

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 28/09/2019.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Estudo químico do extrato etanólico das folhas de *Murraya paniculata* (L.) Jack e avaliação da ação anti-inflamatória

CELIA MAGALY CASADO MARTÍN

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

Araraquara - SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

**Estudo químico do extrato etanólico das folhas
de *Murraya paniculata* (L.) Jack e avaliação da
ação anti-inflamatória**

Celia Magaly Casado Martín

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de
Fármacos e Medicamentos, para obtenção
do Título de Doutor em Ciências
Farmacêuticas.**

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

Araraquara - SP

2018

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Martín, Celia Magaly Casado
M379e Estudo químico do extrato etanólico das folhas de *Murraya paniculata* (L.) Jack e avaliação da ação anti-inflamatória / Celia Magaly Casado Martín. – Araraquara, 2018.
131 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento em Fármacos e Medicamentos.

Orientador: André Gonzaga dos Santos.

1. *Murraya paniculata*. 2. Fracionamento biomonitorado. 3. Atividade anti-inflamatória.
4. Atividade antioxidante. 5. Cumarina. I. Santos, André Gonzaga dos, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

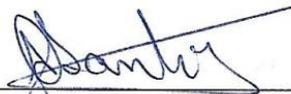
CELIA MAGALY CASADO MARTIN

ESTUDO QUÍMICO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE MURRAYA PANICULATA L.
JACK E AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Araraquara, 28 de março de 2018.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS
Orientador



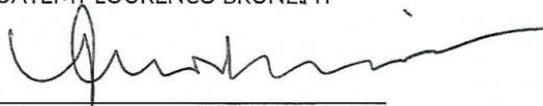
Prof. Dr. FÁBIO FERREIRA PERAZZO



Prof. Dr. ARISTEU GOMES TININIS



Prof. Dr. IGUATEMY LOURENÇO BRUNETTI



Profa Dra. MAGALI CONCEIÇÃO MONTEIRO DA SILVA

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais e irmão pelo amor, apoio e incentivo e a minha família toda,
que mesmo de longe sempre torceram por mim.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Dr. André Gonzaga dos Santos que desde o primeiro momento aceitou encarar este desafio. Agradeço seus ensinamentos, paciência, compreensão e apoio toda vez que precisei, sempre será um exemplo pessoal e profissional para mim.

À minha amiga e professora, Dra. Yamilet Irene Gutierrez Gaitén da Universidade de Havana, com quem comecei esse projeto, e aos estudantes de TCC e mestrado que nos acompanharam, obrigada também por fornecer o material vegetal.

A todo o pessoal do Laboratório de Farmacognosia, o técnico Caio, a Professora Raquel e todos os alunos que durante estes quase quatro anos me apoiaram sempre que precisei, Rogério, Elaise, Fernando, Isa, Juham, Ana Carolina, Flavio e especialmente a Gabi, que desde o primeiro dia e até hoje tem sido uma amiga maravilhosa, me ajudando em experimentos, corrigindo cada erro do meu português e fundamentalmente se convertendo quase em parte da minha família.

Ao Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, a Dr. Renata Pires de Assis e a aluna de doutorado Tayra Ferreira que me ensinaram cada protocolo e acompanharam cada experimento realizado no Laboratório de Bioquímica e Enzimología Clínicas. À professora Amanda e o resto das alunas e alunos do laboratório que também me acolheram com muito carinho e me apoiaram nos experimentos.

À Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros e ao mestrando Alan Bortinhon Orlando do Laboratório de Imunologia por disponibilizar tempo e recursos para contribuir ao meu trabalho.

À Profa. Dra. Flávia Aparecida Resende Nogueira e as alunas do Laboratório de Mutagênese da UNIARA pela contribuição.

Às antigas técnicas do Laboratório Multiusuário do PADC, Cláudia, Jussara e Mari, por tantas horas de análise, além disso, pela amizade, por me ouvir em dias difíceis e por estar sempre ao pendente de mim ainda de longe.

Ao pessoal do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia pelo apoio, professores, técnicos e alunos de todos os laboratórios prestes sempre a brindar qualquer ajuda. Também professores, técnicos e alunos dos laboratórios de parasitologia, microbiologia, farmacotécnica, análise de alimentos, química farmacêutica, enfim qualquer canto da faculdade onde precisei de ajuda e sempre recebi.

Ao estudante de doutorado do IQ, Antonio Fernández, pelas análises de LC-MS e pela contribuição, também a todos meus colegas e amigos cubanos em Araraquara, tanto da FCFAR (Vivian, Alexander, Damiana) quanto do IQ (Michael, Daylin, Alexander, Yani, Maité, Chanfrau) e aos que mesmo fora da UNESP-Araraquara também formam parte da família mais próxima aqui no Brasil (Lesvi, Leonar, Patricia) e a tantos outros cubanos desde Botucatu, São Paulo até Rio de Janeiro, pelo apoio toda vez que precisei, pelas discussões e contribuições.

Às meninas da república, as que passaram e as que estão hoje, especialmente a Bruninha por tantas risadas e também pela ajuda a qualquer momento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pela oportunidade e a AUIP pela bolsa concedida para a realização do meu doutorado.

A todos os que de alguma forma contribuíram com meu trabalho.

RESUMO

Murraya paniculata L. Jack (Rutaceae) é uma árvore amplamente utilizada nas Américas como ornamental. Porém, esta espécie vegetal nativa da Índia é considerada medicinal na Ásia e reconhecida pelas propriedades adstringentes, estimulantes, analgésicas e anti-inflamatórias. Diversos estudos revelam a presença de alcaloides, flavonoides, cumarinas e componentes do óleo essencial, fundamentalmente, e as propriedades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias e analgésicas foram observadas para extratos de *M. paniculata*. Fitoterápicos derivados da planta estão disponíveis no Sistema Nacional de Saúde cubano, como anti-inflamatórios, porém é limitado o conhecimento dos metabólitos secundários majoritários da espécie coletada em Cuba e sua relação com a atividade farmacológica. Neste contexto, foi desenvolvido este trabalho que teve como objetivo realizar o estudo químico do extrato etanólico de folhas de *M. paniculata*, a fim de contribuir com sua padronização e com o estabelecimento de especificações de qualidade com base na composição química e atividade anti-inflamatória. O fracionamento do extrato etanólico foi iniciado por extração em fase sólida fornecendo 4 frações. A fração EFSMp4 foi fracionada utilizando-se cromatografia em coluna. A purificação final das substâncias majoritárias obtidas a partir de EFSMp4 foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa de fase reversa. As frações, subfrações e substâncias purificadas foram analisadas por CCD, CLAE-DAD e CLAE-ESI-MS. As substâncias purificadas foram identificadas através dos dados obtidos nas análises espectrométricas (RMN de ^1H e ^{13}C , IV, UV e EM). O extrato e as frações obtidas por extração em fase sólida foram submetidos aos ensaios de edema de pata e de pleurisia induzidos por carragenina, em ratos de linhagem Wistar e a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* foi realizada por vários métodos: ensaio de capacidade de captura do cátion radicalar ABTS^{•+} (derivado do ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico); ensaio de captura do ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e ensaio de captura do ácido hipocloroso (HClO) ou da Taurina-Cloramina. No caso do extrato e da fração EFSMp4 foram realizados ensaios de mutagenicidade. Adicionalmente a citotoxicidade da fração EFSMp4 e das substâncias purificadas foi avaliada através do ensaio com MTT em macrófagos (células RAW 264.7) nos quais também foi feita a quantificação de nitrito. A partir de neutrófilos (recrutados do peritônio de ratos Wistar sadios), foi avaliada *ex vivo* a função da enzima mieloperoxidase e a produção total de EROs. O extrato etanólico (300mg/Kg) e a fração EFSMp4 (150mg/Kg) apresentaram o melhor efeito anti-inflamatório pelo modelo de edema de pata, mostrando também o menor efeito ulcerogênico na mucosa gástrica dos animais tratados. Os resultados do experimento de pleurisia não foram conclusivos pois o modelo não permitiu obter resultados associados à atividade anti-inflamatória, porém mostrou evidências de um provável efeito hemorrágico de EFSMp4. Quanto à atividade antioxidante, nos experimentos nos quais conseguiu-se observar a resposta das amostras em estudo, o extrato etanólico e as frações EFSMp3 e EFSMp4 alcançaram os menores valores CE_{50} . Em relação à mutagenicidade foi observado que o extrato, bem como EFSMp4, atuaram induzindo potencial mutagênico nos experimentos sem e com ativação metabólica. Dois metabólitos majoritários de EFSMp4 foram isolados e

