

CARINA DENNY

**ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DO ÓLEO DE
SUCUPIRA**

***Pterodon pubescens* Benth.**

Leguminosae-Papilionoideae

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção de
grau de mestre em Odontologia, área de
Concentração: Anestesiologia, Farmacologia
e Terapêutica.

Piracicaba
2002

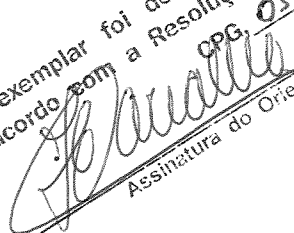
CARINA DENNY

**ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DO ÓLEO DE
SUCUPIRA**

Pterodon pubescens Benth.

Leguminosae-Papilionoideae

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção de grau de Mestre em Odontologia – Área de concentração: Farmacologia, Terapêutica e Anestesiologia.

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CPG-035/83
CPG, 01/08/2002

Assinatura do Orientador

Orientador: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Banca examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Dias Andrade

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Profa. Dra. Mary Ann Foglio

Piracicaba
2002

Ficha Catalográfica

D428a Denny, Carina.
Atividade antiinflamatória do óleo de sucupira : *Pterodon pubescens* Benth. *Leguminosae-Papilionoideae*. / Carina Denny. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2002.
xviii, 101p. : il.

Orientador : Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Antiinflamatórios. 2. Plantas medicinais. 3. Óleo vegetal. I. Carvalho, João Ernesto de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 26 de Fevereiro de 2002, considerou a candidata CARINA DENNY aprovada.

1. Prof. Dr. JOÃO ERNESTO DE CARVALHO

2. Profa. Dra. MARY ANN FOGLIO

3. Prof. Dr. EDUARDO DIAS DE ANDRADE

00242656

À minha Gabriela e ao Mauro, porque tudo o que eu possa realizar nesse mundo, ainda será pequeno quando comparado ao amor que sinto por vocês, dedico-lhes este trabalho.

Aos meus pais, Odair e Rosali, pelo dom da vida.
Por estarem sempre ao meu lado
 incondicionalmente, em todos os momentos de
minha vida e pelo amor e incentivo sempre
constantes, dedico-lhes este trabalho.

Amo vocês.

Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, pela
oportunidade de trabalho, seriedade, profissionalismo
e amizade que conquistamos nestes anos.
Por tudo, agradeço e ofereço-lhe este trabalho.

Agradecimentos

Ao CPQBA/UNICAMP, pelo oferecimento de sua infraestrutura, o que proporcionou a plena execução deste trabalho,

Ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Odontologia da UNICAMP, pela acolhida,

À Dra. Mary Ann Foglio, pela orientação do trabalho fitoquímico, além da consideração, apoio e inestimável amizade que sempre dispensou a mim,

À Alik Teixeira; à Maria Carolina Bayer e ao Ricardo Rodrigues pela colaboração indispensável na realização dos experimentos e inestimável amizade,

À Sirlene e ao Orlando, funcionários do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA / UNICAMP, pela amizade e apoio técnico sempre presentes,

À Ana Possenti, pela colaboração indispensável na realização dos experimentos, além do grande apoio e amizade,

À Márcia Aparecida Antônio e a Luciana Konecny Kohn, pelo apoio técnico prestado, colaboração nos experimentos, doação de conhecimento e amizade, sempre desinteressada e sincera,

À Erica Biggetti e Patrícia Dias pelo companheirismo de todos os momentos, colaboração nos experimentos e grande amizade,

À Cármen Queiroga, Rodney, Erika, André, Gabriela, Alexandra, pela colaboração no trabalho fitoquímico além da agradável convivência,

Aos professores e funcionários do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP, que de alguma forma colaboraram para a obtenção deste título,

À Elisa, secretária do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP, pela atenção dispensada à mim e a todos os alunos deste departamento,

À Eloisa, bibliotecaria da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP, por sua atenciosa ajuda,

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Fundação de Apoio ao Ensino,

A todos os amigos que de alguma forma, colaboraram no pleno desenvolvimento deste trabalho.

É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."

Martin Luther King

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE BIBLIOGRÁFICA	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
4. RESULTADOS	41
5. DISCUSSÃO	71
6. CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

RESUMO

Pterodon pubescens Benth. (Leguminosae, Papilionoidea) conhecida como sucupira branca é utilizada na medicina popular como antiinflamatório, tônico e depurativo. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antiinflamatória; antinociceptiva a toxicidade aguda do óleo das sementes e identificar a fração ativa. O óleo foi obtido por prensagem das sementes e centrifugação. As frações foram obtidas através de cromatografia em coluna, monitoradas por cromatografia de camada delgada e identificadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Os modelos de edema de pata produzidos por carragenina, histamina e bradicinina e edema de orelha produzido por óleo de croton foram utilizados na avaliação da atividade antiinflamatória. A atividade antinociceptiva foi avaliada através do teste de analgesia induzida por calor e do teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético. A toxicidade do óleo de sucupira foi avaliada também em modelo animal, por meio de análise anatomohistopatológica, verificação dos níveis de glicose e do peso corporal diário. A atividade antiproliferativa foi avaliada em cultura de células tumorais humanas. A fração ativa revelou a presença majoritária de compostos terpênicos. O óleo de *Pterodon pubescens* e a fração rica em terpenos inibiram o edema de pata induzido por carragenina. Em ratos adrenalectomizados o óleo manteve atividade antiedematogênica eliminando a exclusividade da atividade antiinflamatória por corticóides endógenos. Nos modelos de edema de pata induzido por histamina e bradicinina o óleo de *P. pubescens* reduziu a formação de edema. Na dermatite provocada pela aplicação de óleo de croton, o óleo de *P. pubescens* também inibiu a formação de edema. No modelo de nocicepção químico, o óleo de *P. pubescens* inibiu o número de contorções abdominais pelo ácido acético. O efeito antinociceptivo foi confirmado no teste da placa quente, onde o tratamento com o óleo de *P. pubescens* ampliou a reatividade ao estímulo térmico. O óleo e a fração ativa apresentaram atividade antiproliferativa concentração-dependente, apresentando citotoxicidade na maioria das concentrações estudadas. Houve um aumento significativo da glicemia com o óleo de *P. pubescens* na dose de 30mg/kg; um aumento do peso corporal dos animais na dose de

30mg/kg e uma diminuição nas doses de 100 e 300mg/kg; a análise anatomohistopatológica também revelou toxicidade. Os resultados indicam que o óleo de *P. pubescens* apresenta atividade antiinflamatória e antinociceptiva e que os terpenos parecem ser responsáveis por essa atividade. Apresenta toxicidade na dose efetiva como antiinflamatória e antinociceptiva após 14 dias de tratamento e atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais, provavelmente relacionada a inibição de COX-2.

ABSTRACT

Pterodon pubescens Benth.(Leguminosae, Papilionoidea), popularly known as "sucupira branca" is widely used by folk medicine as an anti-inflammatory. The present investigation was performed to examine the anti-inflammatory, antinociceptive activity, and the subacute toxicity evaluation of *P. pubescens* seed oil and identify the active fraction. The seed oil was extracted by pressure and centrifugation. The fractions were obtained by column chromatography, monitored by thin layer chromatography and analyzed by gas chromatography with mass detection. The anti-inflammatory activity was evaluated by paw edema induced by carrageenin, histamine, bradykinin and ear croton oil edema. The antinociceptive activity was demonstrated employing hot plate and acetic acid-induced abdominal constriction writhing model. The toxicological analysis involved anatomical and histopathological; glucose level and weight body examination in animal models. The antiproliferative activity was examined in human cell culture. The terpenoids is the main class of compounds identified in the active fraction. The treatment with *P. pubescens* seed oil and the enriched terpenoids fraction, inhibited edema formation induced by carragenin . In adrenalectomized rats the seed's oil showed antiedematogenic activity, rejecting the anti-inflammatory activity exclusively by endogenous corticoids. The seed's oil reduced paw edema induced by histamine and bradykinin, as well as by ear croton oil induced edema. The seed's oil inhibited the number of acetic acid-induced abdominal contractions. The antinociceptive effect was confirmed by the hot plate test, where the treatment with the seed's oil increased reaction time period for thermal stimulus. Administration of 30mg/kg doses increased glucose levels and body weight. Whereas 100 and 300mg/kg doses of seed's oil decreased these parameters. The anatomical and histopathological examination indicated toxicity. The oil and the active fraction showed antiproliferative activity related to concentration, demonstrating cytotoxicity in the highest concentration tested. Based on these results the seed's oil showed toxicity in the effective dose after 14 days of treatment and antiproliferative activity in the tumoral cell culture. We suggest that the anti-inflammatory activity is due to the presence of terpenic compounds.

LISTA DE ABREVIATURAS:

AA:	Ácido araquidônico
AINE:	Antiinflamatório não esteroideal
COX:	Cicloxigenase
cPLA2	Fosfolipase A2 citosólica
DAG	diacilglicerol
(EGF)- α	Fator de crescimento epidermal
HETE	Ácido 15-hidroxi-eicosatetraenóico
HGF	Fator de crescimento do hepatócito
HPETE	Ácidos-hidroxiperoxieicosatetraenoicos
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
IP3	Trifosfato de inositol
iPLA2	Fosfolipase A2 cálcio-independente
Lyso-PL	lisofosfolipídeos
LPS	Lipopolissacarídeos
LTS	leucotrienos
PG2	Prostaglandina G2
PGH2	Prostaglandina H2
PGE2	Prostaglandina E2
PGI2	Prostaglandina I2
PG	Prostaglandina
PL	Fosfolipídeos
PLA2	Fosfolipase A2
sPLA2	Fosfolipase A2 secretória
SFB	Soro fetal bovino
TXA2	Tromboxano A2

1. INTRODUÇÃO

Até meados do século XX as plantas medicinais e seus derivados constituíam a base da terapêutica medicamentosa, quando a síntese química, que teve início no final do século XIX, iniciou uma fase de desenvolvimento vertiginoso. Atualmente cerca de 50% dos medicamentos utilizados são de origem sintética e cerca de 25% são de origem vegetal, isolados diretamente ou produzidos por síntese partindo-se de um precursor vegetal. No entanto, a última década registrou um aumento expressivo no interesse em drogas derivadas de espécies vegetais, evidenciado pelo crescimento de publicações dessa linha de pesquisa nas principais revistas científicas das áreas de química e farmacologia (Calixto, 2000).

Algumas estimativas revelam a existência de aproximadamente 250.000 espécies de plantas superiores em todo o mundo. Entretanto, dados disponíveis revelam que apenas 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal. Portanto, essa flora representa um potencial enorme para obtenção de novas moléculas para a descoberta de novos medicamentos (Hamburger et al., 1991; Cragg et al., 1999).

Devido a existência desse imenso campo de pesquisa ainda pouco explorado, a partir de uma pesquisa bibliográfica sobre estudos etnobotânicos e da viabilidade em realizar determinados experimentos em nosso laboratório, selecionamos uma espécie vegetal como objeto de estudo.

As sementes de *Pterodon pubescens* tem sido extensamente utilizadas pela população como antiinflamatório. Vários compostos já foram identificados, mas nenhum deles foi ainda relacionado à essa atividade. Alguns deles mostraram eficácia contra shistomaniose, comprovada em diversos modelos experimentais.

A ação antiinflamatória do extrato hexânico das sementes do óleo de *P. pubescens* foi estudada por Carvalho e colaboradores em 1999, sem entretanto identificar a fração ou compostos ativos responsáveis por essa atividade.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a ação antiinflamatória, antinociceptiva e antiproliferativa do óleo das sementes de *Pterodon pubescens*; identificar a fração responsável por essa atividade e iniciar o estudo da toxicidade aguda.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em 1997, estimava-se que o mercado mundial de produtos fitoterápicos era de 10 bilhões de dólares, com um crescimento anual de 6,5%. China e Índia, possuem atualmente uma indústria de produtos naturais bem estabelecida; países Latino americanos investem em programas de pesquisa de plantas medicinais; na padronização e regularização de seus produtos; seguindo ao exemplo de países europeus como, França e Alemanha (Rates, 2001).

Muitos fatores contribuíram para o aumento do retorno do interesse na pesquisa de plantas medicinais. Um desses fatores foi a descoberta de drogas eficazes no combate ao câncer. O NCI (National Cancer Institute, USA) tem testado mais de 50 000 amostras de plantas para atividade anti-HIV e 33 000 amostras para atividade antitumoral (Rates, 2001). Outro fator, foi o interesse nos estudos sobre a biodiversidade acoplados à preservação das espécies. Da mesma forma a falta de acesso da maioria da população aos medicamentos modernos faz com que buscas alternativas mais baratas sejam oferecidas (Filho e Yunes, 1998; Calixto, 2000).

Por outro lado, a falta de informação e o mau uso dos medicamentos geralmente provocam o aparecimento de reações colaterais graves ou então o insucesso do tratamento, causando descrença em sua eficácia. Acompanhando esses fatos, o ressurgimento de práticas alternativas (cromoterapia, florais, homeopatia, medicina

chinesa, medicina ayurveda e outros) de eficácia duvidosa, muitas vezes prometem milagres sem ocorrência de efeitos colaterais, colaborando com a disseminação da falsa crença na absoluta segurança de uso dos produtos naturais (Alice et al.,1995; Carvalho, 1999).

O estudo de plantas medicinais constitui um processo multidisciplinar. Entre as ciências bases envolvidas estão a botânica, a química e a farmacologia, além da antropologia, da agronomia, da biotecnologia e da química orgânica que também são de extrema importância . A pesquisa, requer investigações clínicas efetivas, pois embora uma espécie possa conter centenas de metabólitos secundários, apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica (Phillipson, 1999; Filho e Yunes, 1998; Rates, 2001).

