que apresentam atividades anti-inflamatórias e antioxidantes já comprovadas cientificamente (BEHLING et al, 2004). Os flavonoides afzelina, quercetina e kaempferol, isolados de folhas de *Litsea japonica* (Thunb.) Jussieu (Lauraceae) foram testados de forma semelhante para verificação de sua atividade sobre a VC do SC e apresentaram atividade inibitória nas concentrações de 258, 440, e 730  $\mu\text{m}$ , respectivamente (LEE et al, 2005). Outro estudo também demonstrou que compostos fenólicos isolados do extrato etanólico de *Viola tianshanica* mostraram atividade de modulação do SC, inibindo a VC (QIN et al., 2015). O ácido rosmarínico, outro composto fenólico natural isolado da espécie *Rosmarinus officinalis* ou da *Melissa officinalis*, também demonstrou atividade inibitória significativa da VC do SC *in vitro* (ENGLBERGER et al, 1988).

Diferentes estudos demonstraram que o flavonoide quercetina é um constituinte do fruto da “Guabirova” (SCHMEDA-HIRSCHMANN, 1995). FRIESENECKER, TSAI e INTAGLIETTA (1995) relataram que a quercetina é possível inibidor da ativação do SC, pois promove a diminuição da adesão de células inflamatórias ao endotélio e da resposta inflamatória. Esses dados corroboram com os resultados da ação inibitória dos extratos supercríticos do fruto de *C. xanthocarpa* sobre a VA e VC do SC e sugerem que a quercetina está relacionada com essa atividade.

Não foi possível avaliar a IC50% dos resultados mostrados na FIGURA 16, uma vez que não se obteve uma curva adequada para o cálculo fidedigno da concentração.

## 6.5 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS EXTRATOS M1 E M2 de *M. paradisiaca* L. NA IMUNOMODULAÇÃO DA VIA ALTERNATIVA DO SC

Os extratos M1 E M2 foram inicialmente utilizados na concentração de 333µg/ml, os resultados mostraram que o extrato M1 apresentou diminuição significativa da hemólise da VA nos experimentos com e sem incubação prévia ( $p < 0,05$ ), porém o M2 não apresentou redução da hemólise na concentração testada. A interpretação desses dados (FIGURA 17) mostra que M1 apresentou propriedades de inibição do SC através da VA.

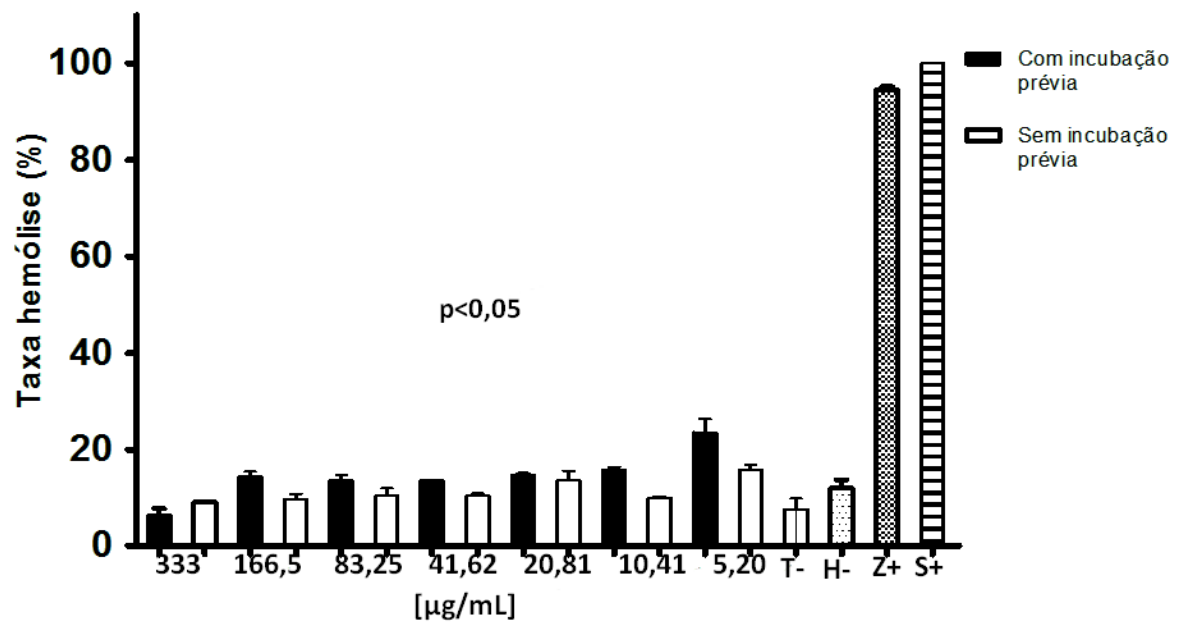


**FIGURA 17** – TAXA DE HEMÓLISE DA ATIVAÇÃO DA VA DO SC SOB A AÇÃO DOS EXTRATOS M1 E M2 NA CONCENTRAÇÃO: 333 µg/ML.

FONTE: O autor (2015).

NOTA: O T: Controle 6, tampão, e a H: Heparina foram utilizados como controles da inibição da ativação da VA do SC, e o S: SHN e o Z: Zimosan como controles positivos da ativação. (ns: não significativo, \*\*\* significativo em relação ao S. Os dados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ ).

Devido à inibição da VA observada para o extrato M1, foram realizados experimentos adicionais com diferentes concentrações de M1: 333 µg/ml, 166,5 µg/ml, 83,25 µg/ml, 41,62 µg/ml, 20,81 µg/ml, 10,4 µg/ml e 5,2 µg/ml para verificar a interferência da concentração do M1 na inibição da VA (FIGURA 18).



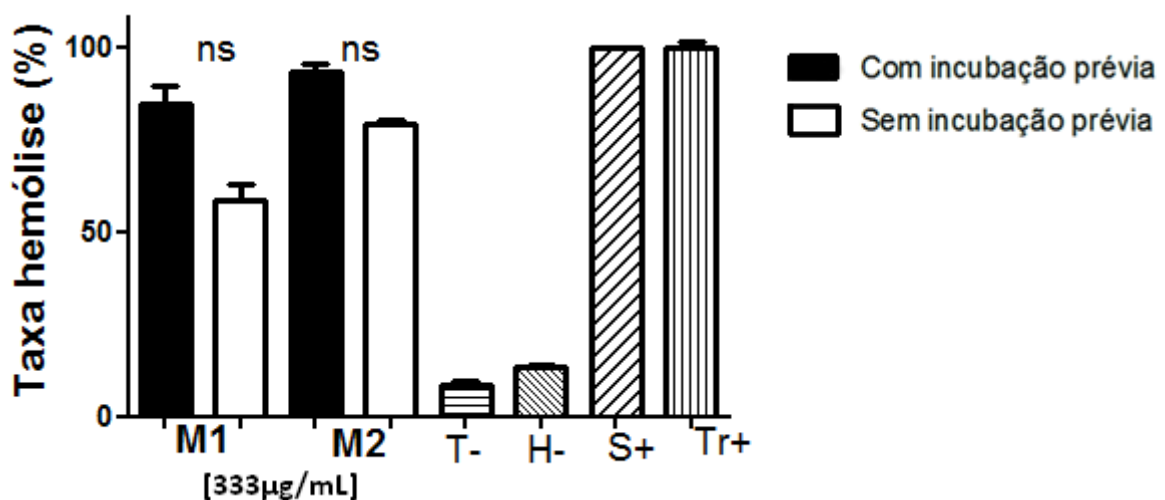
**FIGURA 18 – TAXA DE HEMÓLISE DA ATIVAÇÃO DA VA DO SC SOB A AÇÃO DO EXTRATO M1 NAS CONCENTRAÇÕES:** A: 333 µg/ml, B: 166,5 µg/ml, C: 83,250 µg/ml, D: 41,625 µg/ml, E; 20,813 µg/ml, F: 10,406 µg/ml, G: 5,203 µg/ml  
 FONTE: O autor (2016).