identificados como as cumarinas hidrato de meranzina e murpanidina, já relatadas em folhas da espécie. O hidrato de meranzina foi quantificado, representando um 8,4% (m/m) do EEMp. Os metabolitos não apresentaram citotoxicidade em macrófagos nas concentrações de 2,5-40,0 g/mL e as porcentagens de inibição de NO na concentração de 40,0 g/mL foram EFSMp4 (54%), murpanidina (30,1%) e hidrato de meranzina (8,0%). A identificação de outra cumarina da mesma classe das já purificadas foi proposta a partir análise por CLAE-ESI-MS (murralongina). Os resultados sugerem que as cumarinas constituem um grupo de metabólitos secundários majoritários no extrato etanólico, bem como sua relação com a ação anti-inflamatória do extrato.

Palavras-chave: *Murraya paniculata*. Fracionamento biomonitorado. Atividade anti-inflamatória. Atividade antioxidante. Cumarina.

ABSTRACT

Murraya paniculata L. Jack (Rutaceae) is a widely used tree in America as ornamental. However, this Indian native plant is considered medicinal in Asia and recognized by its astringent, stimulating, analgesic and anti-inflammatory properties. Several studies have revealed the presence of alkaloids, flavonoids, coumarins and essential oil components, fundamentally, and the antibacterial, antifungal, anti-inflammatory and analgesic properties were observed for *M. paniculata* extracts. Phytotherapics derived from the plant are available in Cuban National Health System, as anti-inflammatory drugs, but knowledge of the major secondary metabolites of *M. paniculata* collected in Cuba and its relation to pharmacological activity is limited. In this context, the aim of this research was to study the ethanolic extract of *M. paniculata* leaves, in order to contribute to its standardization and to the establishment of quality specifications based on chemical composition and anti-inflammatory activity. Fractionation of the ethanolic extract was initiated by solid phase extraction yielding 4 fractions, the fraction EFSMp4 being fractionated using column chromatography. The final purification of the major components obtained from EFSMp4 was performed by preparative reverse phase high performance liquid chromatography. The fractions, subfractions and purified substances, were analyzed by CCD, CLAE-DAD and HPLC-ESI-MS. The purified substances were identified by the data obtained in the spectrometric analyzes (^1H and ^{13}C NMR, IR, UV and MS). The extract and fractions obtained by solid phase extraction were submitted to carrageenan-induced paw edema and pleurisy tests in Wistar rats and *in vitro* antioxidant activity evaluation was performed by several methods: radical cation ABTS $^{•+}$ (2,2'-azino-bis- (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) capture capacity test; superoxide radical anion capture test ($\text{O}_2^{\bullet-}$) and hypochlorous acid (HClO) or Taurine-chloramine capture test. In the case of the extract and the EFSMp4 fraction, mutagenicity tests were performed. Additionally, the cytotoxicity of the EFSMp4 fraction and the purified substances was evaluated by the MTT assay on macrophages (RAW 264.7 cells) in which nitrite quantification was also performed. From neutrophils (recruited from the peritoneum of healthy Wistar rats), myeloperoxidase enzyme function and total ROS production were evaluated *ex vivo*. Ethanolic extract (300mg/kg) and EFSMp4 fraction (150mg/kg) presented the best anti-inflammatory effect by the paw edema model, also showing the lowest ulcerogenic effect on the gastric mucosa of treated animals. The results of the pleurisy experiment were not conclusive because the model did not showed results associated with the anti-inflammatory activity but showed evidence of a probable EFSMp4 hemorrhagic effect. As for the antioxidant activity, in the experiments in which it was possible to observe the response of the samples under study, the ethanol extract, EFSMp3 and EFSMp4 reached the lowest IC_{50} values. Regarding the mutagenicity, it was observed that the extract, as well as EFSMp4, acted to induce mutagenic potential in the experiments without and with metabolic activation. Two major metabolites of EFSMp4 were isolated and identified as the coumarins meranzine hydrate and murpanidine, already reported in leaves of the species. Meranzine hydrate was quantified representing a 8.4% (m/m) of EEMp. Macrophage cytotoxicity in the concentration range evaluated (2.5-40.0 $\mu\text{g/mL}$) was not observed and NO inhibition percent at 40.0 $\mu\text{g/mL}$ were EFSMp4

(54.0%), murpanidine (30.1%) and meranzine hydrate (8.0%). The identification of another coumarin of the same class of the two already purified was proposed from analysis by HPLC-ESI-MS (murralongin). The results suggest that coumarins are a group of major secondary metabolites in the ethanolic extract, as well as their relationship with the anti-inflammatory action of the extract.

Key-words: *Murraya paniculata*. Biomonitoring fractionation. Anti-inflammatory activity. Antioxidant activity. Coumarin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt: acetato de etila
AINE: anti-inflamatório não-esteroidal
ATCC: *American Type Culture Collection* (Coleção Americana de Cultura de Células)
C-18: sílica octadecilsilano
CC: cromatografia em coluna
CCD: cromatografia em camada delgada
CCMp: fração obtida em coluna cromatográfica de fase normal
Cl₅₀: concentração capaz de provocar uma determinada inibição em 50 % do alvo
CLAE-DAD: cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
CLAE-UV: cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta/visível
CLAEprep: cromatografia líquida de alta eficiência preparativa
CMC: Carboximetilcelulose
COX: ciclo-oxigenase
COX-1: ciclo-oxigenase tipo 1
COX-2: ciclo-oxigenase tipo 2
d: duplete
dd: duplo duplete
DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium* (meio de Eagle modificado por Dulbecco)
EFS: extração em fase sólida
EM: espectrômetro de massas
ESI: ionização por eletrospray
EtOH: etanol
EEMp: Extrato etanólico de *M. paniculata*
EFSMp1: fração 1 da EFS
EFSMp2: fração 2 da EFS
EFSMp3: fração 3 da EFS
EFSMp4: fração 4 da EFS
ERON: Espécies reativas de nitrogênio
EROs: Espécies reativas de oxigênio
FE: fase estacionária
FM: fase móvel
FN: fase normal
FR: fase reversa
Hex: Hexano
IL: Interleucina
iNOS: óxido nítrico sintase induzida
IV-FT: espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
J: constante de acoplamento
 $\lambda_{\text{máx}}$: comprimento de onda máximo
LPS: lipopolissacarídeo
Me: metila
MeOH: metanol