O aperfeiçoamento dos processos de purificação e isolamento aliados às técnicas de espectrometria de massas, espectroscopia no ultravioleta e infra-vermelho e ressonância magnética nuclear têm possibilitado a elucidação de estruturas moleculares complexas de constituintes naturais (Calixto, 2000; Chang, 2000). Além disso, o desenvolvimento de métodos de manejo, cultivo e melhoramento genético representam uma nova tendência no estudo de plantas medicinais, pois asseguram maior qualidade e eficácia aliadas à manutenção do equilíbrio dos ecossistemas (Calixto, 2000).

O Cerrado compreende 25% do território brasileiro e caracteriza-se pela baixa fertilidade do solo e predomínio de uma longa estação seca, que condicionam o

desenvolvimento de um tipo peculiar de vegetação, muito atraente pela riqueza em espécies medicinais e pela beleza dos aspectos estéticos que apresenta (Ferri, 1969).

A viabilidade do potencial medicinal das espécies do Cerrado passa, em primeiro plano, pelo processo de resgate de informações, identificação das espécies existentes e sua disponibilidade para pesquisa. A partir do conhecimento empírico tradicional destes vegetais, descobertas benéficas à medicina têm sido feitas. Mors et al. (1966) detectaram uma ação profilática do óleo dos frutos de *Pterodon pubescens* Benth. no combate a infecção de cercárias de *Schistosoma mansoni*. Outro exemplo são as furanocumarinas obtidas da *Brosimum gaudichaudii*, utilizadas no tratamento do vitiligo (Pozetti & Bernardi, 1971).

A espécie vegetal, *Pterodon pubescens* Benth.- sinonímia botânica - *Pterodon emarginatus* Vog. é uma árvore da família das *Leguminosae-Papilionoideae*. Conhecida popularmente como faveiro, sucupira-branca, fava-de-sucupira, sucupira ou sucupira-lisa podemos encontrá-la principalmente no cerrado dos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Mato Grosso do Sul. Esta espécie atinge de 8-16 metros, com tronco de 30-40 centímetros de diâmetro; possui folhas pinadas, com 20-36 folíolos de 3-4 centímetros de diâmetro (Lorenzi, 1998).

Um estudo etnobotânico em 30 cidades do interior de Minas Gerais relatou o uso popular da sucupira, *Pterodon pubescens* Benth. no tratamento do reumatismo, dores de garganta, problemas da coluna e como tônico e depurativo (Carvalho, 1999).

O gênero *Pterodon* compreende 4 espécies nativas do Brasil: *P. abruptus* Benth., *P. apparucuiri* Pedersoli, *P. pubescens* Benth. (*P. emarginatus* Vog.) e *P. polygalaeiflorus* Benth. O estudo dessas espécies foi motivado pela comprovação da ação anti-cercariana do óleo de *P. emarginatus* Vog. e de outras espécies, em adição à atividade antimicrobiana *in vitro* também obtida com o óleo de *P. emarginatus* Vog. (Carvalho, 1999).

Em 1967, o 14,15-epoxigeranilgeraniol foi isolado de *Pterodon pubescens* Benth., provando ser um eficiente agente quimioprolático em shistomaniose. Em 1970, novos diterpenos foram obtidos por Mahjan e Monteiro, e no mesmo ano, terpenos foram isolados por Fascio e colaboradores (Carvalho,1999).

A partir de um estudo químico de Leguminosas brasileiras, foram isolados isoflavonóides de *Pterodon pubescens* Benth. Continuando o estudo da espécie, novos diterpenos foram isolados e mostraram ser eficientes no tratamento da shistomaniose (Carvalho,1999).

Quatorze diterpenos furânicos foram identificados e isolados dos frutos do gênero *Pterodon*. O diterpeno furânico - Vouacapan (6α -, 7β -dihydroxyvouacapan-17 sodium oate), foi isolado da espécie *P. polygalaeiflorus* Benth. e sua atividade antiinflamatória demonstrada através do modelo de pata induzido por carragenina (Carvalho,1999). A atividade antinociceptiva do Vouacapan também foi estudada por Duarte e colaboradores em 1996, sugerindo uma possível ação catecolaminérgica desse composto.

A atividade antiinflamatória do extrato hexânico de *Pterodon pubescens* Benth. foi estudada por Carvalho e colaboradores sugerindo que a atividade antiinflamatória do extrato hexânico estaria relacionada a inibição da liberação de prostaglandinas e outros mediadores envolvidos no sistema de cininas. Sugere ainda que, a atividade antiinflamatória do extrato poderia estar relacionada à presença de compostos terpênicos (Carvalho,1999).

Recentemente, um estudo do extrato hidroalcoólico das sementes de *Pterodon pubescens* Benth. confirmou seus efeitos em modelos de artrite experimental e a ausência de toxicidade subaguda (Coelho et al., 2001).

ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DA INFLAMAÇÃO

A resposta inflamatória é um processo defensivo multifatorial do organismo em resposta a lesões por infecção ou estímulos nocivos: químicos, físicos e biológicos (Cicala e Cirino, 1998). Os sintomas característicos da inflamação incluem dor, elevação da temperatura, rubor e edema (Gahmberg et al., 1998).

Os estímulos inflamatórios, atuando sobre os tecidos, induzem a liberação de mediadores químicos que, após interação com receptores existentes nas células da microcirculação e nos leucócitos, produzem alterações hemodinâmicas, exsudação de plasma e células sanguíneas para o interstício. A atividade do agente inflamatório e/ou das células do exsudato pode produzir lesões nos tecidos, inclusive levando à necrose. Cessada

a ação do estímulo inflamatório, reduz-se a liberação dos mediadores, a microcirculação recupera o estado hemodinâmico original e o líquido e as células exsudadas voltam à circulação sanguínea geralmente pelos vasos linfáticos. Se há necrose, o tecido destruído é fagocitado e logo depois surgem os fenômenos de cicatrização ou regeneração (Lima e Bogliolo, 1994).

A reação inflamatória consiste em reações inatas e em reações imunologicamente específicas. As reações inatas podem ser divididas em eventos vasculares e em eventos celulares. Durante os eventos vasculares são gerados mediadores químicos pelas células, sendo que esses mediadores regulam os eventos vasculares e celulares (Sim, 1994). Já a resposta imunologicamente específica torna a resposta defensiva ao hospedeiro não apenas mais eficaz, como também mais específica ao patógeno invasor, sendo os linfócitos B as células-chave para produção de anticorpos, e os linfócitos T importantes na indução da resposta imune (Roitt, 1994).

Os Eventos Vasculares envolvem uma vasodilatação arteriolar que aumenta o fluxo sanguíneo no tecido inflamado, e a exsudação de líquido (edema), através da ação de agentes que elevam a permeabilidade vascular como os autacóides: bradicinina, histamina e Fator de Ativação Plaquetária (PAF) (Vane e Botting, 1995). Esse exsudato líquido contém vários mediadores que influenciam as células adjacentes e os próprios vasos sanguíneos.

Estes incluem os componentes das cascatas enzimáticas dos sistemas complemento, fibrinolítico e de coagulação. A ativação da cascata do sistema complemento por

microorganismos gera componentes (C1 a C9) que promovem a liberação de mediadores inflamatórios de mastócitos (Coltren, 1992) e/ou fatores quimiotáticos para leucócitos (Okabe et al., 2000), facilitando também a fagocitose (Sim, 1994).

O endotélio vascular participa do controle da homeostase através de mecanismos que envolvem a síntese e liberação de fatores pró-coagulantes e anticoagulantes. Quando há dano no endotélio como na inflamação, o balanço entre os fatores pró e anticoagulantes é perdido e predomina o estado pró-coagulante. A ativação dos sistemas da coagulação e fibrinolítico promove a liberação de trombina e fibrina. A trombina catalisa a conversão de fibrinogênio em fibrina, aumenta a permeabilidade vascular e promove a migração de neutrófilos (Cirino e col., 2000). A conjugação desses fenômenos resulta na interrupção da perda sanguínea, com formação de um tampão homeostático pela fibrina que bloqueia a saída de sangue.(Nemerson, 1988).

HISTAMINA

A histamina (β -aminoetilimidazol), sintetizada a partir da histidina pela L-histidina descarboxilase, é armazenada nos mastócitos, basófilos e plaquetas. A histamina é liberada por traumatismos, por reações imunes mediadas pela imunoglobulina E (IgE), pelos componentes do sistema complemento C3a -C5a, pela proteína liberadora de histamina derivada de leucócitos, pelas interleucina-1 e interleucina-8 (Schwartz, 1994) e pelos neuropeptídeos como a substância P (Okabe et al., 2000).

A histamina tem papel importante na fase inicial da resposta inflamatória, como na vasodilatação, permeabilidade do endotélio microvascular e aumento de adesão de neutrófilos às células endoteliais. Essas condições inflamatórias são demonstradas principalmente pela ligação com receptores específicos na superfície celular. São três os subtipos de receptores histamínicos - H₁, H₂ e H₃ -(Izzo et al., 1998). Os receptores H₂ estão localizados nas células da musculatura vascular (Eckly, 1997), já os receptores H₁ situam-se nas células endoteliais e sua estimulação leva à formação de substâncias vasodilatadoras como o óxido nítrico (Jansen e Olesen, 1997), enquanto que os receptores H₃ aparentemente apresentam localização no Sistema Nervoso Central (SNC) (Izzo et al., 1998).

CININAS

Em 1949, Rocha e Silva e colaboradores descreveram a existência de uma nova substância relaxadora, liberada no plasma pela ação do veneno da cobra *Bothrops jararaca* ou pela tripsina, que foi chamada de bradicinina (BK) (Calixto et al, 2000).

Desde então, a bradicinina tem sido relacionada com muitos processos biológicos como no controle da pressão, na contração e no relaxamento do músculo liso, na resposta inflamatória e na indução de nocicepção e hiperalgesia. Acredita-se que a bradicinina está também envolvida em estados patológicos como asma, alergia, artrite reumatóide e pancreatite. Na inflamação, as cininas produzem vasodilatação, aumentam a permeabilidade vascular e a migração de células, induzem hiperalgesia e dor (Calixto et al., 2000; Regoli et al., 1998) .

As cininas são formadas a partir dos cininogênios (substratos protéicos endógenos), pela ação da calicreína protease, no plasma e em tecidos periféricos (Linardi et al., 2000). São degradadas por um grupo de enzimas genericamente chamadas de “cininases”. As cininas ligam-se aos receptores específicos - B₁ e B₂. O receptor B₂ é acoplado às proteínas G e ativa a fosfolipase A₂ / fosfolipase C. A ativação da fosfolipase C provoca aumento do trifosfato de inositol (IP₃), do cálcio citosólico e do diacilglicerol (DAG) e, portanto, da atividade da proteína C cinase. A fosfolipase A₂ induz a formação do ácido araquidônico e consequente formação de prostaglandinas (Calixto et al., 2000 ; Regoli et al., 1998).

As cininas, também parecem estar diretamente envolvidas na inflamação neurogênica, através da ativação das fibras C (fibras sensitivas aferentes), que conduzem o estímulo algico e consequente produção de neuropeptídeos como a substância P (Calixto et al., 2000).

O receptor B₂ é constitutivo e medeia a maioria de efeitos fisiológicos das cininas, sendo a bradicinina o ligante de maior afinidade. Com apenas algumas exceções, o receptor B₁ não é expresso em nível significativo em tecidos normais, mas sua indução ocorre rapidamente em condições patológicas ou pela ação de agentes pró-inflamatórios como citocinas ou lipopolissacarídeos. A bradicinina, ativando os receptores B₂, estimula a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaciclina I₂ (PGI₂) e a liberação de citocinas (interleucina-1 β , interleucina-6, interleucina-8 e Fator de necrose tumoral - α). Por sua vez, as citocinas ligam-se ao receptor B₁ (Calixto et al., 2000).

EICOISANÓIDES

O ácido araquidônico (AA), um ácido graxo presente na dieta, pode sofrer conversão metabólica em uma série de produtos com potentes efeitos biológicos. Entre esses, as prostaglandinas (PG), o tromboxano A_2 (TXA_2) e ácido 15-hidroxi-eicosatetraenóico (HETE) são coletivamente referidos como eicosanóides. Intensas pesquisas tem sido realizadas na regulação da produção dos eicosanóides, pois, os metabólitos dos ácidos graxos modulam diversos processos fisiológicos como a ovulação, resposta imune e a mitose (Kam e See, 2000). A excessiva produção de eicosanóides leva a processos patológicos incluindo inflamação, alergia, câncer e doenças cardiovasculares (Yedgar et al., 2000; Myers e Ghosh, 1999).

O AA é liberado da membrana fosfolipídica pela ação citoplasmática da fosfolipase A_2 (PLA_2), família de enzimas que hidrolisa os fosfolípidos (PL) de membrana para produzir lisofosfolípidos (Lyso-PL) e ácidos graxos livres (Kam e See, 2000). A família de PLA_2 consiste em dois tipos de enzimas: uma secretória ($sPLA_2$) e uma intracelular, esta última se subdivide em intracelular citosólica ($cPLA_2$) e a intracelular cálcio-independente ($iPLA_2$). A $sPLA_2$ requer cálcio para exercer sua ação enzimática e não exibe preferência por fosfolípido de membrana, é proeminente em processos patológicos, como a inflamação. A $cPLA_2$ é uma enzima específica para o ácido araquidônico, regulada pelo cálcio, e portanto com papel importante na produção dos metabólitos do ácido araquidônico (Yedgar et al., 2000). A $cPLA_2$ é descrita em plaquetas, macrófagos e neutrófilos (Garcia-Pastor et al., 1999). Já a $iPLA_2$ é cálcio independente, não tem especificidade por ácido

graxo e está envolvida na manutenção da composição dos PL de membrana (Yedgar et al., 2000).