NOTA: Os controles utilizados foram identificados como T: Tampão e H: Heparina, para os controles positivos de inibição da ativação da VA, e S: SHN e Z: Zimozan, controle positivo de ativação da VA. O número 1 representa o experimento sem incubação prévia. O experimento foi realizado em triplicata e os dados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

Quando se comparou a inibição da hemólise entre as diferentes concentrações testadas de M1 observou-se diferença significativa entre a concentração de 333 µg/ml em relação às demais concentrações testadas. Portanto, a inibição da VA do SC causada pelo M1 depende da concentração, levando-se em consideração o intervalo analisado (Figura 18). Não foi possível avaliar a IC50% desses resultados, por não se obter uma curva adequada para o cálculo.

## 6.6 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS EXTRATOS M1 E M2 de *M. paradisiaca* L. NA IMUNOMODULAÇÃO DA VIA CLÁSSICA DO SC

A atividade dos extratos M1 E M2 sobre a VC do SC foi avaliada na concentração de 333µg/ml. O extrato M, assim como o M2, não apresentou diminuição significativa da hemólise nos experimentos com e sem incubação prévia ( $p < 0,05$ ) na concentração testada. A interpretação desses dados mostra que M1 e M2 não apresentaram propriedades inibitórias do SC através da VC (FIGURA 19).



**FIGURA 19** - TAXA DE HEMÓLISE DA ATIVAÇÃO DA VC DO SC SOB A AÇÃO DOS EXTRATOS M1 E M2 NA CONCENTRAÇÃO: 333 µg/mL.

FONTE: O autor (2016).

NOTA: Os controles utilizados foram identificados como T: Tampão e H: Heparina, controle negativo de ativação, e S: SHN (Controle 1) e Tr: Triton, como controle positivo de ativação e hemólise total, respectivamente. (ns: não significativo). O experimento foi realizado em triplicata e os dados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

A interpretação desses dados (FIGURA 19) mostra que M1 e M2 não promoveram inibição significativa da hemólise através do ensaio para a VC na concentração testada. Assim, apesar de M1 apresentar ação significativa sobre a VA o mesmo não se verifica na VC. Ressalta-se que a VA é responsável por cerca de 80%-90% da ativação do complemento, sua inibição consequentemente tem efeito positivo sobre processos inflamatórios (HARBOE; MOLLNES, 2008).

Estudos prévios demonstraram que extratos de inflorescências de *M. paradisiaca* L. possuem atividade anti-inflamatória. BOVO (2013) demonstrou diminuição significativa das concentrações de interleucinas pró-inflamatórias quando camundongos asmáticos foram tratados com extratos aquosos e hidroalcoólicos de

inflorescências dessa espécie. Porém, o verdadeiro mecanismo de ação anti-inflamatório desse estudo ainda não foi descrito.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a inibição do SC pela VA seja um dos prováveis mecanismos de ação anti-inflamatória que justificam os resultados encontrados por BOVO (2013).

Os componentes químicos de extratos obtidos em diferentes condições de temperatura e pressão foram determinados no estudo publicado por CORREA (2016) e encontram-se descritos na TABELA 5.

**TABELA 5** - COMPOSTOS VERIFICADOS NA FRAÇÃO VOLÁTIL DOS EXTRATOS M1/M2 DE *M. paradisiaca* L.

	<b>M1</b>	<b>M2</b>
Lupenona	24,02%	11.37%
Dimetiltriacontano	14%	5,66%
Stigmasterol	2,71%	5%
$\gamma$ -sitosterol	2,49%	1,74%
Stigmast-5-en-3- $\beta$ -ol	2,14%	0,56%
Metilhidroxinitropenil acetate	-	10%
Pentacosane	-	9,81%
3,6,9-Nonacosatrieno	-	8,55%
10-Hentriaconteno	-	8,46%

NOTA: A determinação foi realizada por Cromatografia gasosa – Espectrometria de massas (CG-MS), os cálculos feitos por normalização e os resultados foram expressos em porcentagem.  
FONTE: Adaptado pelo autor de CORREA, 2016.

Analisando-se os componentes químicos da encontrado em M1 e M2 (TABELA 5), pode-se verificar que a concentração do triterpeno Lupenona no extrato M1 é significativamente maior que a encontrada em M2. Portanto, é provável que a atividade inibitória de M1 sobre VA do SC seja em parte, devido à concentração aumentada de Lupenona em relação ao M2.

Segundo SINGH ET AL.(1997) existe um grande número de triterpenos com atividade anti-inflamatória fazendo parte da constituição de drogas não esteroidais.

Outros estudos de extratos obtidos de diferentes plantas que contém Lupenona também demonstraram atividade anti-inflamatória, como é o caso do extrato de *Vernonia scorpioides*, cuja composição é rica em Lupenona (DREUX et al, 2004), e teve sua propriedade anti-inflamatória demonstrada *in vivo* (MACHADO et

al. 2013). A Lupenona possui outras atividades biológicas importantes tais como, a inibição dos vírus herpes simples (HSV-1 e HSV-2) e da febre suína africana (ASFV) (MADUREIRA *et al*, 2003). Esse composto também apresenta atividade revelou ter ação de inibição sobre a produção de anticorpos em especial os das classes IgM e IgG (MENDES, 2001) que estão intimamente relacionados com a VC do SC.

A Lupenona, assim como o acetil lupeol, é um dos derivados do triterpeno acetato de lupeol. Estes foram isolados nas raízes, caules e folhas da espécie *V. scorpioides* por FREIRE (2000) que verificou atividade de diminuição do número de células secretoras de anticorpos IgM em murinos quando tratados com extrato desta planta.

Outros autores também relatam extratos de plantas ou produtos isolados de plantas como potentes moduladores do SC. Compostos isolados das raízes de *Euphorbia kansui* como o 3-O-(2'E,4'Z-decadienoyl)-ingenol; 3-O-(2,3-dimethylbutyryl)-13-O-n-dodecanoyl-13hydroxy-ingenol e  $\beta$ -sitosterol apresentaram atividade inibitória significativa da VC (LI *et al*, 2011).

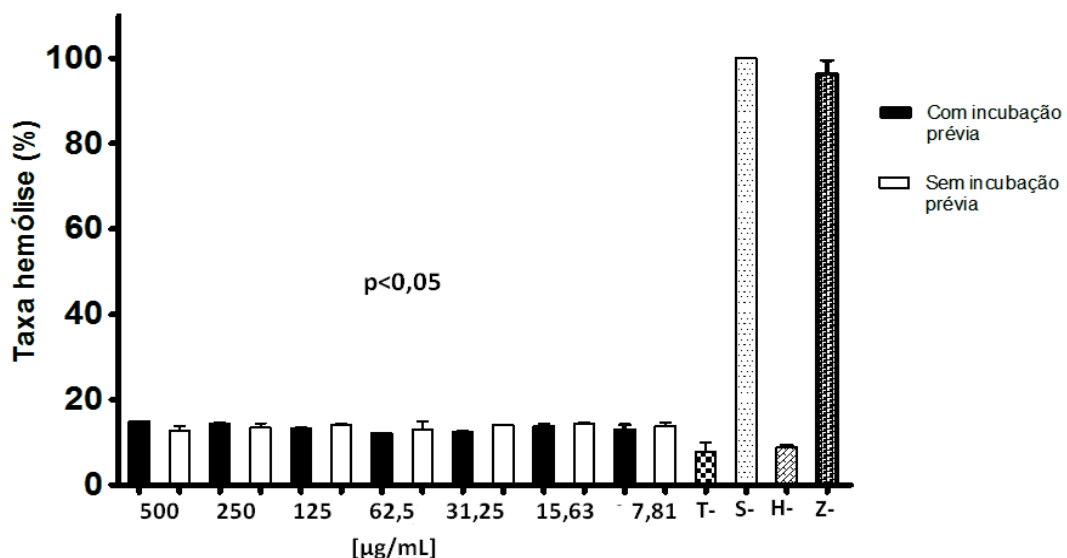
Existem no mercado farmacêutico medicamentos que são inibidores de SC. O Eculizumab, anticorpo monoclonal, é o único inibidor específico do complemento com uso aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration – USA). É largamente utilizado para o tratamento da hemoglobunúria paroxística noturna (HPN) que é caracterizada clinicamente pela lise de glóbulos vermelhos e liberação de hemoglobina na urina (BRODSKY *et al*, 2008; HALLSTENSEN *et al*, 2015). O tratamento com Eculizumab tem se mostrado relevante na melhoria da qualidade de vida dos pacientes. Ressalta-se que este medicamento é de alto custo o que acentua a necessidade de pesquisas e investimentos em novas substâncias que sejam possíveis inibidoras do SC.