MPO: mieloperoxidase
NF- κ B: fator nuclear-kappa B
NO: *nitric oxide* (óxido nítrico)
NOX2: isoforma da enzima NADPH oxidase (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase)
Metanol-d4: metanol deuterado
OMS: Organização Mundial de Saúde
PEG: Polietilenoglicol
PGE2: prostaglandina E2
PLA2: fosfolipase A2
PVDF: fluoreto de polivinildieno
RAW 264.7: macrófagos peritoneais aderentes derivados de camundongos Balb/c
Rf: fator de retenção
RMN: ressonância magnética nuclear
s: singleto
SPMp1: substância purificada 1
SPMp2: substância purificada 2
TNF: Fator de necrose tumoral
tR: tempo de retenção
UV/VIS: ultravioleta/ visível
Vm: volume morto
Veluente: Volume de eluente
Vinj: Volume de injeção
X: fator de correção de modo cromatográfico
 λ max: Comprimento de onda máximo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mediadores inflamatórios e seus efeitos.	10
Tabela 2. Parâmetros de qualidade da droga vegetal pulverizada (<i>M. paniculata</i>).	37
Tabela 3. Resíduo seco dos extratos obtidos segundo as condições de extração.	41
Tabela 4. Rendimento das frações obtidas mediante EFS.	52
Tabela 5. Massas e rendimento das sub-frações obtidas a partir de EFSMp4	63
Tabela 6. Dados espectrométricos de RMN obtidos para as substâncias purificadas SPMp1 e SPMp2 a 600 MHz para ¹ H e a 150 MHz para ¹³ C, em metanol-d4.	72
Tabela 7. Dados das análises em CLAE-DAD do hidrato de meranzina para a construção da curva analítica.	75
Tabela 8. Dados obtidos na quantificação do hidrato de meranzina no extrato EEMp.	75
Tabela 9. Efeito ulcerogênico do EEMp e das frações EFSMp. Os resultados representam o número médio de úlceras identificadas em cada grupo ± desvio padrão e o grau em que foram classificadas.	79
Tabela 10. Atividade mutagênica expressa através da média e desvio padrão do número de revertentes/ placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA 98, TA 100, TA97a e TA 102 de <i>S. typhimurium</i> após o tratamento com várias concentrações do extrato de <i>M. paniculata</i> , em experimentos sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica	87
Tabela 11. Atividade mutagênica expressa através da média e desvio padrão do número de revertentes/ placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA 98, TA 100, TA97a e TA 102 de <i>S. typhimurium</i> após o tratamento com várias concentrações da fração EFSMp4, em experimentos sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica	87
Tabela 12. Atividade citotóxica das amostras em estudo a concentrações de 40-1,25g/mL para macrófagos da linhagem RAW 264.7 determinadas pelo método MTT.	88
Tabela 13. Atividade citotóxica das amostras em estudo a concentrações de 10-0,3g/mL para macrófagos da linhagem RAW 264.7 determinadas pelo método MTT.	89
Tabela 14. Atividade citotóxica das amostras em estudo a concentrações de 40-2,5g/mL em neutrófilos peritoneais determinada pelo método MTT.	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>M. paniculata</i> : individuo adulto (a), detalhe de folhas (b), flores (c) e frutos (d).	4
Figura 2. Principais esqueletos básicos de classes de cumarinas isoladas de plantas.	7
Figura 3. Geração dos metabólitos do ácido araquidônico e seus papéis na inflamação.	9
Figura 4. Distribuição granulométrica da droga vegetal (pó originado na primeira moagem) de <i>M. paniculata</i> .	38
Figura 5 Distribuição granulométrica da droga vegetal (pó originado da segunda moagem após a primeira extração) de <i>M. paniculata</i> .	39
Figura 6. Diagrama do processo de extração.	40
Figura 7. Cromatograma de EEMp1 (3 mg/mL) registrado em 324 nm.	43
Figura 8. Cromatograma de EEMp2 (3 mg/mL) registrado em 324 nm.	44
Figura 9 Cromatograma de EEMp3 (3 mg/mL) registrado em 324 nm.	45
Figura 10. Cromatograma do EEMp (3 mg/mL) registrado em 324 nm (10a) e apresentando os valores de comprimento de onda máximo de absorção no UV para cada pico (10b).	46
Figura 11. Espectros no UV dos picos majoritários de EEMp (a: $t_R = 19,57$ min e b: $t_R = 22,09$ min).	47
Figura 12. Cromatograma do EEMp (3 mg/mL) registrado em 324 nm.	48
Figura 13. Cromatograma (BPC) do EEMp (3 mg/mL) em modo de ionização positivo mostrando os valores de t_R e m/z para cada pico.	49
Figura 14: Espectros de massas ESI-MS ⁿ no modo positivo para a substância com $T_r = 17,6$ min no EEMp.	50
Figura 15. Análise por CCD (sílica gel) das frações obtidas por EFS (EFSMp) utilizando tolueno:acetato de etila (93:7) como fase móvel. (a) – cromatoplaça observada sob luz UV 365 nm. (b) – cromatoplaça após revelação com anisaldeído sulfúrico.	51
Figura 16. Cromatogramas das frações EFSMp1 (1 mg/mL) registrado em 254 nm.	54
Figura 17. Cromatogramas das frações EFSMp2 (1 mg/mL) registrado em 324 nm.	55
Figura 18. Cromatogramas das frações EFSMp3 (1 mg/mL) registrado em 324 nm.	56
Figura 19. Cromatogramas das frações EFSMp4 (1 mg/mL) registrado em 324 nm.	57
Figura 20. Cromatograma (BPC) do EFSMp1 (1 mg/mL) em modo de ionização positivo mostrando os valores de t_R e m/z para cada pico.	58
Figura 21. Cromatograma (BPC) do EFSMp2 (1 mg/mL) em modo de ionização positivo mostrando os valores de t_R e m/z para cada pico.	59
Figura 22. Cromatograma (BPC) do EFSMp3 (1 mg/mL) em modo de ionização positivo mostrando os valores de t_R e m/z para cada pico.	60
Figura 23. Cromatograma (BPC) do EFSMp4 (1 mg/mL) em modo de ionização positivo mostrando os valores de t_R e m/z para cada pico.	61
Figura 24. Análise por CCD (sílica gel) de frações obtidas mediante CC de fase normal (CCMp) utilizando tolueno:acetato de etila:metanol (60:35:5) como fase móvel – cromatoplaças após revelação com anisaldeído sulfúrico.	64