A inibição da PLA₂ tem sido solução para o tratamento de diversas condições patológicas, limitando assim a produção de eicosanóides. Sua inibição resultaria na supressão de diversas classes de lipídios pró-inflamatórios (PGs, Leucotrienos (LTs), PAF, Lyso-PL.). Por esse motivo podem ser considerados como estratégia terapêutica no tratamento de doenças inflamatórias (Yedgar et al., 2000).

A PLA₂ mobiliza o ácido araquidônico dos fosfolipídios celulares, sendo possível sua metabolização pela ciclooxigenase (COX), ou também chamada de PGH sintetase, em Prostaglandina G₂ (PG₂), PG₂ é convertida em PGH₂ por uma reação de peroxidação pela enzima COX. A PGH₂ por sua vez, é convertida em outras PGs, prostaciclina e tromboxanos. (Kam e See , 2000). As drogas antiinflamatórias agem reduzindo a síntese de PG através da inibição da enzima ciclooxigenase (COX) (Brooks e O Day, 2000).

Existem duas isoformas de cicloxigenases; COX1 e COX2, sendo essas 60% idênticas ao nível de proteínas, e ambas catalizam concomitantemente a síntese do primeiro grau de prostaglandinas (a conversão de AA em PGH₂). (Langenbach et al, 1999). A COX-1, é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos, sendo responsável pela produção de prostaglandinas que protegem a mucosa gástrica e o rim e pela homeostase vascular. A ação citoprotetora gástrica é regulada pelos mediadores endógenos PGI₂ e PGE₂, que

reduzem a secreção ácida, aumentam a secreção de muco e bicarbonato e produzem vasodilatação na mucosa gástrica (Soslow et al., 2000; Kam e See, 2000).

A COX-2 é induzível por uma variedade de estímulos intracelulares e extracelulares como mediadores inflamatórios, citocinas, lipopolissacarídeos (LPS), fator de crescimento epidermal (EGF)- α , oncogenes e carcinogenes. Além disso, também tem demonstrado inibir a apoptose. (Soslow et al., 2000; Kam e See, 2000).

As prostaglandinas exercem seus efeitos biológicos por meio da ligação de receptores da superfície celular, o qual é mediado via transdução do AMPc pela proteína G. Os eicoisanóides apresentam várias ações: PGE₂ é vasodilatador e também apresenta efeito citoprotetor da mucosa gástrica e a PGI₂ (Prostaciclina) é um poderoso agente antiagregante plaquetário. Além disso, as prostaglandinas estão envolvidas no extravasamento do plasma (edema) e na dor através da ação dos nociceptores da dor. A PGE₂ potencia a atividade algica da bradicinina e outros autacóides e ainda estimula a produção de esteróides na adrenal, liberando corticóides que participam do processo inflamatório (Cirino, 1998).

As lipoxigenases são enzimas citosólicas que catalisam a oxigenação dos ácidos graxos (ácido araquidônico) em hidroperóxidos lipídicos. O ácido araquidônico é transformado em ácidos-hidroxi-peroxieicosatetraenóicos (HPETE), que são intermediários instáveis análogos a PGG ou PGH e são metabolizados por várias enzimas, entre elas a enzima 5-lipoxigenase produz a síntese dos leucotrienos. Além de poderosos agentes

quimiotáticos, os leucotrienos aumentam a permeabilidade vascular, produzem vasodilatação e contração da musculatura lisa intestinal e bronquial (Lima e Bogliolo, 1994).

O leucotrieno B₄ é um potente quimiotático de leucócitos polimorfonucleares, promovendo a aderência de neutrófilos (Belch e Hill, 2000) sendo produzido pela 5-lipoxigenase nos neutrófilos, monócitos e macrófagos (Folch et al., 1998). A habilidade dos leucócitos polimorfonucleares de se aderirem ao endotélio é mediada por várias moléculas de adesão, como a E-selectin, presente no tecido endotelial (Belch e Hill, 2000).

ANTIINFLAMATÓRIOS:

ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS

Há mais de 3500 anos, no Egito, recomendava-se a aplicação de um decocto de folhas secas de "*myrtle*", no abdômem e nas costas contra dores reumáticas. Hipócrates, recomendava sucos de uma determinada árvore no tratamento de doenças oculares e raízes de *willow* para aliviar as dores do parto e como antitérmico. No ano 30 a.C., Celsus descreveu os 4 sinais clássicos da inflamação (rubor, calor, dor e tumor) e também utilizava extratos de *willow* para aliviar os sintomas. Na China antiga e em outras regiões da Ásia, diversas plantas eram utilizadas no alívio da dor e inflamação. Todos esses remédios continham salicilatos (Vane e Bottin, 1998; Simmons e Wagner, 2000).

As ações da aspirina são conhecidas há mais de 100 anos. Com o passar do tempo, diversas outras drogas foram sendo descobertas como possuindo algumas, ou todas as propriedades terapêuticas da aspirina (antipirético, antiinflamatório e analgésico). Drogas como acetaminofeno, fenilbutazona e mais recentemente fenamantos, indometacina e naproxeno; devido à similaridade de suas ações terapêuticas tendiam a ser reunidas em um grupo de drogas conhecido como "aspirina-like". Por serem claramente distintos dos glicocorticóides, esses fármacos (apesar de apresentarem estruturas químicas diferentes) também são chamados de Antiinflamatórios Não Esteroidais ou AINES (Vane e Bottin, 1998).

Os AINES movimentam atualmente, um mercado de 13 bilhões de dólares por ano (Brooks e Day, 2000). Esse grupo de drogas impedem a formação de prostaglandinas, através da inibição da cicloxigenase (Vane e Bottin, 1998).

Os AINES compartilham vários efeitos colaterais indesejáveis como; o bloqueio da agregação plaquetária, a inibição da motilidade uterina, reações de hipersensibilidade e entre os mais comuns; a toxicidade gastrointestinal e renal. (Brooks e O Day., 2000).

A inibição da COX1 impede a síntese de prostaglandinas (especialmente PGI₂ e PGE₂) que funcionam como substâncias protetoras da mucosa gástrica (inibem secreção ácida, aumentam o fluxo sanguíneo da mucosa e estimulam a secreção de muco citoprotetor do intestino) e regulam o fluxo sanguíneo renal (Brooks e O Day., 2000).

Na última década foram desenvolvidos inibidores seletivos da COX-2, com objetivo de diminuir os efeitos indesejáveis da inibição da COX-1, no entanto, a experiência clínica com esses inibidores é ainda insuficiente (Yedgar et al., 2000).

Os antiinflamatórios não esteroidais (AINES) tradicionais são utilizados no alívio de dor e inflamação nas doenças musculoesqueléticas e, mais recentemente, no tratamento do Alzheimer e do câncer (Yedgar et al., 2000).

GLICOCORTICÓIDES

Os glicocorticóides são considerados potentes drogas antiinflamatórias e imunossupressoras, agindo em quase todos os tipos de células, formam interações complexas com a expressão e a função de variados mediadores. As prostaglandinas tem sido consideradas há muito tempo como alvo de ação do glicocorticóides. Especialmente PGE2 E PGI2 que possuem propriedades pró-inflamatórias, aumentam a permeabilidade vascular, causam vasodilatação e hiperalgesia. Diferente dos antiinflamatórios não esteroidais (AINES), glicocorticóides não inibem diretamente nenhuma enzima que sintetiza prostaglandinas. Ou seja, a ação dessas drogas depende de sua interferência com biossíntese de proteínas. Consequentemente, a síntese de prostaglandinas basais é duramente afetada por glicocorticóides (Struebe, 1997).

Em 1980, surgiu a hipótese que os glicocorticóides induziriam lipocortinas, proteínas capazes de impedir a liberação de cálcio e fosfolípidos, inibindo a atividade da

fosfolipase A2. Os glicocorticóides consequentemente, estariam impedindo a liberação do AA e liso-PAF e a consequente formação de prostaglandinas, leucotrienos e PAF. Entretanto, estudos indicam que a expressão da COX-2 é regulada pelos glicocorticóides endógenos sugerindo que a atividade antiinflamatória dos glicocorticóides pode estar relacionada à sua potência na supressão da expressão da COX-2 (Struebe, 1997).

Os glicocorticóides estão entre as drogas mais efetivas no tratamento de processos inflamatórios. Esses fármacos são conhecidos por produzirem diversos efeitos biológicos por alterarem a expressão gênica. Como 1% do total dos genes pode ser alterado por glicocorticóides em seu alvo celular, consequentemente ocorreram alterações na expressão de um grande número de enzimas e outras proteínas. Diversos estudos indicam que parte de seus efeitos antiinflamatórios são mediados pela indução de proteínas reguladoras como a lipocortina (Moreno, 1997).

A enorme utilidade clínica dos glicocorticóides colocou essas substâncias entre os agentes mais frequentemente prescritos. Além de suas atividades antiinflamatórias, os glicocorticóides demonstram importante papel no desenvolvimento de doenças auto-imunes, onde em ambas as ações, observamos inibição das funções específicas dos leucócitos (Wilckens, 1995).

Os diversos efeitos dos corticosteróides endógenos incluem: alterações no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas; manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico; e preservação da função normal do sistema cardiovascular, do sistema

imunológico, do rim, da musculatura esquelética, do sistema endócrino e do sistema nervoso. Além disso, essas substâncias dotam o organismo com a capacidade de resistir a circunstâncias estressantes. Na ausência do córtex renal, a sobrevivência somente é possível através da manutenção de um ambiente ideal, incluindo alimentações adequadas e regulares, ingestão de quantidades relativamente grandes de cloreto de sódio e a manutenção de uma temperatura ambiente apropriada (Berger et al., 1996).

Existem várias complicações associadas à terapia prolongada com glicocorticóides. Entre elas podemos observar: alterações no equilíbrio hidroeletrolítico acarretando alcalose hipocalêmica, edema e hipertensão; alterações no metabolismo de carboidratos, com tendência a hiperglicemia; diminuição da massa corporal por inibição da síntese de proteínas; aumento do colesterol total; alterações diretas no esqueleto, por diminuição da absorção de cálcio no intestino, antianabolismo nas proteínas do tecido rico, interferência na secreção do hormônio de crescimento; suscetibilidade aumentada a infecção; alterações oculares; osteoporose e osteonecrose. A complicação mais grave na interrupção do tratamento prolongado com glicocorticóides é a supressão do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Prado et al., 2001).

ANTIINFLAMATÓRIOS X CÂNCER

Drogas antiinflamatórias não esteroideais que inibem a atividade a enzima ciclooxigenase em ambas as suas isoformas, COX-1 (constitutiva) e COX-2 (induzida) tem

inibido também o desenvolvimento de carcinoma de cólon, em modelos animais. (Yoshimura et al., 2000)

Em vários tecidos tumorais humanos e animais, incluindo câncer de cólon humano, tem se encontrado altas concentrações de prostaglandinas. Essa relação entre tumores neoplásicos e o aumento dos níveis de prostaglandinas, fortalece o fundamento no uso de antiinflamatórios não esteroidais como potentes agentes quimiopreventivos (Taketo et al., 1998).

Diversos estudos sugerem o uso de inibidores da COX2 na prevenção do câncer. Em células normais do epitélio intestinal transfectadas com cicloxigenase-2, ocorreram mudanças fenóticas similares àsquelas encontradas em células malignas, como por exemplo, resistência à apoptose (Ota et al., 1999).

Estudos imunohistoquímicos tem mostrado que a expressão da COX2 não está presente em células tumorais , mas em células epiteliais. Isso conduz para a hipótese de que o mecanismo de ação dos AINES suprimindo a carcinogênese de cólon está relacionado em parte, através da supressão de um fator produzido por fibroblastos, o fator de crescimento do hepatócito(HGF) capaz de inibir a produção de prostaglandinas (Ota et al., 1999).

As primeiras evidências que os eicosanóides pudessem participar no desenvolvimento do câncer de próstata, concentraram-se em evidências epidemiológicas

entre o alto consumo de carne vermelha e o risco em desenvolver esse tipo de câncer. Produtos de origem animal contém ácido araquidônico ao contrário dos de origem vegetal (Myers et al., 2001).

Em laboratório, a relação entre o ácido araquidônico e a biologia do câncer de próstata têm sido facilmente comprovada e expressiva. O ácido 12-hidroxi-tetraeicosanoico (12-HETE), 5-HETE e PGE2, eicosanóides formados a partir do ácido araquidônico parecem possuir um papel importante na biologia do câncer de próstata (Myers et al., 2001).