Portanto, os resultados apresentados neste estudo somados com os relatados por BOVO (2013) apresentam o extrato de *M. paradisiaca* L como promissor para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas e autoimunes especialmente pela inibição do SC. Ressalta-se ainda, que as inflorescências de *M. paradisiaca* L são descartadas pelos produtores de banana, sendo consideradas como detritos. Assim, a produção de um fitoterápico à base de inflorescência dessa espécie, além da eficácia anti-inflamatória aqui demonstrada, utilizaria uma matéria prima que é descartada e que teria fácil acesso/produção, já que o Brasil é o terceiro

maior produtor mundial de banana e o Estado do Paraná, o oitavo maior produtor da fruta no Brasil (IBGE, 2013).

### 6.7 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA MISTURA RACÊMICA DE EUFOL E LANOLSTEROL (E1) NA IMUNOMODULAÇÃO DA VIA CLÁSSICA E ALTERNATIVA DO SC

A atividade da mistura E1 sobre a VA do SC foi verificada nas concentrações de 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,25 µg/ml, 15,63 µg/ml, 7,81 µg/ml. Os resultados mostraram diminuição estatisticamente significativa da hemólise pela VA nos experimentos com e sem prévia incubação (FIGURA 20). A interpretação desses dados mostra que E1 é capaz de inibir o SC através da VA em todas as concentrações testadas. Quando se comparou a inibição de hemólise entre as diferentes concentrações testadas, os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre elas. Esses resultados sugerem que a inibição da VA do SC produzida pelo Eufol/Lanosterol não é dependente da concentração, levando-se em consideração o intervalo de concentração 500 a 7,81 µg/ml.

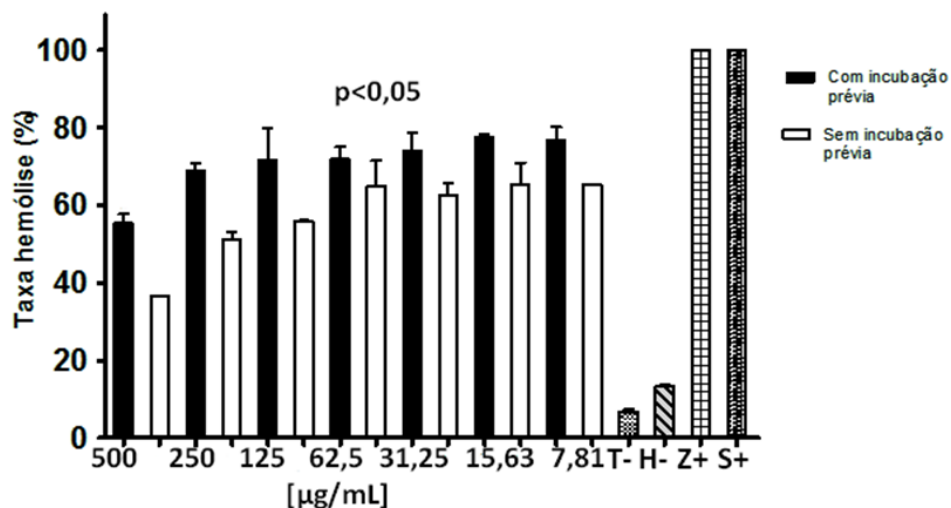


**FIGURA 20** – TAXA DE HEMÓLISE DA ATIVAÇÃO DA VA DO SC SOB A AÇÃO DA MISTURA E1 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.

FONTE: O autor (2015).

NOTA: Os controles utilizados foram T: Tampão e H: Heparina, controle negativos da ativação, S: SHN e Z: Zimosan, controles positivos da ativação da VC do SC. O número 1 representa o experimento sem incubação prévia. Todas as concentrações testadas apresentaram redução significativa em relação aos controles de hemólise 100% (S e Z). Nota: O experimento foi realizado em triplicata e os dados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Todas as concentrações testadas se mostraram significativas em relação ao controle “S” e “Z”. Porém, não houve diferenças significativas entre as diferentes concentrações testadas.

A mistura E1 também teve sua ação avaliada sobre a VC do SC nas concentrações de 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,25 µg/ml, 15,63 µg/ml e 7,81 µg/ml. Os resultados mostraram diminuição significativa da hemólise tanto nos experimentos com incubação prévia como sem incubação. A interpretação desses dados indica que E1 é capaz de inibir o SC através da VC nas concentrações testadas (FIGURA 21).



**FIGURA 21** - TAXA DE HEMÓLISE DA ATIVAÇÃO DA VC DO SC SOB A AÇÃO DO E1 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.

FONTE: O autor (2015).

NOTA: Os controles utilizados foram T: Tampão e H: Heparina, controle negativos da ativação, S: SHN e Tr: Triton, controle positivo da ativação da VC do SC e hemólise total. O número 1 representa o experimento sem incubação prévia. Todas as concentrações testadas apresentaram redução significativa em relação aos controles de hemólise 100% (S, Tr). \*concentração significativa em relação às demais testadas. O experimento foi realizado em triplicata e os dados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

Quando se comparou a inibição da hemólise entre as diferentes concentrações, os resultados mostraram que houve diferença significativa entre a concentração de 500 µg/ml em relação às demais testadas (FIGURA 21). Esses dados sugerem que a concentração de 500 µg/ml foi mais efetiva na inibição do SC pela VC quando comparada às demais e ainda, que essa inibição produzida pelo Eufol/Lanosterol depende da concentração, levando-se em consideração o intervalo de concentração 500 a 250 µg/ml.

A atividade tópica anti-inflamatória e anti-edema do triterpeno tetracíclico Eufol foi comprovada cientificamente (PASSOS et al, 2013). O mecanismo anti-inflamatório proposto foi a diminuição do influxo de leucócitos e regulação da COX<sub>2</sub> em modelo de inflamação de pele induzida pelo acetato de tetradecainoilforbol (TPA)

em camundongos. Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, uma vez que a inibição de complemento resulta em inibição da atividade inflamatória. Eufol/Lanosterol (1–10 mg/kg) mostrou inibição da infiltração de células TH<sub>17</sub> específicas para peptídeos da bainha de mielina no sistema nervoso central em modelo de esclerose múltipla murino (DUTRA et al., 2012). Evidências recentes em modelo murino de lúpus eritematoso sistêmico demonstraram que a inibição da VA foi capaz de melhorar o quadro de nefrite, característico desta doença autoimune (GROSSMAN, 2015).