Figura 18a) frações 1 a 16, 18b) frações 17 a 35, 18c) frações 36 a 54 e 18d) frações 55 a 70.	
Figura 25. Cromatograma da fração CCMp16 registrado em 324 nm.	65
Figura 26. Cromatograma da fração CCMp24 registrado em 324 nm.	66
Figura 27. Cromatograma da fração CCMp44 registrado em 324 nm.	66
Figura 28. Cromatograma da fração CCMp51 registrado em 324 nm.	67
Figura 29. Espectro de absorção no UV para o pico majoritário 2 (t_{R} = 22,12 min) da fração CCMp44.	67
Figura 30. Cromatograma preparativo do procedimento de purificação de substâncias majoritárias.	68
Figura 31. Cromatogramas das substâncias purificadas SPMp1 (a) e SPMp2 (b).	69
Figura 32. Espectro de massas (ESI+, MS1) para substâncias purificadas: murpanidina (SPMp1) e hidrato de meranzina (SPMp2).	71
Figura 33. Estrutura da 7-metoxicumarina.	72
Figura 34. Estruturas propostas para as substâncias purificadas: a) murpanidina e b) hidrato de meranzina	72
Figura 35. Espectro de absorção no IV para substâncias purificadas: murpanidina (SPMp1) e hidrato de meranzina (SPMp2).	73
Figura 36. Curva analítica para solução padrão de hidrato de meranzina.	75
Figura 37. Efeito da administração oral do EEMp (300mg/Kg) e das frações EFSMp1 (20mg/Kg), EFSMp2 (30mg/Kg), EFSMp3 (25mg/Kg) e EFSMp4 (150mg/Kg) sobre o edema de pata induzido por carragenina (200 µg/pata) em ratos.	76
Figura 38. Mucosa gástrica de animais submetidos aos ensaios de edema de pata. Grupo 1- Controle carragenina; Grupo 2- Controle indometacina; Grupo 3- EEMp (100mg/Kg); Grupo 4- EEMp (150mg/Kg) e Grupo 5- EEMp (300 mg/Kg)	78
Figura 39. Mucosa gástrica de animais submetidos aos ensaios de edema de pata. Grupo 1- Controle carragenina; Grupo 2- Controle indometacina; Grupo 3- EFSMp1 (20mg/Kg); Grupo 4- EFSMp2 (30 mg/Kg); Grupo 5- EFSMp3 (25 mg/Kg) e Grupo 6- EFSMp4 (150 mg/Kg).	78
Figura 40. Efeito da administração intrapleural de EEMp (300mg/Kg), EFSMp1 (20mg/Kg) e EFSMp2 (30mg/Kg), sobre a pleurisia induzida por carragenina em ratos.	80
Figura 41. Tubos contendo lavados pleurais coletados de animais pertencentes ao grupo tratado com EFSMp4 (150mg/Kg).	80
Figura 42. Gráfico da porcentagem de inibição do radical ABTS ^{•+} <i>versus</i> a concentração de EEMp (µg/mL).	82
Figura 43. Gráfico da porcentagem de inibição do radical ABTS ^{•+} <i>versus</i> a concentração de EFSMp2 (µg/mL).	82
Figura 44. Gráfico da porcentagem de inibição do radical ABTS ^{•+} <i>versus</i> a concentração de EFSMp3 (µg/mL).	83
Figura 45. Gráfico da porcentagem de inibição do radical ABTS ^{•+} <i>versus</i> a concentração de EFSMp4 (µg/mL).	83
Figura 46. Efeito das amostras em estudo sobre a inibição de nitrito em ensaio de macrófagos estimulados por LPS (100 ng/mL) <i>in vitro</i> .	89
Figura 47. Atividade de NOX2/MPO de neutrófilos peritoneais mediante quimiluminescência luminol-dependente. Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM).	91

Figura 48. Atividade de NOX2/MPO de neutrófilos peritoneais mediante quimiluminescência luminol-dependente. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).	92
Figura 49: Concentração de HOCl em neutrófilos peritoneais ativados com PMA	93
Figura 50: Concentração de HOCl em neutrófilos peritoneais ativados com PMA	94

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1	Murraya paniculata (L.) Jack.	4
2.1.1	Classificação taxonômica e descrição botânica	4
2.1.2	Habitat e distribuição	4
2.1.3	Fitoquímica e farmacologia	5
2.2	Cumarinas	7
2.3	Processo Inflamatório	8
2.3.1	Fármacos Anti-inflamatórios Não Esteroidais	11
2.3.2	Plantas com Atividade Anti-inflamatória	13
2.3.3	Estresse oxidativo e sua correlação com o processo inflamatório	14
3	OBJETIVOS	16
4	MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1	Materiais, equipamentos e acessórios.	17
4.2	Material vegetal	19
4.2.1	Obtenção e preparo da matéria-prima vegetal	19
4.2.2	Análise da matéria-prima vegetal	19
4.3	Obtenção e análise do extrato, frações e substâncias purificadas.	20
4.3.1	Obtenção e análise do extrato etanólico	20
4.3.2	Fracionamento do extrato etanólico de folhas de <i>M. paniculata</i> por extração em fase sólida EFS	21
4.3.3	Análises cromatográficas do extrato EEMp e frações EFSMp	22
4.3.4	Fracionamento de EFSMp4 por cromatografia em coluna de fase normal (CC) e análises das sub-frações CCMp	23
4.3.5	Purificação de metabolitos majoritários por CLAE-UV semipreparativa	24
4.3.6	Determinação estrutural das substâncias isoladas	25
4.3.7	Quantificação do hidrato de meranzina no extrato EEMp	25
4.4	Ensaio biológicos	26
4.4.1	Avaliação da atividade anti-inflamatória do EEMp e frações EFSMp através do modelo de edema de pata em rato	26
4.4.2	Avaliação “in vivo” da atividade anti-inflamatória do EEMp e frações EFSMp por pleurisia	27
4.4.3	Avaliação “in vitro” da atividade antioxidante	28
4.4.4	Ensaio de mutagenicidade	30
4.4.5	Ensaio com macrófagos “in vitro”	31
4.4.6	Ensaio com neutrófilos “ex vivo”	34
4.4.7	Análise estatística	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	Análise do material vegetal	37
5.2	Obtenção e análise do extrato, frações e substâncias purificadas.	39
5.2.1	Análise dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	41
5.2.2	Análises cromatográficas do extrato EEMp	46
5.2.3	Fracionamento do extrato etanólico de folhas de <i>M. paniculata</i> por extração em fase sólida (EFS) e análise das frações EFSMp	51

5.2.4	Fracionamento de EFSMp4 por cromatografia em coluna de fase normal (CC) e análises das sub-frações CCMp	62
5.2.5	Purificação de metabolitos maioritários por CLAE-UV semipreparativa	68
5.2.6	Determinação estrutural das substâncias isoladas	70
5.2.7	Quantificação do hidrato de meranzina no extrato EEMp	75
5.3	Ensaio biológico	76
5.3.1	Avaliação da atividade anti-inflamatória do EEMp e frações EFSMp através do modelo de edema de pata em rato	76
5.3.2	Avaliação “in vivo” da atividade anti-inflamatória do EEMp e frações EFSMp por pleurisia	79
5.3.3	Avaliação “in vitro” da atividade antioxidante	81
5.3.4	Ensaio de mutagenicidade	85
5.3.5	Ensaio com macrófagos “in vitro”	88
5.3.6	Ensaio com neutrófilos “ex vivo”	90
6	CONCLUSÕES	95
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	97
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
	APÊNDICES	109
	ANEXOS	113

1. INTRODUÇÃO

A utilização da medicina tradicional e complementar segue sendo ampliada na maioria dos países. Os dados disponíveis sugerem que esse mercado é substancial. De acordo com estimativas, em 2012, os produtos chineses de matéria médica representaram US\$ 83,100 milhões, um aumento de mais de 20% em relação ao ano anterior. Na República da Coreia, as despesas anuais em medicina tradicional foram de US\$ 4,400 milhões em 2004 e aumentaram para US\$ 7,400 milhões em 2009. Em 2008, nos Estados Unidos, os usuários gastaram US\$ 14,800 milhões na compra de produtos naturais. Apesar disso, em muitas partes do mundo, as instâncias normativas, os profissionais da saúde e o público estão levantando questões sobre a segurança, eficácia, qualidade, disponibilidade, preservação e regulamentação da medicina tradicional e complementar (OMS, 2013).

No caso do uso de plantas medicinais e fitoterápicos, como parte da medicina tradicional e complementar, são especialmente importantes padrões de qualidade que garantam a segurança e eficácia adequadas para os consumidores.