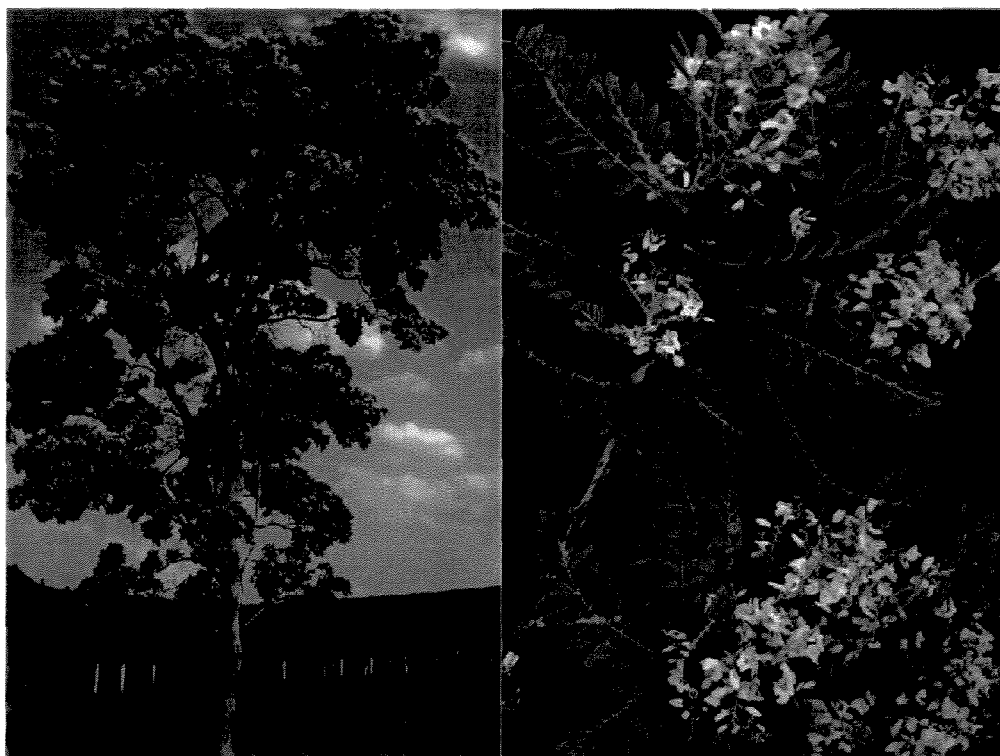
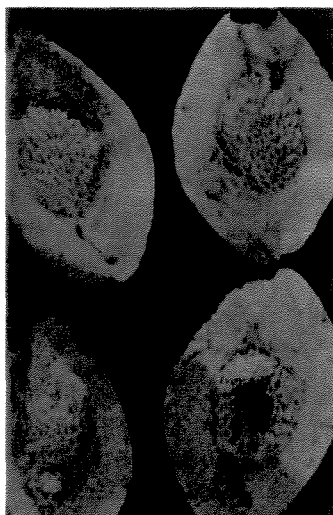


FIGURA 1: Sucupira branca, *Pterodon pubescens* Benth.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Drogas

Carragenina (Sigma Chem. Co. – USA); dexametasona (Hoechst Marion Roussel S/A – Brasil); indometacina (Sigma Chem. Co. – USA) dipirona sódica (Hoechst Marion Roussel S/A – Brasil); morfina (Cristália – Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda); pentobarbital sódico (Cristália – Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda); prednisona (União Química - Farmacêutica Nacional S/A); bradicinina (Sigma Chem. Co. – USA); histamina (Sigma Chem. Co. – USA); doxorrubicina (Boehringer Ingelheim); meloxicam (Boehringer Ingelheim); ciproheptadina. Todas as drogas foram solubilizadas em solução salina (NaCl 0,9%). Na dissolução da indometacina utilizou-se 0,5% de tween 80.

3.1.2. Solventes e Reagentes

Álcool etílico absoluto (Merck), formaldeído (Chemco), tween 80 (Labsynth – Brasil), cloreto de sódio (Labsynth – Brasil), cloreto de mercúrio (Labsynth – Brasil); ácido acético glacial (Chemco) , ácido clorídrico, anidrido acético (Merck – Alemanha); sulforrodamina B (Sigma Chem Co - USA); tampão tris base (Sigma Chem Co – USA); éter etílico (Nuclear); acetona (Chemco); ácido sulfúrico (Chemco); acetato de etila

(Chemco); hexano (Chemco) óleo de cróton (Botica Veado d'ouro); hidróxido de amônio (Cinética Química Ltda); solução de anisaldeído (ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído (50:1:0,5)).

3.1.3. Material Vegetal

As sementes foram adquiridas através da Distribuidora de Produtos Naturais Rainha da Mata, coletadas no Município de Lagoa Santa, Minas Gerais. A excicata foi identificada pelo Prof. Doutor Fernando de Oliveira e está depositada no Herbarium da Universidade de Bragança Paulista – n °- LP/Pp 15-14. (FIGURA 1)

3.1.4. Linhagens celulares

As células utilizadas neste trabalho são originárias de neoplasias humanas e foram cedidas ao CPQBA pelo “National Cancer Institute” (NCI - USA) (Tab. 1). As células foram mantidas em frascos de 25 cm² (Nunc®), com 5 mL de meio RPMI (Gibco®) com 5% de soro fetal bovino (SFB) a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade. Quando a monocamada celular atingia cerca de 80% de confluência (uma vez por semana) a cultura era repicada em meio RPMI/SFB.

Tabela 1. Linhagens cedidas pelo NCI

LINHAGEM CELULAR	LINHAGEM	TIPO DE CULTURA
Pulmão	NCI 460	Aderida
Mama	MCF - 7	Aderida
Mama*	NCI ADR *	
Melanoma	UACC - 62	Aderida

*linhagem celular que expressa o fenótipo de resistência a múltiplas drogas.

3.1.5. Animais

Os animais foram adquiridos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) e mantidos em câmaras com temperatura controlada ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$) em ciclos claro-escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. Foram utilizados camundongos albinos *Mus musculos Swiss* machos, adultos (25-35g) e ratos *Ratus norvegicus Wistar* machos adultos (100-220g) aclimatados às condições do laboratório por 7 dias, sendo agrupados ao acaso, em grupos de até 10 animais submetidos a jejum de 12 horas. Todos os experimentos foram desenvolvidos seguindo normas que envolvem cuidados com animais de laboratório e normas éticas para o seu uso em experimentos com dor (Porter, 1992; Fraser, 1999).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA

3.2.1.1. Extração

O óleo da planta foi obtido por prensagem das sementes (100g) em prensa (CODISTIL - nº 014) e submetido a um processo de centrifugação (IEKE Modelo LS) 400 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi filtrado à vácuo obtendo-se 33g do óleo bruto (rendimento 33 %).

3.2.1.2. Métodos Cromatográficos

Cromatografia coluna seca

As cromatografias em coluna seca foram realizadas em tripas de celulose* como suporte recheadas com sílica gel 60 Merck (70-230) como fase estacionária. Para determinar a relação Ø coluna: altura da coluna: massa ideal (para obtenção de uma boa separação) utilizou-se um padrão descrito na (TABELA 2). Eluiu-se a coluna com o sistema de solventes Hexano: Acetato de etila (75:25).

TABELA 2: Cálculo para realização de coluna cromatográfica seca

<i>Diâmetro da coluna</i>	<i>Massa de extrato/comprimento da coluna</i>
1,0 cm	1g/ 10 cm
2,0 cm	4g/ 10 cm
3,5 cm	8g/ 10 cm
8,0 cm	26g/ 10cm
12,0 cm	94g/ 10cm

Foglio et al., 1999.

A partir do perfil cromatográfico por cromatografia de camada delgada, utilizando como eluente Hexano/Acetato de etila (75:25), e revelador solução de anisaldeído selecionamos as frações 3, 5 e 7 que foram testadas no modelo de inflamação de edema de pata por carragenina.. Utilizamos uma membrana de celulose com um metro de comprimento por 1 cm de diâmetro, empacotada com 100 g de sílica gel 60 Merck (70-230), suficientes para a purificação de 5 g de material. Após a aplicação da amostra na forma de “papa” semisólida, a coluna foi eluída com 200 mL de uma mistura de Hexano /Acetato de etila (75:25). Subsequentemente a coluna foi cortada em sete pedaços de 15 cm $\pm$ 1-2 mm cada, extraídas com Acetato de etila puro. As frações resultantes foram filtradas sobre filtro de placa porosa e eliminou-se o solvente orgânico sob vácuo.

Cromatografia em Coluna clássica

As cromatografias em coluna clássica foram efetuadas em suporte de vidro recheado com sílica gel 60 Merck (70-230). Seguiu-se a proporção de para cada g de amostra, utilizou-se 30 vezes mais sílica gel para a montagem da coluna, quando necessitou-se de uma purificação mais refinada esta proporção aumentou para 100 vezes. Efetuou-se a eluição com Hexano/Acetato de etila com alteração de gradiente quando necessário, a quantidade de solvente que foi utilizado foi referente ao volume de sílica utilizada na coluna.

Utilizou-se então, uma coluna de gradiente de eluição com 100g de óleo. Como fase estacionária foi utilizado sílica gel 60 Merck (70-230) na proporção (1:30) ou seja, 1g da “papa semi-sólida” para 30g de sílica. Como eluentes utilizou-se uma mistura em concentrações de hexano e acetato de etila, com gradientes crescentes de polaridade (hexano puro à Hexano/Acetato de etila (70:30)). Foram recolhidas 63 frações de 100mL, analisadas por cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD), eluídas com uma mistura de Hexano/Acetato de etila (75:25) e reveladas com solução de anisaldeído. As frações que se mostraram semelhantes por cromatografia de camada delgada foram agrupadas, fornecendo 8 frações que foram evaporadas a vácuo. Obteve-se 42 g da fração 7 e realizou-se uma nova purificação com 13g desse material. Utilizando uma nova coluna, (com o objetivo de obtermos uma melhor separação), na proporção de 1:100, ou seja 1g da “papa semi-sólida” para 100g de sílica, recolheu-se 76 frações de 50mL reunidas em 6

frações por similaridade cromatográfica. A fração 6 (61mg) foi submetida à um ensaio de atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas.

Cromatografia em camada delgada (CCD)

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram efetuadas em cromatoplasmas de Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck 1.05554.). Eluiu-se as cromatoplasmas com um sistema de solventes, Hexano/Acetato de etila (75:25) A detecção dos compostos foi feita por pulverização com revelador anisaldeído (ácido acético/H₂SO₄/p-anisaldeído (50:1:0,5)), seguido de aquecimento em estufa Corporation-Precision (110° C, 5 min).

Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

As frações foram diluídas em acetato de etila e analisadas por cromatografia gasosa capilar acoplada à um detetor de massas (CG Hewlett Packard 5890, série II, diretamente acoplado a um detetor seletivo de massa Hewlett Packard 5890, equipado com uma coluna de sílica fundida WCOT, 30m x 0,25mm, DB-5). Programação: 110°C (2 min) - 5°C (min) - 300°C (2min) / T.Det.= T.Inj. = 250°C / Razão de split 1:100 / Gás de arrete He 0,7 bar (1 mL/min) - 1µl amostra).

3.2.2. AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA

3.2.2.1. ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA

3.2.2.1.1. Edema de pata induzido por carragenina

Foram utilizados seis camundongos *Mus musculus Swiss* (25-30g), machos por grupo. No primeiro experimento, três grupos de animais receberam por via oral o óleo de *Pterodon pubescens* nas doses de 100, 200 ou 300mg/kg; no segundo experimento, um grupo de animais recebeu o óleo, a fração 3, 5 ou 7 (300mg/kg) e em um terceiro experimento os animais receberam a fração 7 (ativa) nas doses de 100, 200 ou 300mg/kg. O grupo controle negativo recebeu solução NaCl 0,9%, 10ml/kg e um grupo controle positivo recebeu indometacina (10mg/kg), comum para todos os três experimentos. Após 60 minutos, os animais foram submetidos a uma injeção sub-plantar de 0,1 mL de carragenina 1% em solução NaCl 0,9% na pata traseira esquerda. O volume da pata do camundongo foi medido imediatamente antes e após a injeção do agente edematogênico e em intervalos pré-estabelecidos, utilizando um hidropletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália) submergindo as patas esquerdas posteriores dos animais, até o maléolo lateral, em um recipiente contendo uma solução de extrato neutro 2,5% em salina 0,9%, conectado por um sistema de vasos comunicantes a um outro menor, contendo um transdutor de volume ligado a um multímetro digital. As variações de volume, mediante a imersão das patas no recipiente maior, foram numericamente registrados no multímetro digital nos tempos zero (imediatamente após as injeções de carragenina) 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos após a injeção do agente flogístico (Winter et al., 1962).

As respostas edematogênicas foram expressas como aumento de volume da pata (mL), calculado por subtração do volume basal. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, para cada grupo de tratamento.

Edema de pata induzido por carragenina em ratos adrenalectomizados (ADX)

Seis ratos *Ratus norvegicus Wistar* (130-180g), machos foram anestesiados com pentobarbital sódico (40mg/kg). Os animais tiveram o dorso tricotomizado e uma pequena incisão (1cm) foi realizada nessa região, para retirada das glândulas adrenais.

Animais controle (falso operados) sofreram os mesmos procedimentos cirúrgicos, exceto a retirada das glândulas adrenais (Sham). Após a cirurgia, estes animais receberam água em substituição à salina (NaCl 0,9%) fornecida aos animais ADX. Após uma semana para recuperação, os animais foram submetidos ao teste de edema de pata por carragenina. Os animais foram tratados pela via oral 60 minutos antes da administração sub-plantar de carragenina. O grupo ADX recebeu óleo de *Pterodon pubescens* 300mg/kg; o grupo controle negativo recebeu solução NaCl 0,9%, 10ml/kg; o grupo falso operado recebeu também NaCl 0,9%, 10ml/kg e um grupo controle positivo recebeu indometacina (10mg/kg).

3.2.2.1.2. Edema de pata produzido por Bradicinina

Seis ratos *Ratus norvegicus Wistar* (120-150g), machos foram tratados pela via oral com o óleo de *Pterodon pubescens* na dose de 500mg/kg ou com solução de NaCl 0,9% (10ml/kg), como controle negativo. Após 60 minutos, os animais receberam uma injeção 50 µg de bradicinina (dissolvidas em NaCl 0,9%) na região sub-plantar na pata traseira esquerda. O volume da pata do rato foi medido imediatamente antes e após a injeção do agente edematogênico, em intervalos pré-estabelecidos: 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, utilizando um hidropletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália). As respostas edematogênicas foram expressas como aumento de volume da pata (mL), calculado por subtração do volume basal. Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média, para cada grupo de tratamento.