Em doenças autoimunes, é conhecida a relação dos produtos de ativação do complemento com o aumento da atividade de neutrófilos, agravando o quadro inflamatório característico (KOTNIK, 2011). Em pesquisa envolvendo 35 pacientes com psoríase ou dermatite atópica, altos níveis de C3a no sangue de indivíduos afetados por ambas doenças, sugeriram contínua ativação do SC levando a geração de mediadores inflamatórios (KAPP; WOKALEK; SCHOPF, 1985). Os queratinócitos, afetados na psoríase, são produtores de diversos componentes do complemento, tais como C7 e C9, sendo também, fonte de citocinas importantes na regulação da cascata do complemento (TIMAR et al, 2007a; TIMAR et al, 2007b). Utilizando a imunofluorescência direta CUNHA e BARRAVIERA (2009) encontram depósitos de IgG e complemento na zona da membrana basal dos queratinócitos em pacientes com pênfigo foliáceo endêmico ativo, com IgG em torno de 90 a 95% dos casos e C3 em 100% deles. Indicando forte ação do SC na manifestação inflamatória desta doença.

O efeito observado, considerando especialmente a forte ação sobre a VA, que representa cerca de 80-90% da ativação total do CS (HARBOE; MOLLNES, 2008), indica que as substâncias aqui avaliadas têm um alto potencial anti-inflamatório.

Considerando-se os resultados apresentados neste estudo, somados com os relatados por DUTRA et al (2012), a mistura racêmica de Eufol/Lanosterol mostra-se como tratamento promissor para doenças autoimunes pela inibição do SC.

## 7. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. O extrato de *C. xanthocarpa* obtido a 150bar e 80°C (CX1) apresentou importante atividade inibitória sobre a VC e VA do SC, já os demais extratos obtidos desta espécie demonstram atividades de inibição menores quando comparados a CX1. Os dados sugerem que a concentração de CX1 a ser utilizada é um fator importante para a inibição do SC através da VC, sugerindo que concentrações a partir de 166,5 µg/ml sejam mais eficientes na inibição da VC do-complemento. Já para a VA não houve diferenças significativas entre as diferentes concentrações testadas, o que indica que a concentração mínima avaliada 2,602 µg/ml é suficiente para promover inibição significativa da VA.
2. O extrato de *M. paradisiaca* L. obtido a 30bar e 35°C (M1) apresentou inibição significativa apenas da VA do complemento. Não observou-se diferença significativa entre as concentrações testadas para VA. Portanto, a inibição da VA causada pelo M1 se mostra independente da concentração, levando-se em consideração o intervalo analisado.
3. A mistura racêmica de Eufol/Lanosterol reduziu significativamente a ativação promovida por ambas as vias, não houve diferença significativa entre as concentrações testadas para a VA, demonstrando que mesmo nas menores concentrações a inibição foi importante, entretanto para a VC a concentração de 500 µg/ml se mostrou ter uma ação inibitória significante quando comparada às demais testadas.
4. Os dados aqui obtidos sugerem que parâmetros diferentes de temperatura e pressão na operação de extração influenciam a ação dos extratos sobre o SC, provavelmente através da obtenção de diferentes composições. Visto que no extrato M1 houve extração na fração volátil de maior quantidade de Lupenona, substância que pode estar envolvida na atividade observada. Assim como no extrato CX1 observou-se a presença dos Alfa-bisaboleno,

Alfa-gurjuneno, Allo-aromadendreno, Aromadendreno e Guaiol, substâncias que não foram verificadas nos demais extratos do fruto de *C. xanthocarpa*.

5. As frações teste CX1, M1 e Eufol/Lanosterol apresentam potencial uso no tratamento de doenças que cursam com a ativação do SC, tais como as inflamatórias crônicas e doenças autoimunes.
6. Considerando que a ativação do SC induz a resposta inflamatória essencialmente através da liberação das anafilotoxinas C5a, C4a e C3a (BELTRAME et al, 2015) é possível que os resultados de inibição verificados neste estudo estejam relacionados a inibição das mesmas, essa inibição pode ocorrer tanto no início da cascata como a partir de fragmentos da clivagem de C3 ou C5, diminuindo a hemólise verificada. Portanto, são necessários novos experimentos, utilizando diferentes técnicas, por exemplo, a dosagem de C3, que especifiquem a região da cascata inibida que bloqueia a ação de lise celular promovida pelo MAC.

## REFERÊNCIAS

- ALBAN, S.; CLASSEN, B.; BRUNNER, G.; et al. Differentiation between the complement modulating effects of an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea* and heparin. **Planta Medica**. v. 68, n. 12, p.1118-24, 2002.
- AGARWAL, P.K.; SINGH, A.; GAURAV, K.; et al. Evaluation of wound healing activity of extracts of plantain banana (*Musa sapientum* var. *paradisiaca*) in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 47, n.1, p. 32-40, 2009.
- ALICE, C.B.; MENTZ, L.; SIQUEIRA, N.C.S.; et al **Plantas Medicinais de Uso Popular. Atlas Farmacognóstico**. Canoas: Editora da Ulbra, 1995. 205p.
- ALMEIDA, J. P.; KOWALSKI, L.P. Pilocarpina no tratamento de xerostomia em pacientes submetidos à iodoterapia: estudo piloto. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v.76, n. 5, p. 659-662., 2010.
- AMORIM, C. C. Etnobotânica da “Medicina Campeira” na Região da Coxilha Rica, SC Ethnobotany of Land Medicine in the Coxilha Rica Region, SC. **Revista Brasileira De Agroecologia**, v. 4 N. 2, p. 1596 – 99, nov, 2009.
- ARAUJO, J. L.; LEMOS, J. R. Estudo etnobotânico sobre plantas medicinais na comunidade de Curral Velho, Luís Correia, Piauí, Brasil. **Biotemas**, v.28, n.2, p.125-136, 2015.
- ASCHWANDEN, C. Herbs for health, but how safe are they? **Bulletin WHO.**, Geneva, v.79, n.7, p.691-692, 2001.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Bulário eletrônico – FAULDVINCRI**. Brasil, 2013. Disponível em: [www.anvisa.org.br](http://www.anvisa.org.br). Acesso em: 22/10/2014.
- BADKE, M. R.; BUDÓ, M. L. D.; SILVA, F. M.; RESSEL, L. B. Plantas medicinales: el saber sustentado en la practica del cotidiano popular. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, v.15, n. 1, p. 132-139, 2011.
- BAGAVAN, A.; RAHUMAN, A.A.; KAUSHIK, N.K.; et al. *In vitro* antimalarial activity of medicinal plant extracts against *Plasmodium falciparum*. **Parasitology Research**, v. 108, p. 15-22, 2011.
- BANI, S.; KAUL, A.; KHAN, B. et al Anti-arthritic activity of a biopolymeric fraction from *Euphorbia tirucalli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 92-98, 2007.

BARBOSA, C. V. **Avaliação do potencial antineoplásico de plantas medicinais utilizadas como coadjuvantes no tratamento do câncer pelos pacientes do CACON/UFAL.** 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde; Alagoas, 2009.

BAZARGANI, F.; Albrektsson, A.; Yahyapour, N. et al. Low molecular weight heparin improves peritoneal ultrafiltration and blocks complement and coagulation. **Peritoneal Dialysis International**, v.25, n.4, p. 394-404, 2005.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. et al. Flavonóide Quercetina: Aspectos gerais e ações Biológicas. **Alimentos e Nutrição**. v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BETANCUR-GALVIS, L.A.; MORALES, G.E.; FORERO, J.E. et al Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the Euphorbia genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 4, p. 541-6, 2002.