Nesse sentido, os estudos de padronização de fitoterápicos nos últimos anos têm como objetivo correlacionar concentração e estabilidade dos marcadores químicos conhecidos com a atividade biológica, proporcionando um protocolo viável para a análise de qualquer produto à base de plantas (MOSIHUZZAMAN e CHOUDHARY, 2008; VENIL, 2010).

M. paniculata é uma árvore nativa da Índia que foi introduzida em vários países americanos, Cuba e Brasil entre eles, sendo largamente utilizada como arbusto ou árvore ornamental. Além disso, é considerada como planta medicinal nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia. As folhas, cascas e raízes desta planta têm sido usadas para tratar a diarreia, disenteria, reumatismo, erupções na pele e coceira. As flores são usadas na produção de produtos cosméticos (ROIG, 1988; GHANI, 2003; ROUT et al., 2007; MESQUITA et al., 2008; VARONA, 2013). É também reconhecida tradicionalmente por suas propriedades adstringentes, estimulantes, analgésicas e anti-inflamatórias, entre outras (ROIG, 1988; GHANI, 2003;

RAHMAN et al., 2010; NARKHEDE, 2012). A espécie é também conhecida pelas sinonímias botânicas de *Chalcas paniculata* L., *M. exotica* e pelos nomes comuns de árvore de jasmim-laranja, jasmim-da-pérsia, murta-de-cheiro, murallera e café-índio. O “Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos” de Cuba (MINSAP, 2014) refere-se ao uso do extrato hidroalcoólico na elaboração de um fitoterápico para uso tópico (fricção), com propriedades anti-inflamatórias e analgésicas.

Do ponto de vista das atividades biológicas, dados da literatura demonstram que *M. paniculata* apresentou atividade antioxidante, antinociceptiva, anti-inflamatória, antidiarreica e analgésica (RAHMAN et al., 2010; KUMAR et al., 2011; SUNDARAM et al., 2011; NARKHEDE et al., 2012; RODANANT et al., 2012).

Estudos fitoquímicos revelam a presença nesta espécie de cumarinas, alcaloides e flavonoides, entre outros metabólitos secundários (KONG et al., 1985; ITO; FURIKAWA, 1990; FERRACIN et al., 1998; SHIMADA, 2002; KINOSHITA; NEGI et al., 2005; SAIED et al., 2008,). A espécie também contém óleo essencial em diferentes órgãos (ROUT et al., 2007; OLAWORE et al., 2005; CHOWDHURY et al., 2008; MESQUITA et al., 2008; JORGE et al., 2012). Em geral, os estudos preliminares do extrato etanólico das folhas da espécie, em plantas que crescem na região ocidental de Cuba, têm mostrado a partir do ponto de vista fitoquímico a presença, entre outros compostos, de copaeno, β -cubebeno, cariofileno, germacreno B, ostol, 6-fenil izoquinolina, sitosterol, L-prolina, ácido ferúlico e mio-inositol, para os quais são descritas na literatura propriedades anti-inflamatórias e analgésicas. Além disso, a avaliação pré-clínica inicial dos extratos, não mostrou nenhuma evidência de toxicidade cutânea aguda nos animais e corroborou o efeito anti-inflamatório (modelo de edema auricular), tradicionalmente reconhecido, com resultados próximos aos encontrados com benzidamina nas condições testadas (VARONA, 2013).

O uso tradicional de *M. paniculata* e os resultados dos trabalhos científicos já relatados constituem a fundamentação desta pesquisa, que visa o estudo químico-farmacológico do extrato etanólico das folhas de *M. paniculata* coletada em Cuba, que irá contribuir no estabelecimento de especificações de qualidade, com base na sua composição química e atividade farmacológica. Contribuindo com informação relevante à ação anti-inflamatória *in vivo* e os

prováveis mecanismos de ação, a partir da avaliação de mediadores do processo inflamatório, assim como de possíveis efeitos tóxicos, junto à determinação dos marcadores químicos ativos e o desenvolvimento de um método de análise para esses marcadores, a presente pesquisa estará contribuindo para uso racional, padronização e controle de qualidade adequado dos produtos derivados de *M. paniculata* já incluídos na Lista Básica de Medicamentos de Cuba (MINSAP, 2016),

6. CONCLUSÕES

O EEMp (300mg/Kg) e a fração EFSMp4 (150mg/Kg) apresentaram o melhor efeito anti-inflamatório pelo modelo de edema de pata, mostrando também o menor efeito ulcerogênico na mucosa gástrica dos animais tratados. O modelo de pleurisia não permitiu obter resultados associados à atividade anti-inflamatória, porém mostrou evidências de um provável efeito hemorrágico de EFSMp4.

O procedimento de fracionamento biomonitorado pela atividade anti-inflamatória *in vivo* do extrato etanólico das folhas de *M. paniculata*, conduziu ao isolamento de dois metabólitos majoritários do extrato, a partir da fração bioativa EFSMp4. A partir dos dados da literatura e das análises espectrométricas os metabólitos purificados foram identificados como duas cumarinas previamente relatadas na espécie a murpanidina e o hidrato de meranzina. Também foi proposta a presença da murralongina a partir das análises por CLAE-EM. Esta classe de cumarinas (7-metoxi-8-preniladas) tem mostrado evidências da sua relação com o efeito anti-inflamatório de extratos vegetais.

Quanto à avaliação da atividade antioxidante pelo método do cátion radical ABTS⁺, o EEMp e as frações EFSMp3 e EFSMp4 alcançaram os menores valores de CE₅₀, e foram similares a dados encontrados na literatura para outros extratos vegetais.

Em relação à mutagenicidade o extrato de *M. paniculata* e a fração EFSMp4, induziram potencial mutagênico tanto direta, como indiretamente (sem e com ativação metabólica). Mesmo que atualmente sejam muitas as plantas de uso popular que apresentam efeitos genotóxicos, o uso destas deveria ser feito com mais critério para garantir a segurança do paciente e uso racional de os produtos fitoterápicos elaborados a partir delas. O uso de *M. paniculata* por via tópica poderia então garantir uma maior segurança, porém não deve ser descartada a possibilidade de efeitos negativos na saúde.

A fração EFSMp4, a murpanidina (SPMp1) e o hidrato de meranzina (SPMp2) não apresentaram citotoxicidade significativa nas concentrações desde 2,5 até 40g/mL em macrófagos da linhagem celular utilizada (RAW 264.7). Na quantificação de NO não foi possível estabelecer valores de CE₅₀ para as amostras em ensaio, pois em média não foram observados valores de inibição superiores a 50% para o

experimento. As porcentagens médias de inibição alcançadas na maior concentração testada (40 g/mL) foram 53,96, 30,11 e 8,01% para EFSMp4, SPMp1 e SPMp2, respectivamente. Sendo assim a fração testada garante uma adequada inibição de NO o que pode contribuir positivamente em processos inflamatórios crônicos nos quais a elevada formação de ERO pode gerar até destruição tecidual. Adicionalmente, considerando a porcentagem de inibição das substâncias purificadas da própria fração, poderia ser inferido que são as fundamentais responsáveis pelo efeito observado para EFSMp4.