3.2.2.1.3. Edema de pata produzido por histamina

Foram utilizados seis camundongos *Mus musculus Swiss* (25-30g) machos, por grupo experimental, tratados pela via oral. Um grupo de animais recebeu o óleo de *Pterodon pubescens* (300mg/kg), o grupo controle negativo recebeu solução de NaCl 0,9% e o grupo controle positivo recebeu ciproheptadina (50mg/kg). Após 60 minutos dos tratamentos, foram injetados na região sub-plantar das patas traseiras esquerdas 50 µg de Histamina (dissolvidos em NaCl 0,9%). O volume da pata do rato foi medido antes e após 30 minutos da injeção do agente edematogênico, utilizando um hidropletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália). As respostas edematogênicas foram expressas como

aumento de volume da pata (mL), calculado por subtração do volume basal. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, para cada grupo de tratamento.

3.2.2.1.4. Edema de orelha de camundongos induzido por aplicação tópica de Óleo de Cróton

Foram utilizados 10 camundongos *Mus musculus Swiss*, machos por grupo experimental, tratados pela via oral. Três grupos de animais receberam óleo de *Pterodon pubescens* (100, 200 e 300mg/kg) o grupo controle negativo recebeu solução de NaCl 0,9%, 10 mL/kg e o grupo controle positivo recebeu dexametasona (1mg/kg). Após 60 minutos do tratamento os animais receberam 10 μ l de uma solução recém preparada de óleo de cróton (2,5% v/v em acetona) sobre a superfície interna da orelha direita. (Tubaro et al., 1985).

A orelha esquerda recebeu o mesmo volume de acetona (2,5% v/v em acetona). Após seis horas da administração do óleo de cróton, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, discos de 6 mm de diâmetro das orelhas foram removidos e pesados em balança analítica. Os resultados foram expressos como média da diferença de peso entre as orelhas.

3.2.2.2. ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

3.2.2.2.1. Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

Foram utilizados grupos de 10 camundongos *Mus musculus* Swiss (25-30g), machos, tratados pela via oral. Um grupo de animais recebeu óleo *Pterodon pubescens* 300mg/kg, o grupo controle negativo recebeu solução salina 0,9%, e o controle positivo recebeu dipirona (200mg/kg). Após 60 minutos, os animais receberam ácido acético (1,2% 0,1mL/10g, intraperitoneal). As contrações da parede abdominal seguidas de torções do tronco e extensão dos membros posteriores produzidas foram contadas durante 30 minutos (Kostner et al., 1959; Vacher et al., 1964).

3.2.2.2.2. Teste de algesia induzida por calor

Foram utilizados grupos de 10 camundongos *Mus musculus*, Swiss tratados pela via oral. Um grupo recebeu óleo de *Pterodon pubescens* 300mg/kg, o grupo controle negativo recebeu solução de NaCl 0,9% e o controle positivo recebeu morfina (20mg/kg), 60 minutos antes da administração do estímulo álgico. Após 30, 60, 90 e 120 minutos desta administração, os animais foram submetidos ao estímulo álgico em placa quente com temperatura controlada de $56,5 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, até que apresentem o reflexo doloroso (lamber as patas dianteiras/e ou traseiras), sendo anotado o tempo de reação dos animais (Mazella et al., 1991).

3.2.2.3. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

A avaliação da atividade antiproliferativa do óleo de *Pterodon pubescens* foi realizada em quatro linhagens celulares derivadas de tumores humanos, segundo a tabela 1. Desta forma, o *Pterodon pubescens* e a fração 7-6 (ativa em modelo de edema de pata produzido por carragenina) nas concentrações de 18,75; 37,5; 75 e 150 µg/mL foram adicionados em placas de 96 compartimentos (Nunc[®]), contendo uma linhagem por placa. Após um período de incubação de 48 horas, à 37°C, 5% CO₂ e 100% de umidade (Forma[®]), as células foram fixadas com 50 µL/compartimento ácido tricloroacético (TCA) 50%. Após 60 minutos à 4°C, o ácido tricloroacético foi removido e a seguir as placas foram lavadas com água corrente para, após secagem, serem coradas com 50 µL/compartimento de sulforrodamina B (SRB) a 0,4%. O excesso de SRB foi removido das placas após 30 minutos, através de lavagem com ácido acético a 1%. Finalmente, o corante foi solubilizado por adição de 150 µL/compartimento de tampão tris base (10µm). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada por leitor de elisa em 540 nm (Labsystems Multiskan MCC/340). Este método quantifica as proteínas de modo linear em relação ao número de células da cultura (Skehan, et al., 1990).

3.2.2.4. TOXICOLOGIA

Peso corporal, níveis de glicose e análise anatomohistopatológica

Foram utilizados grupos de 10 ratos (*Ratus norvegicus Wistar*), com peso médio inicial de 100g. Os animais foram tratados diariamente pela via subcutânea com o

óleo de *Pterodon pubescens* nas doses 30, 100 e 300mg/kg; com solução de NaCl 0,9%, controle negativo e prednisona (2mg/kg), controle positivo e seus pesos corporais anotados diariamente pela manhã. Após 14 dias de tratamento, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40mg/kg) e o sangue coletado na ausência de anticoagulante, pelo plexo ocular. Em seguida, o sangue foi centrifugado em centrífuga refrigerada. O experimento foi realizado em quadruplicata, utilizando o kit de glicose (Glicose enzimática – Laborlab). A leitura espectrofotométrica foi realizada por leitor de elisa em 540 nm (Labsystems Multiskan MCC/340). Em seguida, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e submetidos a autópsia, verificando as possíveis mudanças na localização anatômica e possíveis patologias de seus órgãos. Fígado, estômago, pulmão, baço, rim e coração foram retirados e armazenados em formol 10% para realização de análise histopatológica. Foram em seguida embutidos em parafina, seccionados para confecção das lâminas, corados por hematoxilina-eosina, de acordo com os métodos convencionais de histologia.

3.2.2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram submetidos à análise de variância de uma única via (ANOVA), considerando-se como nível crítico, $p < 0,05$ para que seja considerada diferença significativa entre os grupos controle e tratados, seguida do Teste de Duncan.

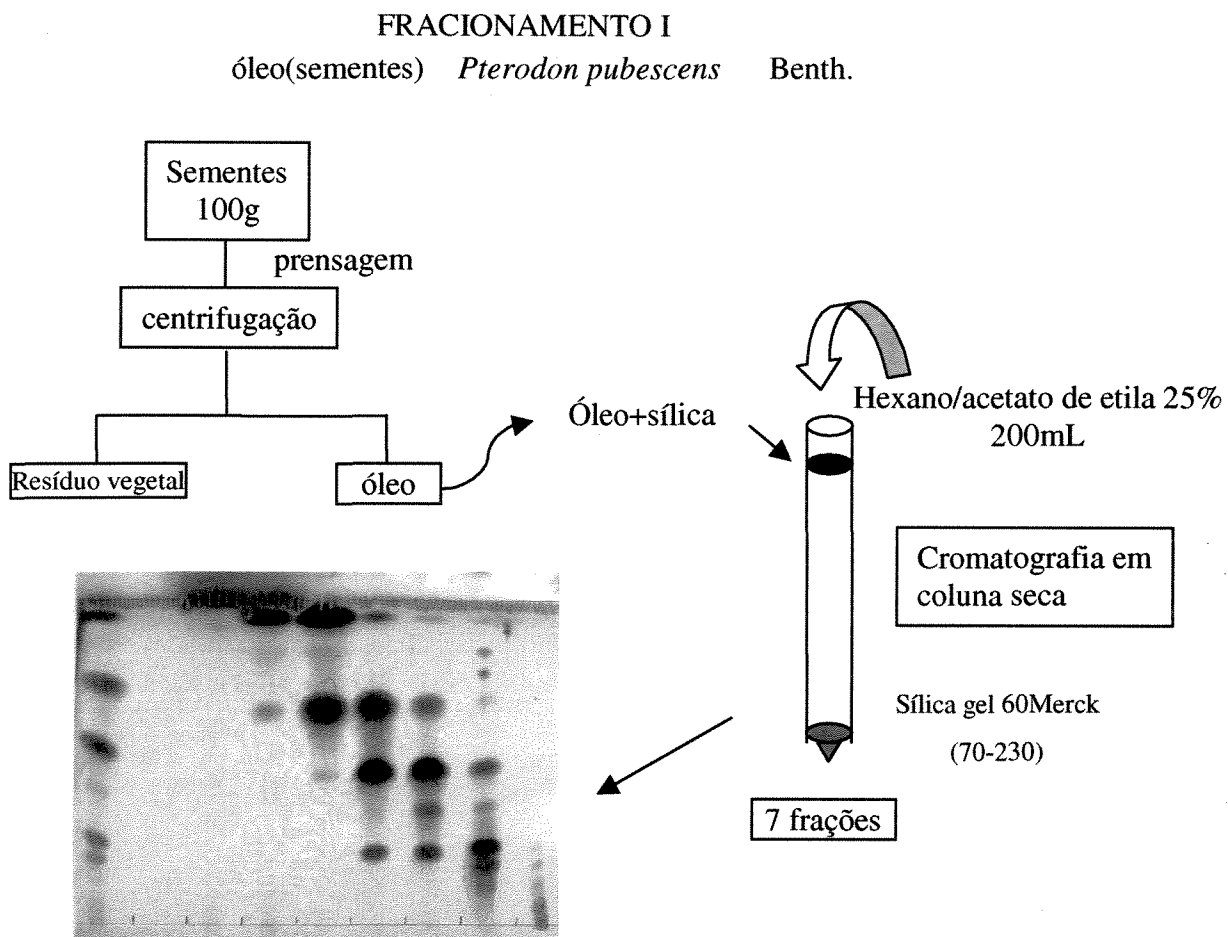


FIGURA 2 : Fluxograma representativo do método fitoquímico de purificação da fração ativa do óleo das sementes de *Pterodon pubescens* Benth. utilizando cromatografia em coluna seca

FRACIONAMENTO II

óleo (sementes) *Pterodon pubescens* Benth.

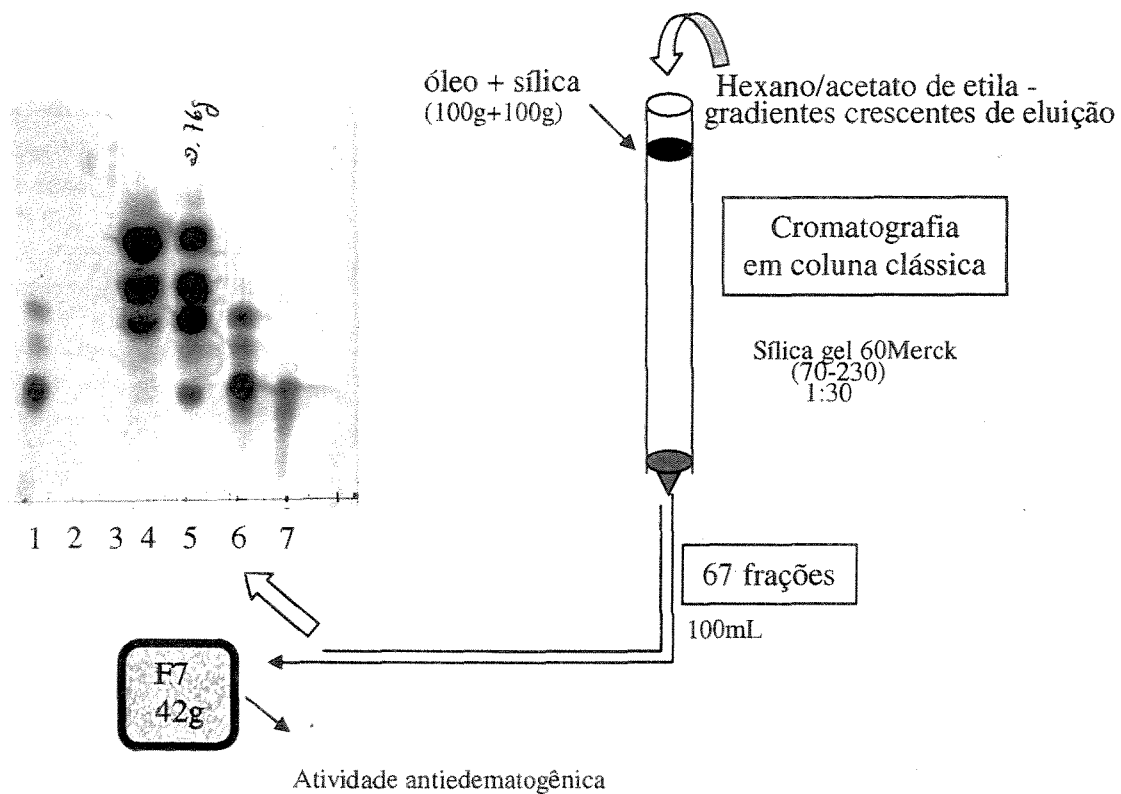


FIGURA 3 : Fluxograma representativo do método fitoquímico de purificação do óleo das sementes de *Pterodon pubescens* Benth. utilizando cromatografia em coluna clássica.