BHASKAR, J.J.; SHOBHA, M.S.; SAMBAIAH, K. et al Beneficial effects of banana (*Musa sp. var. elakki bale*) flower and pseudostem on hyperglycemia and advanced glycation end-products (AGEs) in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**. v. 67, n 3, p. 415-425, 2011.

BELTRAME, M.H.; BOLDTB, A.B.W.; CATARINO, S.J. et al MBL-associated serine proteases (MASPs) and infectious diseases. **Molecular Immunology**. v. 67, n. 1, p. 85–100, 2015.

BELTRAME, M.H.; CATARINO S.J.; GOELDNER, I. et al. The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. **Frontiers in Pediatrics**, v. 2, 148, 2015.

BIAVATTI, M.W., Farias, C.; Curtius, F. et al, Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. aqueous extract: Weight control and biochemical parameters. **Journal Ethnopharmacology**, v. 93, n. 2-3, p. 385-9, 2004.

BISWAS, C.; BASAK, D.; CHAKROVERTY, R. et al. Effect of metanol extract of *Musa paradisiacal* (Linn) stem juice on chemically induced acute inflammation. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 4, Suppl 5, p. 148, 2012.

BLYTHE, L.L.; CRAIG, A.M.; CHRISTENSEN, J.M. et al Pharmacokinetic disposition of dimethyl sulfoxide administered intravenously to horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, p.1739-1743, 1986.

BOCHNER, R.; SOUZA, V. M. F. A. Panorama das intoxicações e envenenamento registrados no Brasil pelo Sistema Nacional de Intoxicações Tóxico-Farmacológicas. **Revista Racine**. v. 5, n.106, p. 44-58, 2008.

BOONE, V.; MOTA, J. S. Estudo químico do óleo essencial das raízes de *Piper amalago*. **Anais do Enic**, n. 3, 2011.

BOVO, F. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). **Investigação Das Propriedades Anti-inflamatória e Antioxidante de Extratos de Inflorescências de *Musa. Paradisiaca L.* em Modelos Experimentais *in vivo* e *in vitro*** – Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2013.

BRODSKY, R.A.; YOUNG, N.S.; ANTONIOLI, E. et al Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood.**, v. 111, n. 4, p. 1840-7, 2008.

CANTRELL, C.L.; KLUN, J.A.; BRYSON, C.T et al. Isolation and identification of mosquito bite deterrent terpenoids from leaves of American (*Callicarpa americana*) and Japanese (*Callicarpa japonica*) beautyberry, **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.5948–5953, 2005.

CARROLL, M.V.; SIM, R.B. Complement in health and disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n.12, p. 965-75, 2011.

CHIOU, L.; LING, J.; CHANG, C. Chinese herb constituent -eudesmol alleviated the electroshock seizures in mice and electrographic seizures in rat hippocampal slices, **Neuroscience Letters**, v. 231, p.171–174, 1997.

COELHO R.R.P.; MATA, M.E.R.M.C.; BRAGA, M.E.D. Alterações dos componentes nutricionais do pseudocaule da bananeira quando processado visando sua transformação em palmito. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.3, p.21-30, 2001.

CORREA, M. S. **Extração de inflorescência da bananeira (*Musa paradisiaca L.*) utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico e propano comprimido**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, 236p, Curitiba, 2016.

COSTA, E.V.; TEIXEIRA, S.D.; MARQUES, F.A. et al Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon Guatterio species, **Phytochemistry**, v. 69, p.1895–1899, 2008.

COSTA, L.L.G; David, V.CD; Pinto, R.M.C. et al Anti-ulcer activity of *Synadenium grantii* latex. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 22, n. 5, p. 1070-1078, 2012.

COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonoides: Potenciais Agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório **Revista Virtual de Química**, v.1, n.3, p.241-256, 2009.

CRUVINEL, W.M; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J.A.P. et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia** v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

CUNHA, P. R.; BARRAVIERA, S. R. C. S. Dermatoses bolhosas auto-imunes. **Anais da Revista Brasileira de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 2, p. 111-124, 2009.

CZAIKOSKI, K.; MESOMO, M.C.; KRUGER, R.L. et al Extraction of *Campomanesia xanthocarpa* fruit using supercritical CO<sub>2</sub> and bioactivity assessments. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 98, p. 79–85, 2015.

DEVIENNE, K.F.; RADDI, G.; POZETTI, G.L. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 3, p. 11-14, 2004.

DICKEL, M.L; RATES, S.M; RITTER, M.R. Plantas populary used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**., v.109, p.60-71, 2007.

D'ORAZIO, N. GAMMONE, M.A., GEMELLO, E. et al. Marine Bioactives: Pharmacological Properties and Potential Applications against Inflammatory Diseases. **Marine Drugs** v. 10, n.4, p. 812-33, 2012.

DREUX, E. C. **Avaliação do efeito anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico de *Vernona scorpioides* (Lam) Persoons em inflamação aguda.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade do Vale do Paraíba, 85p, São José dos Campos, SP, 2005.

DUTRA, R.C.; CLAUDINO, R.F.; BENTO, A.F. et al. Preventive and therapeutic Eufol treatment attenuates experimental colitis in mice. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 11, p. 27-122, 2011.

DUTRA, R.C.; SILVA, K.B.; BENTO, A.F. et al Eufol, a novel cannabinoid agonist, prevents inflammatory and neuropathic persistent pain in rodents. **Planta Medica**, v.77, n.12, p. 45-139, 2011.

DUTRA, R.C.; SOUZA, P.R. C.; BENTO, A.F.; MARCONA, R.; BICCAA, M. A.; PIANOWSKI, L. F.; CALIXTO, J. B. Eufol prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: Evidence for the underlying mechanisms. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 4, p.531–542, 2012.

DUTTA, P.K.; DAS, A.K.; BANERJI, N. A tetracyclic triterpenoid from *Musa paradisiaca*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 11, p. 2563-2564, 1983.

EDENS, R.E.; LINHARDT, R. J.; WEILER, J. M. Heparin is not just an anticoagulant anymore: Six and one half decades of studies on the ability of heparin to regulate complement activity. **Complem Profiles**, v.1, p.96-120, 1993.

ENGLBERGER, W.; HADDING, U.; ETSCHENBERG, E. et al Rosmarinic acid: a new inhibitor of complement c3-convertase with anti-inflammatory activity. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 10, n. 6, p. 729-737, 1988.

FAO (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). 2013. **Base de dados estatísticos FAOSTAT-Agriculture**. Roma. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acessado em: 10 de outubro de 2014.

FAO (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). Banana Market Review and Banana Statistics. Rome, 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 16 julho, 2015.

FERNANDES, E.S.; PASSOS, E.S.; MEDEIROS, R. et al Antiinflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*, **European Journal of Pharmacology**, v. 569, p; 228–236, 2007.

FERREIRA, R.J.; CASTILHO, C.J. M. Agricultura urbana: discutindo algumas das suas engrenagens para debater o tema sob a ótica da análise espacial. **Revista da Geografia**, v.24, n.2, p.6-23, 2007.

FINGOLO, C.E.; MOURA, M.R.L.; KAPLAN, M.A.C. Farinha Nutritiva, Processo de Produção da Farinha Nutritiva e Seus Usos. Brazilian Patent PI0905055-8A2, 2011.

FINGOLO, C.E.; MOURA, M.R.L.; KAPLAN, M.A.C. The natural impact of banana inflorescences (*Musa acuminata*) on human nutrition. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 4, p. 891-898, 2012.

FREIRE, M. F. I. **Obtenção, Qualificação e Atividade Biológica de Acetato de Lupeol oriundo de *Vernonia scorpioides* (Lam) Pers silvestre ou cultivada em diferentes doses de Nitrogênio e fósforo**. 2000. 131f. Tese (Doutorado em Ciências do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.2000.