Em neutrófilos peritoneais de ratos foi observada citotoxicidade para a fração EFSMp4 e a murpanidina (SPMp1) acima de 2,5 e 5 g/mL, respectivamente, e o hidrato de meranzina (SPMp2) apresentou citotoxicidade em todas as concentrações testadas. O efeito observado nos ensaios de função neutrofílica não permite ainda fazer uma correlação adequada das EROS avaliadas, com o processo inflamatório, mas há evidências da contribuição nas etapas iniciais.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados da pesquisa realizada contribuem no conhecimento tanto químico quanto farmacológico da espécie *M. paniculata* coletada em Cuba, mas também levantam uma série de questões relacionadas fundamentalmente com a eficácia e segurança do seu uso na terapia.

A identificação de um número maior de metabolitos presentes no extrato contribuirá a uma melhor caracterização da espécie.

Estudos farmacológicos deveram ser aprofundados com a finalidade de estabelecer o mecanismo pelo qual o efeito anti-inflamatório é exercido e a relação com espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

As evidências de efeitos tóxicos indicam a necessidade de estabelecer uma via de administração segura para fitoterápicos obtidos a partir do extrato etanólico da planta.

Outros extratos, preferencialmente hidroetanólicos, podem ser estudados com a finalidade de determinar se a regulação dos metabolitos majoritários extraídos (cumarinas) influencia nos efeitos tóxicos observados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEDAPO A. A.; FALAYI, O. O.; OYAGBEMI, A. A. "Evaluation of the analgesic, anti-inflammatory, anti-oxidant, phytochemical and toxicological properties of the methanolic leaf extract of commercially processed *Moringa oleifera* in some laboratory animals," **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 26, no. 5, pp. 491–499, 2015.

ALLEN, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8a ed., Porto Alegre: Artmed, 2007.

ARULSELVAN, P.; TANGESTANI FARD, M.; WOAN SEAN, T.; GOTHAI, S.; FAKURAZI, S.; NORHAIZAN, M. E.; KUMAR, S.S. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. Volume 2016, Article ID 5276130, 15 pages. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5276130>

ASHIHARA, H.; WATANABE, S. Accumulation and function of trigonelline in non-leguminous plants. **Natural Product Communication**. v. 9, n. 6, p. 795-8, 2014.

ASSIS, R. P. **Efeito dos solutos urêmicos sobre espécies reativas de oxigênio em sistemas-modelo *in vitro***. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) - Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2012.

BARBOSA, K.; COSTA N, ALFENAS R, ET AL. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n.4, p. 629-643, jul./ago., 2010.

BARBOZA, J.C.S.; SERRA, A.A. Ultra-som (I): influência do ultra-som na química. **Quim Nova** v. 15, p. 302-315, 1992.

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. **Mutation Research**, v. 97, p. 267–281, 1982.

Beckman JS. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxy nitrite. **Chemistry Research Toxicology**, v. 9, p. 836–844, 1996

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira. Volume 1**. 5. ed. Brasília, 2010.

CASADO, C.M.M.; GUTIÉRREZ, Y.G.; RODRÍGUEZ, E.A. Acercamiento al género *Murraya* (Rutaceae) y a la especie *Murraya paniculata* (L) Jack. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v. 16, n. 4, p. 408-418, 2011.

CASADO, C.M.M.; GUTIÉRREZ, Y.G.; VARONA, N.T. Evaluación de la calidad, seguridad y capacidad antioxidante de *Murraya paniculata* L y su tintura. **Revista Cubana de Plantas Medicinales** 2014;19(2):208-217.

CAYMAN CHEMICAL. **Prostaglandin E₂ EIA kit - Monoclonal (Item No. 514010)**. Disponível em: <<https://www.caymanchem.com/pdfs/514010.pdf>>. Acesso em: 02 out 2014.

CHIARI, B. G. Desenvolvimento, avaliação da eficácia e segurança de fitocosmético contendo extrato de *Psidium guajava* L. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2011.

CHOWDHURY, J.U.; BHUIYAN M.N.I.; MOHAMMED Y. Chemical composition of the leaf essential oils of *Murraya koenigii* (L.) Spreng and *Murraya paniculata* (L.) Jack. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 3, n. 2, p. 59-63, 2008.

CIOLI, V.; PUTZOLU, S.; ROSSI, V.; CORZA, B.P.; CORRADINO, C. The role of direct tissue contact in the production of gastrointestinal ulcers by anti-inflammatory drugs in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 50, p. 283-289, 1979.

CRAIG, C.R.; STITZEL, R.E. **Modern Pharmacology with Clinical Applications**, Cistercian Studies Series; Edition 5. Little - Brown, University of Michigan. 1997. Digitized 25 Aug 2008. ISBN 0316159344, 9780316159340. p.832.

DANTAS, I.D.S.; SOARES, C.F.A. Avaliação de parâmetros de extração da *Cinchona Vahl* por métodos farmacopéicos e não farmacopéicos. **Rev. Bras. farmacogn.** v.19, n. 3, 2009.

DARLING, R.L.; ROMERO, J.J.; DIAL, E.J.; AKUNDA, J.K.; ANGENBACH, R.; LICHTENBERGER, L.M. The effects of aspirin on gastric mucosal integrity, surface hydrophobicity, and prostaglandin metabolism in cyclooxygenase knockout mice. **Gastroenterology**, v. 127, n. 1, p. 94-104, 2004

DASH, G.K.; PATRO, C.P.; MAITI, A.K. Anti-inflammatory and analgesic activity of leaf essential oil from *Murraya koenigii* Spreng. **Hamdard Medicus**, v. 47, p. 22-26, 2004.

DESERT-TROPICALS. Orange jasmine. 2002. Disponible en: http://www.desert-tropicals.com/Plants/Rutaceae/Murraya_paniculata.html.

DIAS, L. F. T.; MELO, E. S.; HERNANDES, L. S.; BACCHI, E. M. Atividades antiúlcera e antioxidante *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 309-314, 2009.

FARD, M. T.; P. ARULSELVAN, G.; KARTHIVASHAN, S. K.; ADAM, S. "Bioactive extract from *Moringa oleifera* inhibits the pro-inflammatory mediators in Lipopolysaccharide stimulated macrophages," **Pharmacognosy Magazine**, vol. 11, supplement 4, p. S556–S563, 2015

FAZAL, R.; MUHAMMAD, F.; IRID, K.; INAMULLAH, K.; HUMA, S.; SARFARAZ, K.M. Analgesic Activity of Carbazole Alkaloid from *Murraya paniculata* Linn. (Rutaceae). **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science**, v. 14 n. 3, p. 240-245, 2014.

FERRACIN, R.; DAS, F.; JOÃO, D.S.; VIEIRA, P. Flavonoids from the fruits of *Murraya paniculata*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 3, p. 393-6, 1998.

FERREIRA, P. M. P.; COSTA-LOTUFO, L. V. MORAES, M. O.; BARROS, F. W. A.; MARTINS, A. M. A.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SANTOS, A. G.; PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 83, n. 4, p. 1373-1384, 2011.

FLEMMING, M.; B. KRAUS, A.; RASCLE E. T. "Revisited antiinflammatory activity of matricine in vitro: comparison with chamazulene," **Fitoterapia**, vol. 106, p. 122–128, 2015.

GAUTAM, M.K.; SINGH, A.; RAO, C.V.; GOEL, R.K. Toxicological Evaluation of *Murraya Paniculata* (L.) Leaves Extract on Rodents. **American Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 7, n. 2, p. 62-67, 2012.

GBIF Backbone Taxonomy. **GBIF Secretariat. Checklist Dataset**, 2016. <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2017-06-13.

GENÉ, R. M.; CARTAÑA, C.; ADZET, T.; MARIN, E.; PARELLA, T.; CAÑIGUERAL, S. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*. Identification of its active constituents. **Planta Medica**, v.62, n. 3, p.232-235, 1996.