FRACIONAMENTO III

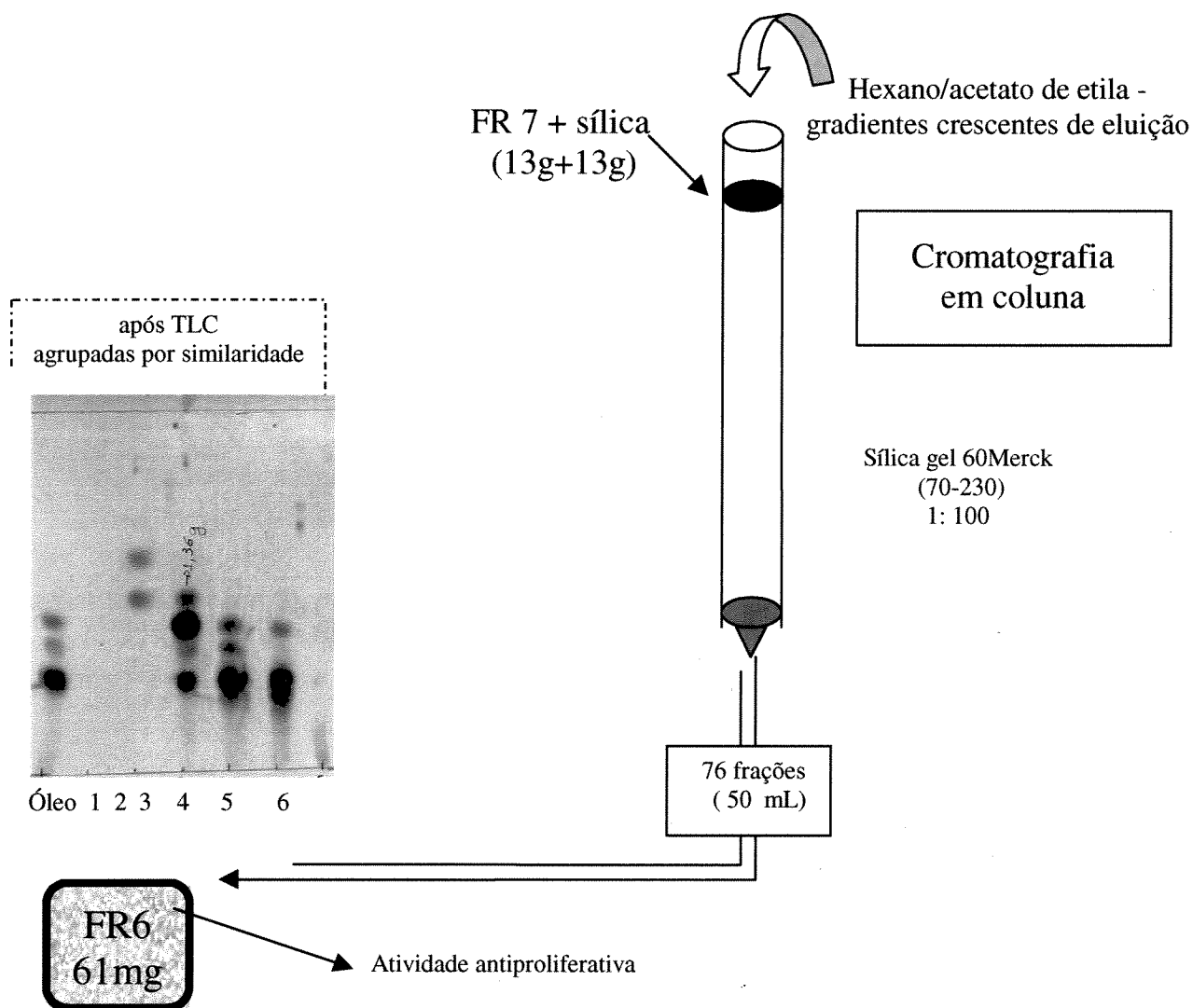


FIGURA 4 : Fluxograma representativo do método fitoquímico de purificação da FR7 obtida do óleo das sementes de *Pterodon pubescens* Benth. utilizando cromatografia em coluna clássica.

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA

O processo de obtenção e purificação do óleo de *Pterodon pubescens* passou pela análise de diversos métodos cromatográficos. Após um exaustivo trabalho fitoquímico, concluímos os melhores métodos de purificação (FIGURAS 2, 3 e 4).

4.1.2. Cromatografia gasosa

A análise dos espectros de massas (FIGURA 5 e 6) e a comparação desses com os espectros de obtidos por Matos et al., (1984) e Fascio et al., (1975) revelaram a presença de um composto terpênico m/z : 360 (M^+).

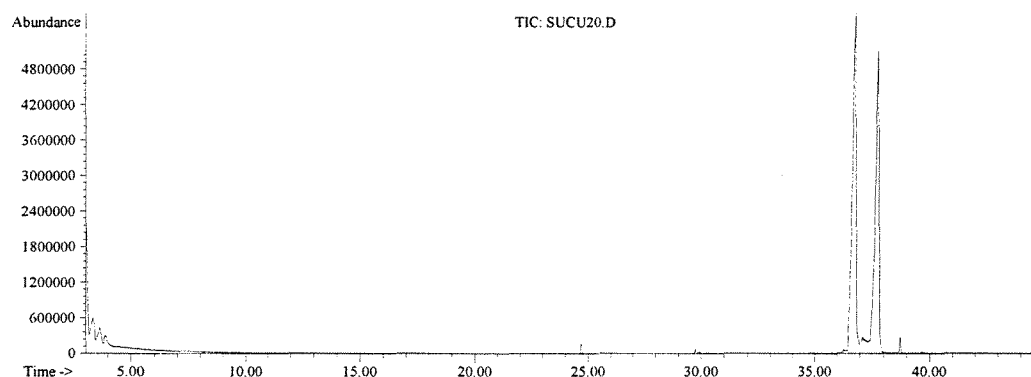


FIGURA 5 : Perfil cromatográfico de FR 7-6 obtido em Cromatógrafo Gasoso HP 5890
 programação: 110°C (2 min) - 5°C (min) - 300°C (2min) / T.Det.= T.Inj. = 250°C / Razão
 de split 1:100 / Gás de arrete He 0,7 bar (1 mL/min) - 1µl amostra)

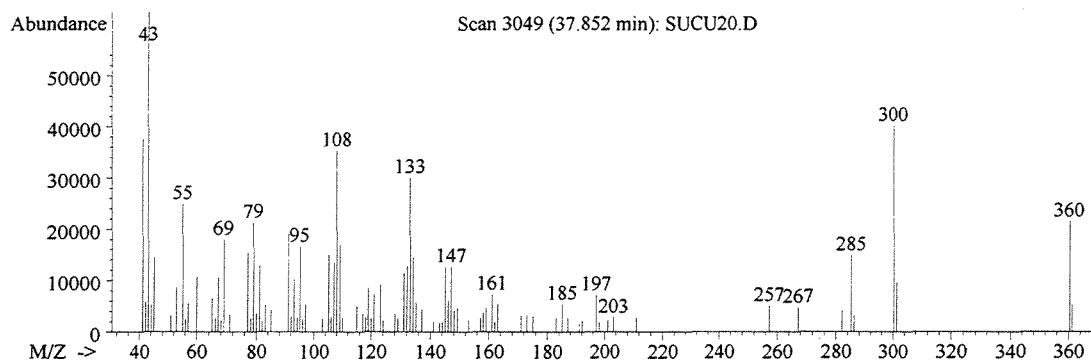


FIGURA 6: Espectro de massas de FR 7-6 (composto com tempo de retenção 37,85)
 obtido no GC (HP 5890) / EIMS (HP 5970) (70 ev): m/z: 360 (M^+)

4.2. RESULTADOS FARMACOLÓGICOS

4.2.1. Atividade antiinflamatória

4.2.1.1. Edema de pata induzido por carragenina

Curva Dose-resposta do óleo: 100-200-300mg/kg

O óleo de *Pterodon pubescens* na dose 300mg/kg, reduziu o edema de pata produzido pela carragenina 1% de $0,16 \pm 0,05$ mL (controle negativo) para $0,05 \pm 0,03$ mL (65%) após três horas da administração do agente edematogênico; de $0,17 \pm 0,07$ mL (controle negativo) para $0,08 \pm 0,04$ mL (53%) após quatro horas da administração do agente edematogênico. O óleo de *Pterodon pubescens* na dose de 200mg/kg reduziu o edema em 25% após 3 horas e em 27% após 4 horas da administração do agente edematogênico. A indometacina (10mg/kg), controle positivo, reduziu o edema para $0,06 \pm 0,03$ mL (60%); e $0,10 \pm 0,01$ mL, (39%) após 3 e 4 horas respectivamente (FIGURA 8).

Efeito das frações FR 3, 5 e 7

As frações FR3, FR5 e FR7 (300mg/kg, vo), obtidas do óleo de *Pterodon pubescens* foram avaliadas em edema de pata por carragenina. Dessas frações somente a FR7 reproduziu a atividade antiedematogênica produzida pelo óleo, reduzindo o edema de pata

produzido pela carragenina 1% de $0,19 \pm 0,03$ mL (controle negativo) para $0,09 \pm 0,03$ mL (51%) após três horas da administração do agente flogístico; de $0,16 \pm 0,03$ mL (controle negativo) para $0,09 \pm 0,02$ mL (44%) após 4 horas e de $0,21 \pm 0,06$ mL (controle negativo) para $0,12 \pm 0,04$ mL (44%) após 5 horas. A indometacina (10mg/kg), controle positivo, reduziu o edema para $0,10 \pm 0,04$ mL (46%); $0,09 \pm 0,03$ mL (43%) e $0,09 \pm 0,06$ mL (54%) após 3, 4 e 5 horas respectivamente. (FIGURA 9).

Efeito do óleo em ratos Adrenalectomizados

Em animais adrenalectomizados, o óleo de *Pterodon pubescens* na dose 300mg/kg (vo) reduziu o edema de pata produzido pela carragenina 1% de $0,84 \pm 0,04$ mL (controle negativo) para $0,47 \pm 0,03$ mL (44%) após 2 horas da administração do agente edematogênico; de $1,26 \pm 0,04$ mL (controle negativo) para $0,70 \pm 0,03$ mL (45%) após 3 horas da administração do agente edematogênico e de $1,19 \pm 0,05$ mL (controle negativo) para $0,88 \pm 0,04$ mL (25%) após 4 horas da administração do agente edematogênico. A indometacina (10mg/kg), controle positivo, reduziu o edema para $1,19 \pm 0,04$ mL, (23%) após 4 horas (FIGURA 10).

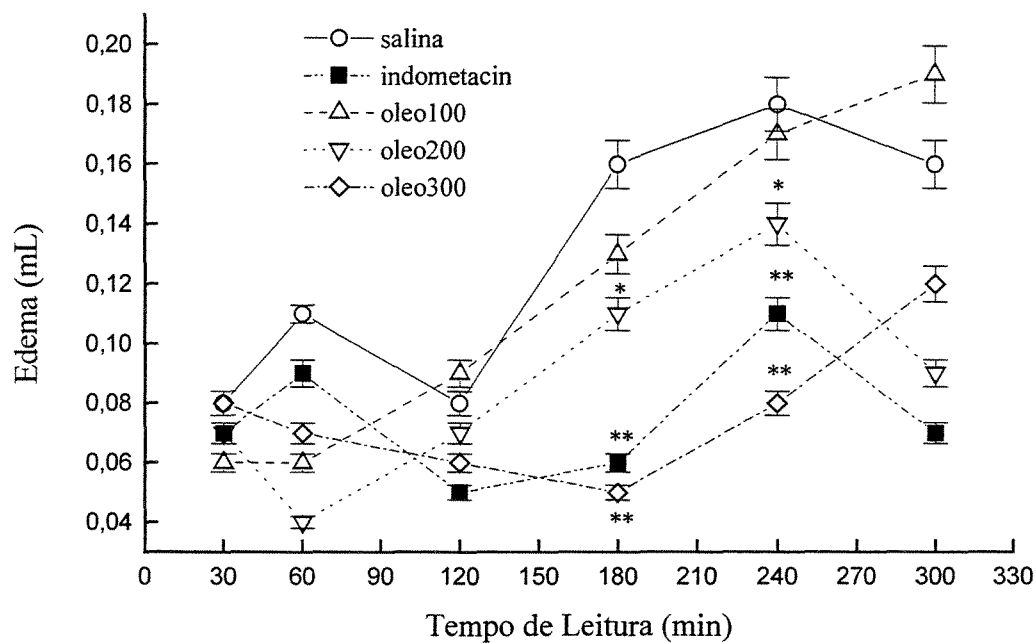


FIGURA 8: Atividade antiedematogênica do óleo de *Pterodon pubescens* em edema de pata de camundongo produzido pela injeção de carragenina 1% (0,05 mL/pata): ○ salina (10ml/kg); ■ indometacina (10mg/kg); óleo 100.mg/kg ▽ óleo 200mg/kg; ◇ óleo 300mg/kg. ANOVA F(4,28): 30 min=1,33 p<0,05; 1h=0,09 p<0,05; 2h=1,82 p<0,05; 3h=6,64 p<0,01; 4h=11,4 p<0,01; 5h=0,42 p<0,05 Teste de Duncan: * p<0,05 ** p<0,01

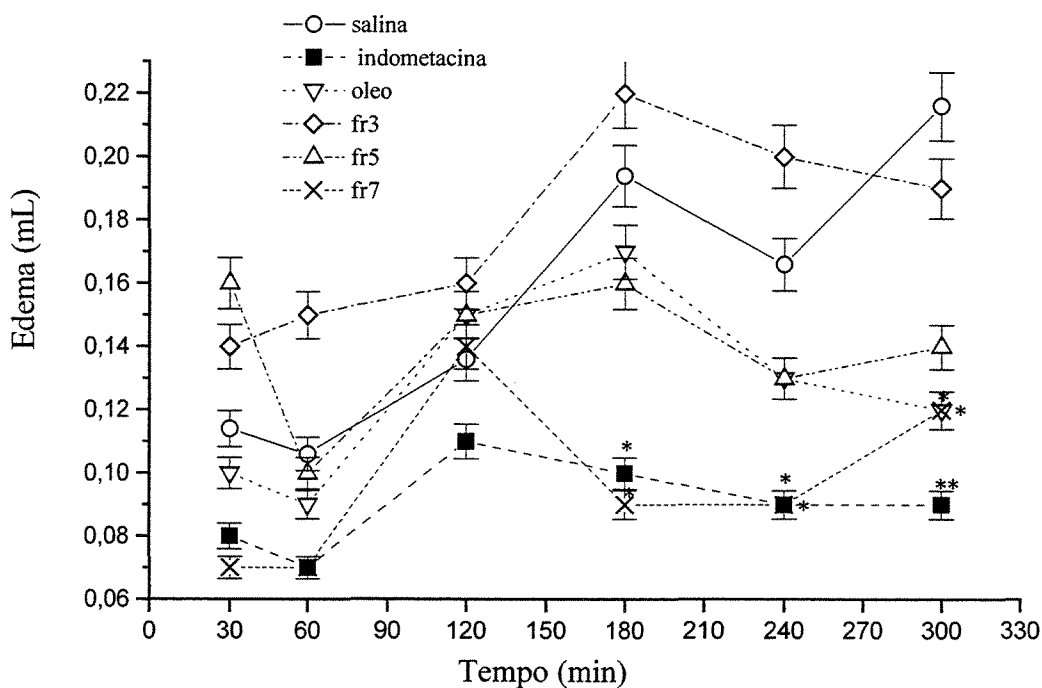


FIGURA 9: Atividade antiedematogênica do óleo de *Pterodon pubescens* e das frações 3, 5 e 7 obtidas por coluna seca em edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina 1% (0,05mL/pata): ○ salina (10ml/kg); ■ indometacina (10mg/kg); ∇ óleo (300mg/kg); ◇ FR3 (300mg/kg); Δ FR5 (300mg/kg); × FR7(300mg/kg); ANOVA F(5,28): 3h=3,97 p<0,01; 4h=3,46 p<0,05; 5h=3,10 p<0,05 e p<0,01. Teste de Duncan: * p< 0,05
** p< 0,01