FRIESENECKER, B.; TSAI, A. G.; INTAGLIETTA, M. Cellular basis of inflammation, edema and the activity of Daflon 500 mg. **International Journal of Microcirculation**, v. 15, p. 17-21, 1995.

GOGOSZ, A. M.; Cosmo, N.L.; Bona, C. et al. Morfoanatomia da plântula de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). **Acta Botanica. Brasilica**, v. 24, n. 3, p. 613-623, 2010.

GOMES, C. M. F.; LIMA, G. L. Elementos básicos da auto-imunidade em reumatologia. **Revista Temas de Reumatologia Clínica**, São Paulo, v. 9, n. 4, p. 123-127, Set., 2008.

GILBERT, B.; FAVORETO, R. Monografia: *Cordia verbenacea* DC Boraginaceae. **Revista Fitos Eletrônica**, v.7, n.1, p.17-25, 2012.

GROSSMAN, T. R. HETTRICK, L. A.; JOHNSON, R. B. et al Inhibition of the alternative complement pathway by antisense oligonucleotides targeting complement factor B improves lupus nephritis in mice. **Immunobiology**, Article in press, 8 p., 2015.

GUIMARÃES, B.M.R.; MENDES, L. M.; TONOLI, G.H.D. et al Chemical treatment of banana tree pseudostem particles aiming the production of particleboards. **Ciência e Agrotecnologia**. v.38, n. 1, p.43-4., 2014.

HALLSTENSEN, R.F.; BERGSETHB, G.; FOSSC, S. et al Eculizumab treatment during pregnancy does not affect the complement system activity of the newborn. **Immunobiology**, v. 220, n. 4, p.452–459, 2015.

HARBOE, M.; MOLLNES, T. E. The alternative complement pathway revisited. **Journal of Cellular and Molecular Medicine.**, v. 12, n. 4, p. 1074-1084, 2008.

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

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2013). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. 25(2), 1–88. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/>>. Acesso em 10 de dez. 2015.

IMAM, M.Z.; AKTER, S. *Musa paradisiaca* L. and *Musa sapientum* L.: A Phytochemical and Pharmacological Review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.1, n.5, p.14-20, 2011.

IBRAHIM, M. Y. Células mesangiais: protagonistas ou coadjuvantes da função Renal? **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.35, n.4, p.248-249, 2013.

ITURRY-YAMAMOTO, G.R.; PORTINHO, C.P. Sistema complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.47, n.1, p.41-51, 2001.

JACOB, S.W.; TORRE, J.C. Pharmacology of dimethyl sulfoxide in cardiac and CNS damage. **Pharmacological Reports** v.61, p.225-235, 2009.

JAWLA S.; KUMAR, Y.; KHAN, M.S.Y. Antimicrobial and antihyperglycemic activities of *Musa paradisiaca* flowers. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.2, n. 2, p. 914-918, 2012.

KAPP, A.; WOKALEK, H.; SCHOPF, E. Involvement of complement in psoriasis and atopic dermatitis ± measurement of C3a and C5a, C3, C4 and C1 inactivator. **Archives of Dermatological Research**, v.277, p.359-61, 1985.

KAPPELL, V.D.; CAZAROLLI, L.H. PEREIRA, D.F. et al Beneficial effects of banana leaves (*Musa x paradisiaca*) on glucose homeostasis: multiple sites of action. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.23, n.4, p. 706-715, 2013.

KASSUYA, C. A. L.; BARROS, A. L.; IWAMOTO, R. D. et al Análise anti-inflamatória do óleo essencial obtido de *Piper amalago* (Piperaceae). **Pecibes**, v. 1, n.1, p. 1-7, 2015.

KLAFKE, J. Z.; SILVA, M. A.; PANIGAS, T. F. et al., Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. **Journal of Ethnopharmacology**. v.127, p.299–305, 2010.

KLAFKE, J. Z.; Pereira, R.L.D.; Hirsch, G.E. Study of oxidative and inflammatory parameters in Ildr-ko mice treated with a hypercholesterolemic diet: Comparison between the use of *campomanesia xanthocarpa* and acetylsalicylic acid. **Phytomedicine**, v. 121, p. 11-18, 2015.

KOTNIK, V., Complement in skin diseases. **Acta Dermatovenerol APA**. v. 20, n.1, p.3-11, 2011.

KOUSER, L.; ABDUL-AZIZ, M.; NAYAK, A. et al Properdin and Factor H: Opposing Players on the Alternative Complement Pathway. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. 93, p. 1-12, 2013.

LAMEIRA, O.A.; PINTO, J.E.B.P. **Plantas medicinais: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 264 p., 2008.

LAPPEGARD, K.T., GARRED, P., JONASSON, L., ESPEVIK T, et al. A vital role for complement in heart disease. **Molecular Immunology**, v. 61, p.126–34, 2014.

LEE, S.Y.; MIN, B.S.; KIM, J.H. et al Flavonoids from the leaves of *Litsea japonica* and their anti-complement activity. **Phytotherapy Research**, v.19, p. 273–276, 2005.

LENZI, R. M. Análise química e avaliação da atividade Imunomoduladora de frações aquosas obtidas a partir de preparações comerciais de *Uncaria tomentosa* (willd.) D.C. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, 236p, Curitiba, 2011.

LEWIS, D.A.; FIELDS, W.N.; SHAW, G.P. A natural flavonoid present in unripe plantain banana pulp (*Musa sapientum* L. var. *paradisiaca*) protects the gastric mucosa from aspirin-induced erosions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 65, p. 283-288, 1999.

LIMA, E. P. R.; MAIA, M. S.; MATOS, W. R. Levantamento das plantas medicinais comercializadas na feira livre do município de Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil. **Saúde e Ambiente em Revista**., v.4, n.2, p.34-39, 2009.

LI, G.; KIM, J.; SHEN, G.; LEE, J.; et al Anticomplement Activity of Compounds Isolated from the Roots of *Euphorbia kansui*. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v.54, n.2, p.159-162, 2011.

LIN, M. W.; LIN, A.S.; WU, D. C et al. Eufol from *Euphorbia tirucalli* selectively inhibits human gastric cancer cell growth through the induction of ERK1/2-mediated apoptosis. **Food Chem Toxicol**. v.50, n.12, p.4333-9, 2012.

LINDENMAIER, D. S.; PUTZKE, J. Estudo etnobotânico em três comunidades mbya/guarani na região central do Rio Grande do Sul, Brasil, **Caderno de Pesquisa, Série Biologia**, v. 23, n. 3, p. 6-19, 2011.

LOGANAYAKI, N.; RAJENDRAKUMARAN, D.; MANIAN, S. Antioxidant capacity and phenolic content of different solvent extracts from banana (*Musa paradisiaca*) and mustai (*Rivea hypocrateriformis*). **Food Science Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 1251-1258, 2010.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil**. São Paulo, 256p, 1992.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo, Plantarum, 560p, 2002.

MA, Q; LI, D; NURIEVA, R, et al. Reduced GVHD in C3-deficient mice is associated with the decrease of donor Th1/Th17 differentiation **Biology Blood Marrow Transplant**. v18, p.1174–1181, 2012a.

MA, Q.; LI, D.; CARREÑO, R. et al. Complement component C3 mediates Th1/Th17 polarization in human T cell activation and cutaneous Graft-versus-Host Disease. **Bone Marrow Transplantation**. V. 49, n.7, p.972–976, 2014b.

MACHADO, A.L.; ARAGÃO, F.M; BANDEIRA, P.N. et al . Constituintes químicos de *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. (Asteraceae). **Quimica Nova**, v.36, p. 540-543, 2013.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimica Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MADUREIRA, A.M.; ASCENSO, J.R.; VALDEIRA, L. et al Evaluation of the Antiviral and Antimicrobial Activities of Triterpenes Isolated from *Euphorbia segetalis*'. **Journal of Natural Products**, v.17, p. 375 – 380, 2003.