GERRITSEN, M. E.; CARLEY, W. W.; RANGES, G. E; ET AL. "Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression," **The American Journal of Pathology**, v. 147, n. 2, p. 278–292, 1995.

GHANI, A. **Medicinal plants of Bangladesh: Chemical constituents and uses**. 2 ed. Dhaka, Asiatic Society of Bangladesh, 2003.

GONÇALVES, S.C.F. Farmacotecnica de Fitoterapicos. Departamento de Farmacia. Universidade Federal de Ceará. 2005.

HARISH, P. Herbal drugs. Meeting report. **Current Science**, v.81, n.1, p.15-16, 2001.

IMAI, F.; KINOSHITA, T.; SANKAWA, U. Constituents of the leaves of *Murraya paniculata* collected in Taiwan. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.37, n.2, p.358-362, 1989.

ITO, C.; FURUKAWA, H. The Chemical Composition of *Murraya paniculata*. The Structure of Five New Coumarins and One New Alkaloid and the Stereochemistry of Murrangatin and Related Coumarins. **Journal of Chemical Society Perkin Transactions**, v. 1, p. 2047-55, 1990.

JEONG, J.G.; KIM, Y.S.; MIN, T.Y.; KIM, S.H. Low concentration of 3-carene stimulates the differentiation of mouse osteoblastic MC3T3-E1 subclone 4 cells. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 18-22, 2007.

JINGTAO, Z.; XIAOFENG, Y.; SHAOCHUN, Q.; XUWEN, L.; YONGRI, J.; DAYUAN, S. Protective effect of total flavonoids extracted from the leaves of *Murraya paniculata* (L.) Jack on diabetic nephropathy in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.64, p. 231–237, 2014.

JONES, O. T.; HANCOCK J. T. Assays of plasma membrane NADPH oxidase. **Methods in Enzymology**. New York, v. 233, p. 222-229, 1994.

JORGE, R.E.; RAMIS, R.G.; VANDER, H.Y.; SIMÓ, A.E.F.; SAUCEDO, H.Y.; MONTEAGUDO, U.; MORALES, Y.; HOLGADO, B.; HERRERO, M.J.M. Chemical Composition, Antioxidant Properties and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Murraya paniculata* Leaves from the Mountains of Central Cuba. **Natural Products Communications**, v. 7, n. 11, p. 1527-30, 2012.

KOULOURA, E.; DANIKA, E.; KIM, S.; HOERLÉ, M.; CUENDET, M.; HALABALAKI, M.; SKALTSOUNIS, L.A. Rapid Identification of Coumarins from *Micromelum falcatum* by UPLC-HRMS/MS and Targeted Isolation of Three New Derivatives. **Molecules** 2014, v.19, p.15042-15057.

KESTLING, J.R.; HAUNG, J.; SERENSEN, D. Identification of adulterants in a Chinese herbal medicine by LC-HRMS and LC-MS SPE/NMR and comparative *in vivo* study with standards in a hypertensive rat model. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 3, p. 705-11, 2010.

KINUPP, V. F. Plantas Alimentícias Não Convecionais (PANC) no Brasil: Guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas / Valdely Ferreira Kinupp, Harri Lorenzi. – **São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, 2014. ISBN 978-85-86714-46-7.

KINOSHITA, T.; SHIMADA, M. Isolation and structure elucidation of a new prenylcoumarin from *Murraya paniculata* var. *omphalocarpa* (Rutaceae). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 1, p. 118-20, 2002.

KONG, Y.C.; CHENG, K.F.; CAMBIE, R.C.; WATERMAND, P.G. Yuehchukene: a novel Indole alkaloid with anti-implantation activity. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p. 47-8, 1985.

KUMAR. V.; ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 8a ed. Elsevier Editora, 2010.

KUMAR, M.P.; NATH, B.D.; SAHA, A.; AHMED, M. Analgesic activity of bark of *Murraya paniculata*. Full Length Research paper. **International Journal of Medicine and Medical Science**, v. 3, n. 4, p. 105-8, 2011.

LANE, T.E.; WU-HSIEH, B.A.; HOWARD, D.H. Gamma interferón cooperates with lipopolysaccharide to activate mouse splenic macrophages to an antihistoplasma state. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 4, p. 1468-73, 1993.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O.; NOGU EIRA, T.C.M.L. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA e Petrovick PR (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 2004.

LAPCIK, O.; KLEJDUS, B.; DAVIDOVÁ, M.; KOKOSKA, L.; KUBÁN, V.; MORAVCOVÁ, J. Isoflavonoids in the Rutaceae family: 1. *Fortunella obovata*, *Murraya paniculata* and four Citrus species. **Phytochemical Analysis**, v. 15, n. 5, p. 293-9, 2004.

LORDÉLLO, D. M. S. Disponibilidade hídrica no crescimento, acúmulo e composição química do óleo essencial de *Mentha piperita* e estudo comparativo de atividades antioxidantes em espécies de mentas. Dissertação. (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

LOU, Z.C. General control methods for vegetable drugs. Comparative study of methods included in thirteen pharmacopoeias and proposals on their international unification. WHO/PHARM/80.502. 1980. p. 8-39.

LV, H. N. ET AL. Anti-inflammatory Coumarin and Benzocoumarin Derivatives from *Murraya alata*. **Journal of Natural Products**, v.78, n.2, p. 279-285. 2015.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, p. 173-215, 1983.

MATOS, M. J.; URIARTE, L. S.; ABREU, O. A.; MOLINA, E.; GUARDADO, Y. E. **Coumarins — An Important Class of Phytochemicals**. Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health (Chapter 5). Licensee InTech©. 2015

MATOS, M. J.; VAZQUEZ-RODRIGUEZ, S.; FONSECA, A.; URIARTE, E.; SANTANA, L.; BORGES, F. Heterocyclic Antioxidants in Nature: Coumarins. **Current Organic Chemistry**, v.21, p.311-324, 2017.

McDonagh, M. **Drug Effectiveness Review Project**. Oregon Health & Science University Portland, Oregon. 2010

MENDONÇA, P. S. B. ET AL. β -glucan induces reactive oxygen species production in human neutrophils to improve the killing of *Candida albicans* and *Candida labrata* isolates from vulvovaginal candidiasis. **PLOS ONE**, v. 9, p. 1-14, 2014.

MESQUITA, S.G.; MARTINEZ, M.F.; ROMOFF, P.; FAVERO, O.A.; LIEBER, S.R.; LAGO, J.H.G. Chemical constituents from leaves of *Murraya paniculata* (Rutaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p.563-8, 2008.

MINSAP. Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos. **Ministerio de Salud Pública – ECIMED**, 2014.

MINSAP. Lista Básica de Medicamentos de Cuba. **Ministerio de Salud Pública**, 2016.

MIRANDA, M.M.; CUELLAR, A.C. Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos naturales. Ciudad Habana, p. 25-49, 74-79, 2000.

MITTAL, M.; SIDDIQUI, M. R.; TRAN, K.; REDDY, S. P. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. **Antioxidants and redox signaling**, v. 20, n.7, 2014. DOI: 10.1089/ars.2012.5149

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, p. 29 – 60, 2000.

MOSIHUZZAMAN, M.; CHOUDHARY, M.I. Protocols on safety, efficacy, standardization, and documentation of herbal medicine. **Pure and Applied Chemistry**, v. 80, n. 10, p. 2195-2230, 2008.