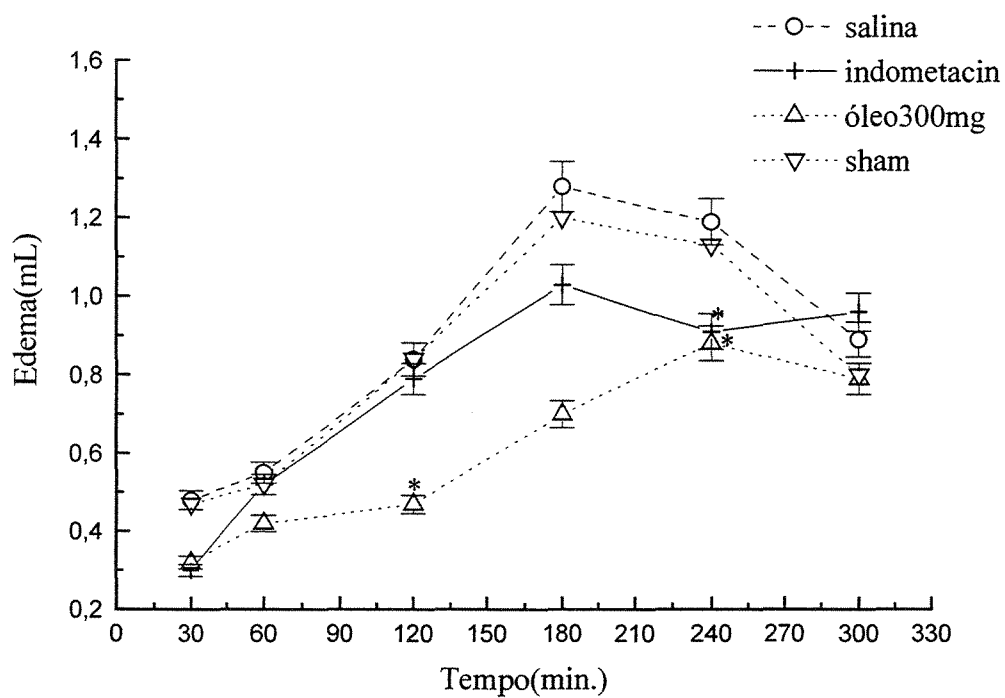


FIGURA 10: Atividade antiedematogênica do óleo de *Pterodon pubescens* em edema de pata pela injeção intraplantar de carragenina 1% (0,05mL/pata) em ratos adrenalectomizados: O salina (10ml/kg); + indometacina (10mg/kg); Δ óleo (300mg/kg); ∇ sham. ANOVA F(5,28): 3h=3,97 p<0,01; 4h=3,46 p<0,05. Teste de Duncan: * p<0,05 ** p<0,01

Curva dose-resposta da FR 7

A figura 11 demonstra que a FR 7 reduziu o edema de pata por carragenina somente na maior dose (300 mg/kg, vo). Os animais tratados com essa dose apresentaram edema de $0,20 \pm 0,01$ mL (controle negativo) para $0,10 \pm 0,02$ mL (50%) e de $0,21 \pm 0,01$ mL para $0,09 \pm 0,02$ mL (55%) após 3 e 4 horas da administração da carragenina 1%, respectivamente. A indometacina (10mg/kg), controle positivo, reduziu o edema para $0,12 \pm 0,02$ mL (41%) após 4 horas da administração do agente flogístico (FIGURA 11).

4.2.1.2. Edema de pata produzido por histamina

Nesse experimento, o óleo de *Pterodon pubescens* (300mg/kg) reduziu o edema em 77%, após 30 minutos da administração da histamina (50 μ g/pata). Enquanto a ciproheptadina reduziu o edema em 50%. (FIGURA 12).

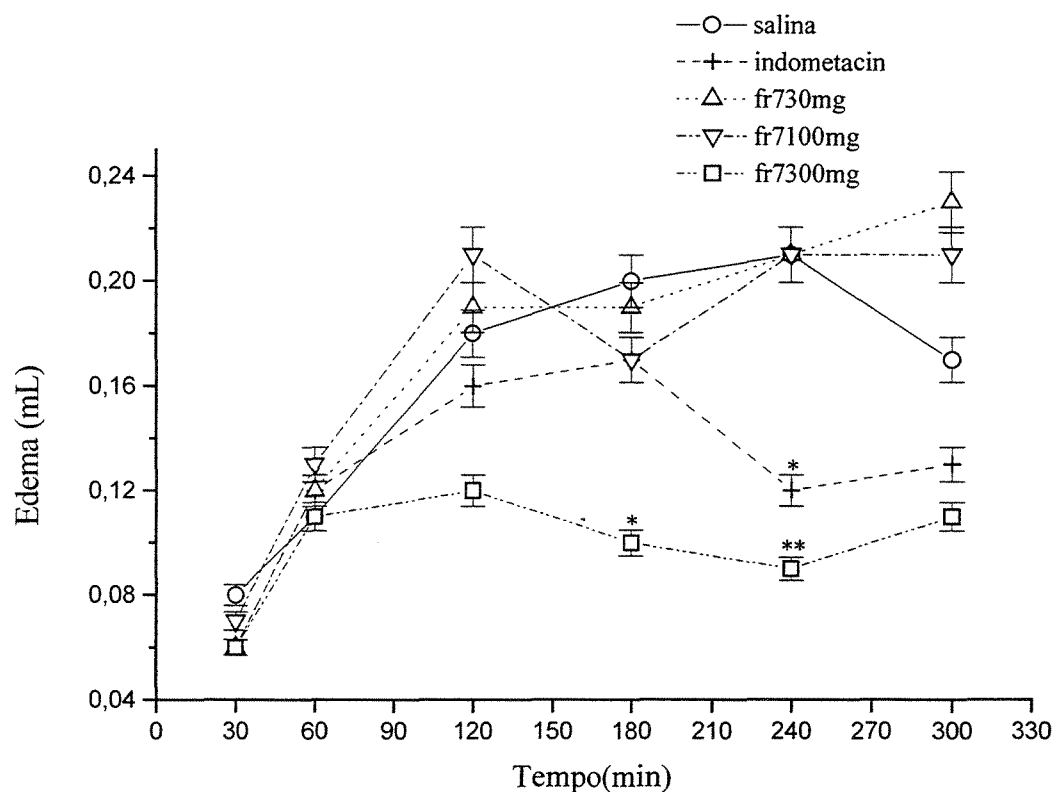


FIGURA 11: Atividade antiedematogênica da fração 7 do óleo de *Pterodon pubescens* em edema de pata pela injeção intraplantar de carragenina 1% (0,05mL/pata): O salina (10ml/kg); + indometacina (10mg/kg); Δ FR7 (30mg/kg); ∇ FR7 (100mg/kg); $\square$ FR7(300mg/kg); ANOVA F(4,27): 3h=5,12 $p < 0,01$; 4h=6,15 $p < 0,01$ e $p < 0,05$. Teste de Duncan: * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

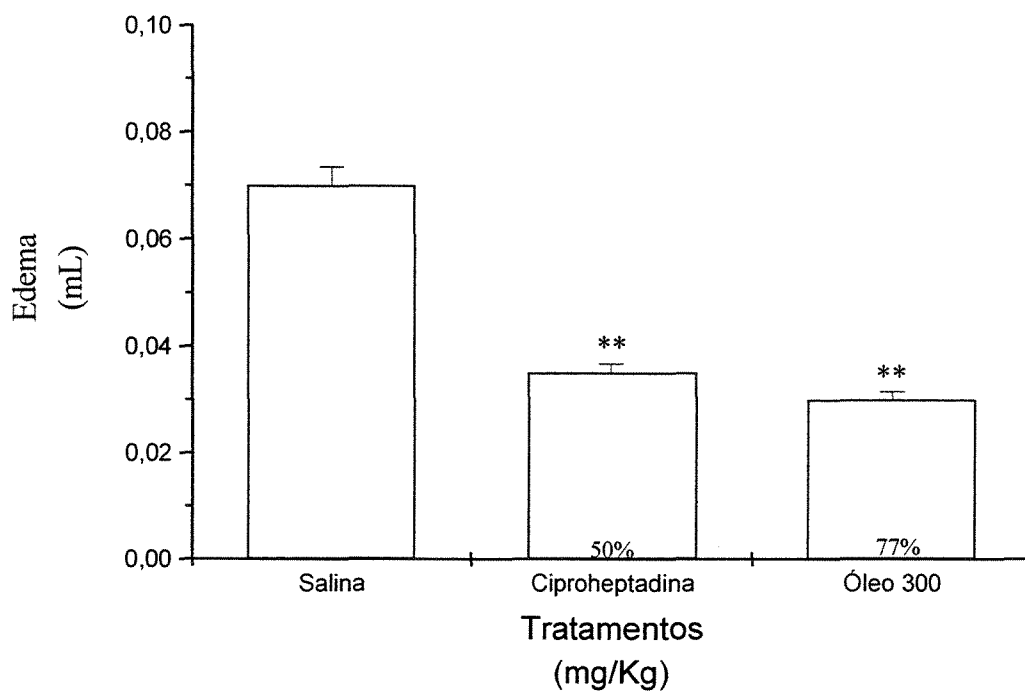


FIGURA 12: Atividade antiedematogênica do óleo de *Pterodon pubescens* em edema de pata pela injeção intraplantar de histamina (0,05m μ L/pata): ANOVA F(3,26): 30 min=4,33 ciproheptadina $p < 0,05$ e óleo $p < 0,01$. Teste de Duncan: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.2.1.3. Edema de pata produzido por bradicinina

O tratamento prévio com o óleo *Pterodon pubescens* (500 mg/kg) reduziu o edema de $(0,92 \pm 0,17 \text{ mL})$ (controle negativo) para $0,49 \pm 0,22 \text{ mL}$ (46%) após 15 minutos da administração intraplantar da bradicinina; de $0,64 \pm 0,09 \text{ mL}$ (controle negativo) para $0,34 \pm 0,12 \text{ mL}$ (47%) após 60 minutos; de $0,62 \pm 0,09 \text{ mL}$ (controle negativo) para $0,33 \pm 0,09 \text{ mL}$ (46%) após 90 minutos; e de $0,62 \pm 0,14 \text{ mL}$ (controle negativo) para $0,34 \pm 0,06 \text{ mL}$ (45%) após 120 minutos (FIGURA 15).

4.2.1.4. Edema de orelha produzido por óleo de cróton

O tratamento com o óleo de *Pterodon pubescens* reduziu o edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton em 41% apenas na dose de 300mg/kg (via oral). A dexametasona (1mg/kg/via oral), controle positivo, reduziu em 83%, o edema em relação ao grupo controle (FIGURA 16).