MAHMOOD, A.; NGAH, N.; OMAR, M.N. Phytochemicals constituent and antioxidant activities in *Musa x paradisiaca* flower. **European Journal of Scientific Research**, v. 66, n. 2, p. 311-318, 2011.

MAHMOOD, A.; OMAR, M. N.; NGAH, N. Galactagogue effects of *Musa x paradisiaca* flower extract on lactating rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.5, p.882-886, 2012.

MARIN, R.; APEL, M.; LIMBERGER, R. P.; RASEIRA, M. C. B.; PEREIRA, J. Components and Antioxidant Activity from some Myrtaceous Fruits cultivated in Southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.2, p.172-7, 2008.

MARKMAN, B.E.O.; BUGNO, M.O.; TABA, M. et al. Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Campomanesia xanthocarpa*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.36, p.55, 2002.

MARKMAN, B.E.O; BACCHI, E.M; KATO, E.T.M. Antiulcerogenic Effects of *Campomanesia xanthocarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, n.1,55-57, 2004.

MASTRO, L.D.; VENTURINI, M.; VISCOLI, C. Intensified chemotherapy supported by DMSO-free peripheral blood progenitor cells in breast cancer patients. **Annals of Oncology**. v.12, n.4, p.505-508, 2001.

MENDES, A.M.C. **Triterpenos e a atividade imunossupressora de *Vernonia scorpioides* Pers.(Asteracea)**. Dissertação. Mestrado em Ciências Biológicas e ambiente. Universidade do Maranhão, São Luis, 77 p., 2001.

MENTZ, L.A.; LUTZEMBERGER, L.C.; SCHENKEL, E.P. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: notas sobre a obra de D'ávila (1910). **Caderno de Farmácia**, v.13, n.1, p.25-48, 1997.

MESOMO, M. C. **Obtenção de extrato de gengibre (*Zingiber officinale* roscoe) usando CO<sub>2</sub> supercrítico e propano comprimido: cinética de extração e atividade biológica**. 74 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products** v. 75, n.3, p. 311-35, 2012.

NIRMALA, M.; GIRIJA, K.; LAKSHMAN, K. et al Hepatoprotective activity of *Musa paradisiaca* on experimental animal models. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine** v.2, n.1, p.11–15, 2012.

NISHA, P.; MINI, S. Flavanoid rich ethyl acetate fraction of *Musa paradisiaca* inflorescences down-regulates the streptozotocin induced oxidative stress, hyperglycaemia and mRNA levels of selected inflammatory genes in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n.4, p. 1838-1847, 2013.

NISHA, P.; MINI, S. *In vitro* antioxidant and antiglycation properties of methanol extract and its different solvent fractions of *Musa paradisiaca* L. (cv Nendran) inflorescence. **International Journal of Food Properties**, v.17, n.2, p.399–409, 2014.

OJEWOLE, J.A.; ADEWUNMI, C.O. Hypoglycemic effect of methanolic extract of *Musa paradisiaca* (Musaceae) green fruits in normal and diabetic mice. **Methods and findings in experimental and clinical pharmacology** v.25, n.6, p.453-6, 2003.

OLIVEIRA, A. P.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação dos efeitos genotóxicos e antigenotóxicos do Avelóz em *Drosophila melanogaster*. **Bioscience Journal** v.20, n. 2, p. 179-186, 2004.

OLIVEIRA, C. M. B. et al. Citocinas e dor. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, Campinas, v.61, n.2, p. 260-265, Apr., 2011.

OLIVEIRA, T. L.; MUNHOZ, A.C.M.; LEMES, B.M. et al Antitumoural effect of *Synadenium grantii* Hook f. (Euphorbiaceae) latex. **Journal of Ethnopharmacology**, v.150, p. 263–269, 2013.

ORTÊNCIO, W.B. **Medicina popular do Centro-Oeste**. 2Ed. Thesaurus, 322p, 1997.

PADAM, B.S.; TIN, H.S.; CHYE, F.Y.; ABDULLAH, M.I. Antibacterial and antioxidative activities of the various solvent extracts of banana (*Musa paradisiaca* cv. Mysore) inflorescences. **Journal of Biological Sciences**, v. 12, n. 2, p. 62-73, 2012.

PASSOS, G. F. A.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, R. et al. The role of PKC/ERK1/2 signaling in the anti-inflammatory effect of tetracyclic triterpene Eufol on TPA-induced skin inflammation in mice. **European Journal of Pharmacology**, n.103, v. 698, p. 413–420, 2013.

PASA, M.C.; SOARES, J.J., GUARIM NETO, G. Ethnobotany study in community of Conceição-Açu (on the upper basin of the River Aricá Açu, MT, Brazil). **Acta Botanica Brasilica**, v.19, n.2, p.195-207, 2005.

PEDERSSETTI, M.M.; PALÚ, F.; SILVA, E.A. et al. Extraction of Canola Seed (*Brassica napus*) Oil using Compressed Propane and Supercritical Carbon Dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 102, n.2, p. 189-196, 2010.

PERFUMI, M.; MASSI, M.; DE CARO, G.; Effects of banana feeding on deoxycorticosterone-induced hipertension and salt consumption in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 32, n. 2, p. 115-125, 1994.

PIANOWSKI, L. F.; CALIXTO, J. B.; LEAL, P. C.; CHAVES, C. P. **Pharmaceutical Uses of Lanosta-8,24-dien-3-ols**. US 20110136773 A1. 2011.

PILLAY, M.; TENKOUANO, A. **Banana breeding: Progress and challenges**. 1<sup>o</sup>ed., Boca Raton, FL., CRC Press, 354 p., 2011.

PLATTS-MILLS, T.A.E.; ISHIZAKA, K. Activation of the Alternate Pathway of Human Complement by Rabbit Cells. **Journal of Immunology**, v.113, p.348-358, 1974.

PLOWDEN, C. The Ethnobotany of Copaíba (*Copaifera*) Oleoresin in the Amazon. **Economic Botany**, v.58, n. 4, p.729-733, 2004.

PRASAD, K.; BHARATHI, K.; SRINIVASAN, K. Evaluation of musa (*paradisiaca* linn. Cultivar)-"putiubale" stem for antilithiatic activity in albino rats. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 37, n.4, p.337-341, 1993.

QIN, Y.; WEN, Q.; CAO, J. et al Flavonol glycosides and other phenolic compounds from *Viola tianshanica* and their anti-complement activities. **Pharmaceutical Biology**, p.1-8, 2015.

QU, H., RICKLIN, D., LAMBRIS, J.D. Recent developments in low molecular weight complement inhibitors. **Molecular Immunology**; v.47, n. 2-3, p.185-95, 2009.

QUILEZ, A.; GARCIA, M.D.; SÁENZ, M.T. Plantas utilizadas en procesos inflamatorios y cancerosos en el área del Caribe. **Revista de Fitoterapia**, v.6, n.1, p. 59-63, 2006.

RABBANI, G.H.; TEKA, T.; ZAMAN, B et al. Clinical studies in persistent diarrhea: dietary management with green banana or pectin in Bangladeshi children. **Gastroenterology**, v.121, p. 554-560, 2001.

RIBEIRO, A.Q.; LEITE, J.P.V.; DANTAS-BARROS, A.M. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.1, p.65-70,2005.

RICKLIN, D.; HAJISHENGALLIS, G.; YANG, K.; LAMBRIS, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature Immunology**, v.11, p.785-797, 2010.

RICKLIN, D.; LAMBRIS, J.D. Progress and Trends in Complement Therapeutics. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.734, n.1, p.1–22, 2013.