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

MUANGNOI, C.; CHINGSUWANROTE, P.; PRAENGAMTHANACHOTI, P.; SVASTI, S.; TUNTIPOPIPAT, S. "Moringa oleifera pod inhibits inflammatory mediator production by lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cell lines," **Inflammation**, v. 35, n. 2, p. 445–455, 2012.

NAGATA, M. Inflammatory Cells and Oxygen Radicals. **Current Drug Targets - Inflammation and Allergy**, v. 4, n. 4, 2005.

NARKHEDE, M.B.; AJMIRE, P.V.; WAGH, A.E. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activity of ethanol extract of *Murraya paniculata* leaves in experimental rodents. Research article. **Internacional Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, 2012.

NEGI, N.; OCHI, A.; KUROSAWA, M.; USHIJIMA, K.; KITAGUCHI, Y.; KUSAKABE, E. Two new dimeric coumarins isolated from *Murraya exotica*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 9, p. 1180-2, 2005.

NGUYEN, M.C.; PHAM, N.K.; HO, V.D.; TRAN, T.H.; BUI, H.T.; NGUYEN, Q.B.; DURANTE, M.; FUSI, F. Vasorelaxing Activity of Two Coumarins from *Murraya paniculata* Leaves. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 4, p. 694–697, 2014.

OLAWORE, N.O.; OGUNWANDE, I.A.; EKUNDAYO, O.; ADELEKE, K.A. Chemical composition of the leaf and fruit essential oils of *Murraya paniculata* (L.) Jack. (Syn. *Murraya exotica* Linn.). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, n. 1, p. 54-56, 2005.

OMS. World Health Organization. Quality Control Methods for medicinal Plant Materials. Geneva. 1998.

OMS. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. China. 2013.

PARROTTA, J.A. Healing plants of Peninsular India. **Wallingford, UK and New York: CABI Publishing**. 2001. p. 917.

QING, W.L.; HONG, C.J.; SHA, S.C.; XUE, M.Z.; LONG, Z.L. Chemical Composition and Toxicity against *Sitophilus zeamais* and *Tribolium castaneum* of the Essential Oil of *Murraya exotica*. **Molecules**, v. 15, p. 5831-9, 2010.

RAHMAN, M.D.A.; HASANUZZAMAN, M.D.; UDDIN, N.; SHAHID I.Z. Antidiarrhoeal and anti-inflammatory activities of *Murraya paniculata* (L.) JACK. **Pharmacologyonline**, v. 3, p, 768-76, 2010.

RE, R. ET AL. Antioxidant activity applying improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

ROCHA, L.G.; ARAGÃO, C.F.S.; LOIOLA, M.I.B.; BEZERRIL, R.A.; PAIVA, N.R.F.; HOLANDA, C.M.C.X.; BRITO, M.E.F. Evaluation of the leishmanicide action of ethanol extracts of *Crotalaria retusa* L. (Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p. 51-56, 2009.

RODANANT, P.; SURARIT, R.; SRICHAN, R.; KORSUWANWONG, S. Cytotoxic and anti-inflammatory activity of some Thai medicinal plants. Full Length Research Paper. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 23, p. 4063-68, 2012.

ROIG, JT. **Diccionario botánico de nombres vulgares cubano**. La Habana, Cuba: Ed. científico técnica, 1988.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancreáticos e estudo de diversos fatores. **Memórias do Instituto Butantan.**, São Paulo, v. 20, p. 315-328, 1947.

ROUT, P.K.; RAO, Y.R.; SREE, A.; NAIK, S.N. Composition of essential oil, concrete, absolute, wax and headspace volatiles of *Murraya paniculata* (L.) Jack flowers. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, p. 352-7, 2007.

SAEED, S.; SHAH, S.; MEHMOOD, R.; MALIK, A. Paniculacin, a new coumarin derivative from *Murraya paniculata*, **Journal of Asian Natural Products Research**, v.13, n.8, p.724-727, (2011). DOI: 10.1080/10286020.2011.586343

SAIED, S.; UDDIN, S. 1', 2'-o-isopropylidene murrangatin from *Murraya paniculata*. **Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, n. 1, p. 13-5, 2008.

SÁNCHEZ, W.M. OBTENCIÓN DE UN GEL A PARTIR DE LA TINTURA DE *Murraya paniculata* (L.) (DROGA SECA). Tesis de Maestría en Tecnología y Control de Medicamentos. 2015. Universidade da Habana, Cuba.

SAWANGJAROEN, N.; PHONGPAICHIT, S.; SUBHADHIRASAKUL, S.; VISUTTHI, M.; SRISUWAN, N.; THAMMAPALERD, N. The anti-amoebic activity of some medicinal plants used by AIDS patients in southern Thailand. **Parasitology Research**, v. 98, p. 588-592, 2006.

SMITH, C. E.; SOTI, S.; JONES, T. A.; NAKAGAWA, A.; XUE, D.; YIN, H. Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs Are Caspase Inhibitors. **Cell Chemical Biology** v.24, p.1–12, 2017 Elsevier Lt.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3ª edição, New York: John Wiley & Sons, 2010. 912 p.

SOGO, T.; TERAHARA, N.; HISANAGA, A.; ET AL. "Anti-inflammatory activity and molecular mechanism of delphinidin 3- sambubioside, a hibiscus anthocyanin," **BioFactors**, vol. 41, no. 1, pp. 58–65, 2015

STILL, W.C.; KAHN, M.; MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. **Journal of Organic Chemistry**, v. 43, n. 14, p. 2923-5, 1978.

SUNDARAM, M.; SIVAKUMAR, K.; BHUVANESHWARI, A.; THIRUMALAI, P. Studies on *in vitro* Antibacterial, Antifungal Property and Antioxidant Potency of *Murraya paniculata*. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 10, n. 10, p. 925-9, 2011.

VARONA, T.N. Estandarización de los parámetros de calidad de la tintura de *Murraya paniculata* (L.) Jack. Tesis de Maestría en Tecnología y Control de

Medicamentos. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. 2013.

VENIL, N.S. Novel approaches for activity based standardization of herbal drugs. Commentary. **Current Science**, v. 98, n. 5, p. 610-11, 2010.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin induced pleurisy in the rat. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 143, n. 3, p. 711-4, 1973.

WINTER, C.; RISLEY, E.; NUSS, G. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544-7, 1962.

WU, L.; WANG, X.; XU, W.; FARZANEH, F.; XU, R. The Structure and Pharmacological Functions of Coumarins and Their Derivatives. **Current Medicinal Chemistry**, 16, 4236-4260, 2009.

XIMENES, V. F.; PAINO, I. M. M.; FARIA-OLIVEIRA, O. M. M.; FONSECA, L. M.; BRUNETTI, I.L. "Indole ring oxidation by activated leukocytes prevents the production of hypochlorous acid," **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 11, pp. 1575–1583, 2005.

YADAV, N.P.; DIXIT, V.K. Recent approaches in herbal drug standardization. **International Journal of Integrative Biology**, v. 2, p. 195-203, 2008.

ZHANG, J.Y.; LI, N.; CHE, Y.Y.; ZHANG, Y.; LIANG, S.X.; ZHAO, M.B.; JIANG, Y.; TU, P.F. Characterization of seventy polymethoxylated flavonoids (PMFs) in the leaves of *Murraya paniculata* by on-line high-performance liquid chromatography coupled to photodiode array detection and electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 5, p. 950-61, 2011.

ZHOU, J.; CHAN, L.; ZHOU, S. Trigonelline: A Plant Alkaloid with Therapeutic Potential for Diabetes and Central Nervous System Disease. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 3523-3531, 2012.