RODRIGUES, E. **Usos rituais de plantas que indicam ações sobre o Sistema Nervoso Central pelos índios Krahô, com ênfase nas psicoativas.** Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 2001.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados.** Lavras: Editora da UFLA; 180p, 2001.

RODRIGUES, A.P.; ANDRADE, L.H.C. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais utilizadas pela comunidade de Inhamã, Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.16, n.3, p.721-730, 2014.

ROMAN, R. M.; WENDLAND, A. E.; POLANCZYK, C. A. Mieloperoxidase e doença arterial coronariana: da pesquisa à prática clínica. **Arquivos Brasileiro de Cardiologia**, v.91, n.1, p. 12-18, 2008.

ROSAS, E.C.; CORREA, L.B.; PÁDUA, T.A. et al Anti-inflammatory effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi hydroalcoholic extract on neutrophil migration in zymosan-induced arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.175, p. 490–498, 2015.

SANTOS, M.S.; PETKOWICZ, C.L.O.; CARNEIRO, P.I.B et al Physicochemical characterization, extraction and analysis of pectins from fruit of *Campomanesia Xanthocarpa B.* (Gabioba). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 101-106, 2009.

SANTOS, J.M.; CAMPESATTO, E. A.; BASTOS, M. L. A. et al. Evaluation of biological activity of *Musa* spp (banana): integrative literature review. **Journal of Nursing UFPE on line**, v.06, n. 8, p. 1948-1957, 2012.

SAPIÊNCIA, Jornal. **Informativo científico da FAPEPI.** Teresina – PI. N. 23, Ano VI, p. 04-09, 2010.

SATO, M.; SANO, H.; IWAKI, D. et al. Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are

down-regulated by lung collectin surfactant protein A. **Journal of Immunology.**, v.171, n.1, p. 417–25, 2003.

SENS, S.L. **Alternativas para a auto-sustentabilidade dos XOKLENG da terra indígena Ibirama.** Dissertação (Mestrado Engenharia de Produção) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

SHARATH, M. D; Merchant, Z.M, Kim, Y.S. et al Small heparin fragments regulate the amplification pathway of complement. **Immunopharmacology**, v. 9, p.73-80,1985.

SHEN, Y.; HALPERIN, J.A.; BENZAQUEN, L.; LEE, C.M. Characterization of neuronal cell death induced by complement activation. **Brain Research Protocols**, v.1, p.186-94, 1997.

SHENG, Z.W.; MA, W.H.; GAO, J.H. et al Antioxidant properties of banana flower of two cultivars in China using 2,2diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) reducing power, 2,2-azinobis-(3ethylbenzthiazoline-6-sulphonate (ABTS) and inhibition of lipid peroxidation assays. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 21, p. 4470-4477, 2011.

SHODEHINDE, S.A.; OBOH, G. Antioxidant properties of aqueous extracts of unripe *Musa paradisiaca* on sodium nitroprusside induced lipid peroxidation in rat pancreas *in vitro*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 6, p. 449-457, 2013.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. **Fitoterapia**, v.66, n.4, p.373-4, 1995.

SILVA, M.I.G.; GONDIM, A.P.; NUNES, I.F.S et al. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, p.455-62, 2006.

SILVA, M.R.; LACERDA, D.B.C L.; SANTOS, G.G. et al Caracterização química de frutos nativos do cerrado. **Ciência Rural** v. 38, n. 6, p. 1790-1793, 2008.

SILVA, R.A.O.; SANTOS, M.R.M.C.; SILVA, M.C.C. et al . Prospecção Tecnológica de Fitoterápico (*Euphorbia Tirucalli* L.) utilizado no tratamento de neoplasias e outras doenças. **Cadernos de Prospecção**, v.6, n.4, p.490-499, 2013

SILVA, A.C.P.; SARTORI, G.V.; OLIVEIRA, A.L. Composição nutricional do coração da bananeira e sua utilização como um alimento alternativo, **SaBios: revista de saúde e biologia**, v. 9, n. 2, p.40-45, 2014.

SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6ª ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 1102 p., 2007.

SINGH, S.; BANI, C.B.; SINGH. Anti-inflammatory activity of lupeol. **Fitoterapia**, v. 62, n.1, p.9 – 16, 1997.

STALDONI, V. de O. **Caracterização dos compostos secundários e avaliação da atividade antioxidante de inflorescências de *Musa paradisiaca* L.** Dissertação (Mestrado em Ciências (Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, 2015.

TEBAA, W.; HAKMAOUI, A.; BENHARREF, W. et al. Short and efficient hemisynthesis of -eudesmol and cryptomeridiol. **Tetrahedron Letters**, v. 52, p. 3769–3771, 2011.

THEODULOZ, C.; FRANCO, L.; FERRO, E. et al Xanthine oxidase inhibitory activity of Paraguayan myrtaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v.24, p. 179–183, 1988.

THURMAN, M; HOLERS, V. M. The central role of the alternative complement pathway in human disease. **Journal of Immunology**, v.176, n.3, p. 1305-1310, 2006.

TIMAR, K.K.; JUNNIKALA, S.; DALLOS, A. et al Human keratinocytes produce the complement inhibitor factor I: Synthesis is regulated by interferon-gamma. **Molecular Immunology**, v. 44, n.11, p.2943-9, 2007a.

TIMAR, K.K.; DALLOS, A.; KISS, M. et al Expression of terminal complement component by human keratinocytes. **Molecular Immunology** v:44, n.10, p.2578-86, 2007b.

TREVISAN, G.; ROSSATO, M.F.; WALKER, C.I et al Identification of the plant steroid  $\alpha$ -spinasterol as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive properties. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.343, p.258–269, 2012.

UTIYAMA, S.R.R.; REASON, I.T.M.; KOTZE, L.M.S. O sistema complemento nas doenças: genética e patogenia. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.44, n.4, p. 277-286, 2004.

VALLILO, M.I.; MORENO, P.R.H.; OLIVEIRA, E. Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 28, supl. p.231-237, 2008.

VARRICCHIO, M.C.B.N.; SILVA, S.; GOMES, N.B.N. et al. O uso de *Euphorbia tirucalli* (Aveloz) em medicina tradicional e as evidências científicas. **Revista de Biologia e Farmácia**, v.3, n.1, p. 84-92, 2008.

VIECILI, P.R.; BORGES, D.O.; KIRSTEN, K. et al Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on inflammatory processes, oxidative stress, endothelial dysfunction and lipid biomarkers in hypercholesterolemic individuals. **Atherosclerosis**, v. 234, n.1, p. 85–92, 2014.

VIJAYAKUMAR, S.; PRESANNAKUMAR, G.; VIJAYALAKSHMI, N. R. Antioxidant activity of banana flavonoids, **Fitoterapia**, v.79, n.4, p.279, 2008.

YAMADA H.; NAGAI T.; CYONG J., et al. Relationship between chemical structure and anti-complementary activity of plant polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 144, p.101-111, 1985.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

WAGNER, E.; FRANK, M. Therapeutical potencial of complement modulation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.9, n.1, p. 43-53, 2010.

WAGNER, Z.; PAVLÍCEK, J. Vapour-liquid equilibrium in the carbon dioxide-p-cymene system at high pressure. **Fluid Phase Equilibria**, v.90, p. 135-141, 1993.

WALPORT, M. J. Complement. First of two parts. **New England Journal of Medicine** v. 344, n 14, p. 1058-66, 2001.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Policy perspectives on medicines: medicina tradicional – necesidades crecientes y potencial. Geneva, p. 6, 2002.

ZHAO, L.; CHEN, X.; ZHU, J.; et al. Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts. **NATURE**, v. 523, n. 7574, p. 595-607, 2015.