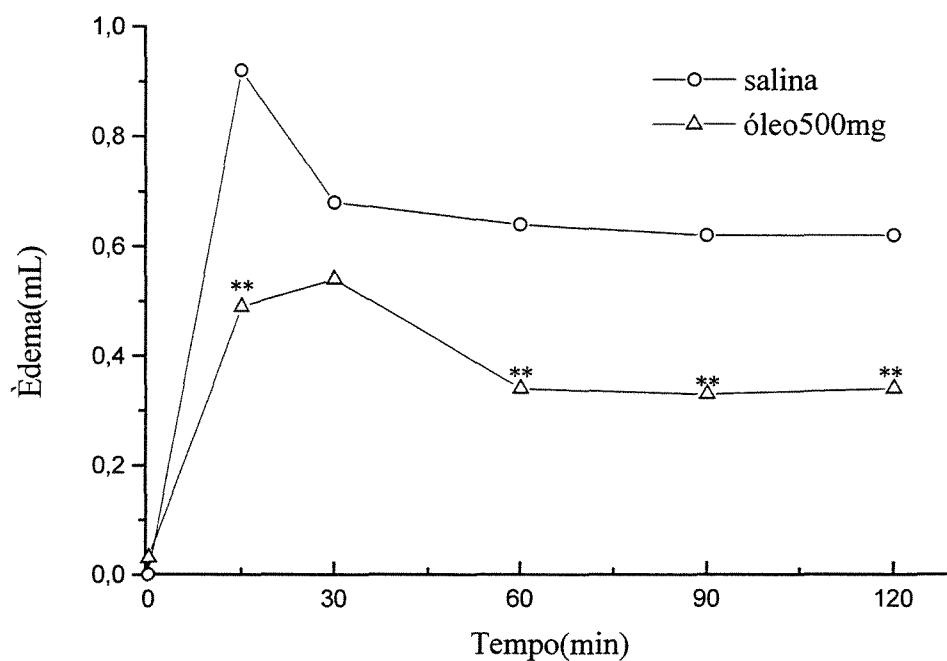


FIGURA 15: Atividade antiedematogênica do óleo de *Pterodon pubescens* em edema de pata produzido pela injeção intraplantar de bradicinina (0,05mL/pata): ○ salina (10ml/kg); Δ óleo (500mg/kg); ANOVA F(1,10): 15 min=13,43 $p<0,01$; 60 min=22,58 $p<0,001$; 90 min=27,21 $p<0,001$; 120 min=18,98 $p<0,01$. Teste de Duncan: * $p<0,01$; ** $p<0,001$

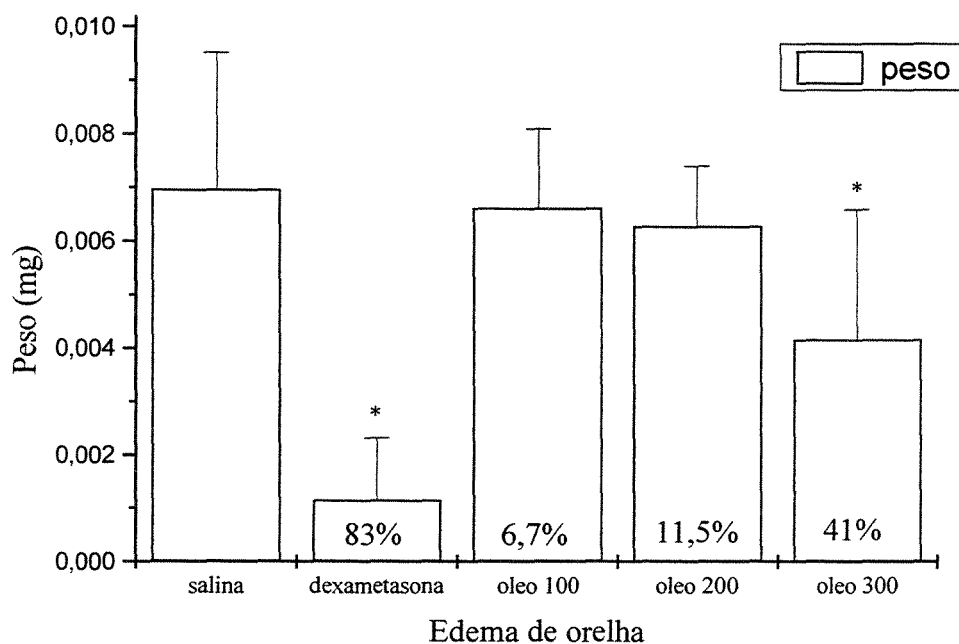


FIGURA 16: Atividade antiedematogênica do óleo de *Pterodon pubescens* em edema de orelha produzido por óleo de cróton: NaCl 0,9%; dexametasona (1mg/kg); óleo 100mg/kg; óleo 200mg/kg e óleo 300mg/kg. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro desvio padrão do peso de edema em miligramas. ANOVA F(2,43) = ** p < 0,01 e * p < 0,05.

4.2.2. Atividade Antinociceptiva

4.2.2.1. Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

No grupo controle, previamente tratado (60 minutos) com o veículo (NaCl 0,9%), a injeção de ácido acético (1,2% em NaCl 0,9%) induziu $74 \pm 12,3$ contorções em 30 minutos. O pré-tratamento com o óleo *Pterodon pubescens* (300mg/kg) reduziu as contorções abdominais em 67% ($24 \pm 12,7$), enquanto a dipirona (200mg/kg), controle positivo, reduziu em 70% ($21 \pm 8,84$) (FIGURA 17).

4.2.2.2. Teste de Algesia induzida por calor

Nos animais controles, os tempos de reação ao estímulo térmico nociceptivo foram de $5,8 \pm 1,96$ s (tempo zero); $7,65 \pm 2,29$ s (30 minutos); $6,75 \pm 2,26$ s (60 minutos); $6,29 \pm 3,80$ s (90 minutos); $7,83 \pm 2,72$ s (120 minutos). O tratamento com o óleo de *Pterodon pubescens* (300mg/kg, n=6) ampliou a reatividade ao estímulo térmico para $11,93 \pm 3,0$ s (60 minutos). Enquanto, o controle positivo morfina (20mg/kg, n=6) ampliou a reatividade para $14 \pm 5,82$ s (60 minutos) e $11,21 \pm 4,91$ s (120 minutos) (FIGURA 18).

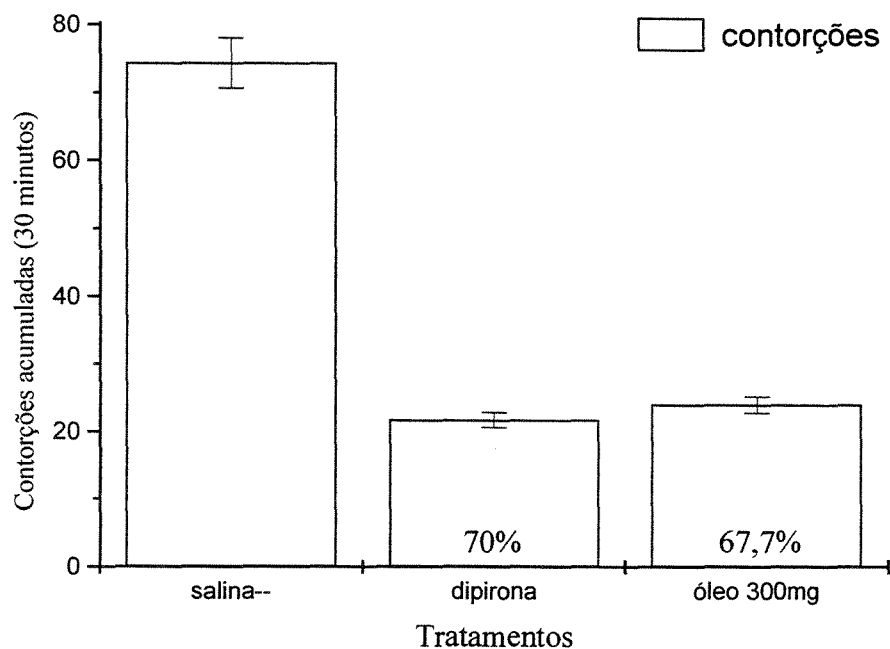


FIGURA 17: Número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (1,2%, 10ml/kg, i.p.) em camundongos pré-tratados pela via oral com o veículo (10ml/kg), com a dipirona ou com o óleo *Pterodon pubescens* (300mg/kg). As colunas e barras verticais representam as médias $\pm$ erro padrão de 8 à 10 animais por grupo experimental. ANOVA $F(2,18)=60,02$ * $p<0,001$. Teste de Duncan: * $p<0,001$

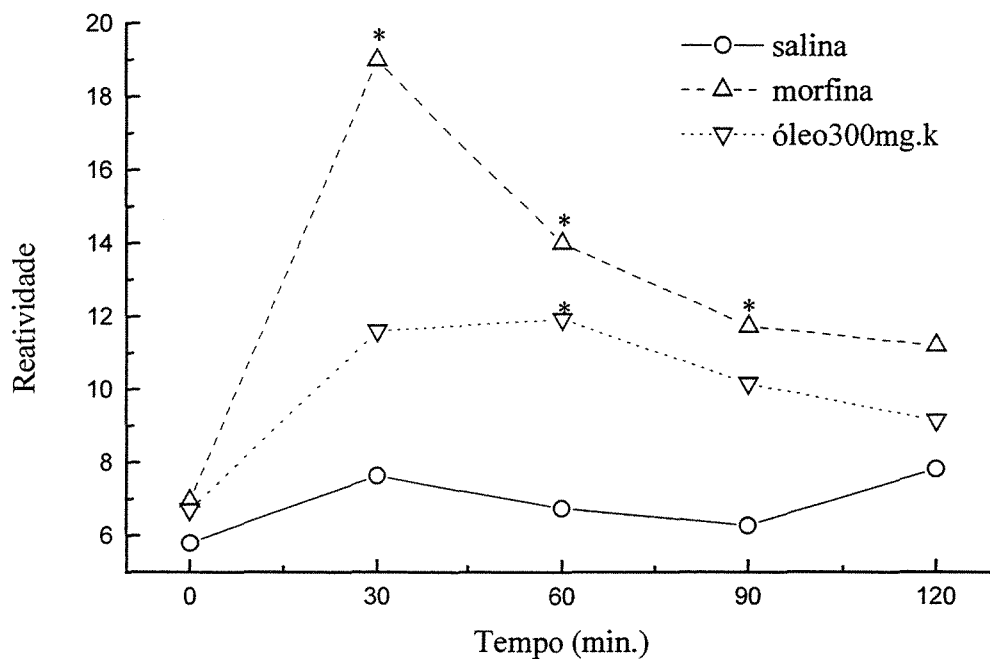


FIGURA 18: Reatividade ao estímulo térmico nociceptivo realizado em placa-quente em camundongos previamente tratados: O salina (10ml/kg); Δ morfina (20mg/kg); ▽ óleo (300mg/kg). ANOVA F(3,22): 30 min=2,64 $p<0,01$; 60 min=3,40 $p>0,05$ e $p<0,01$; 90 min= 3,16 $p>0,05$. Teste de Duncan: * $p<0,05$ e $p<0,01$.

4.2.3. Atividade antiproliferativa

TABELA 3: Densidade de inoculação das linhagens celulares tumorais humanas determinadas para os ensaios antiproliferativos

Linhagem celular	Densidade de Inoculação (células/compartimento)
MCF7	$6,5 \times 10^4$
NCI ADR	5×10^4
UACC 62	3×10^4
NCI 460	4×10^4

4.2.3.1. Curvas dose- resposta da Droga Padrão

Foram avaliados o perfil de quimiossensibilidade das linhagens celulares ao quimioterápico doxorubicina (DOX), controle positivo, com o objetivo de padronizar a resposta biológica das linhagens celulares a esta droga. Esta determinação é utilizada como controle de qualidade das culturas. O gráfico representa a curva dose resposta das células na presença de diferentes concentrações de DOX. A DOX, apresentou atividade citostática e citocida para todas as linhagens, exceto para a linhagem NCIADR que possui o fenótipo de resistência a múltiplas drogas.(FIGURA 19)

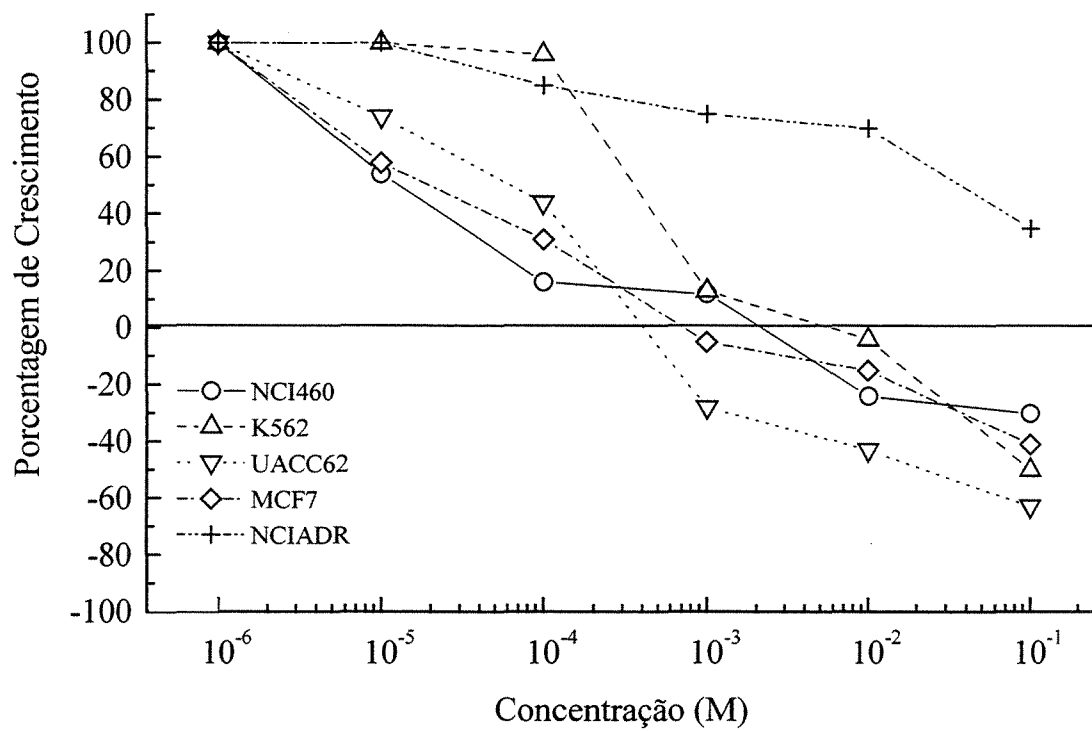


FIGURA 19: Atividade da doxorubicina (DOX) sobre as linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição.

4.2.3.2. Curvas dose- resposta de Drogas Antiinflamatórias

Foram avaliadas as atividades antiproliferativas de três diferentes classes de antiinflamatórios; Indometacina, Dexametasona e Meloxicam em linhagens celulares. O gráfico representa a curva dose resposta das células em presença de diferentes concentrações dos antiinflamatórios. O Meloxicam apresentou melhor perfil de atividade antiproliferativa. (FIGURAS 20,21,22)

4.2.3.3. Atividade antiproliferativa do óleo de *Pterodon pubescens* e da FR7- 6

Foram avaliadas as atividades antiproliferativas do óleo de *Pterodon pubescens* e da fração ativa em linhagens tumorais humanas. O gráfico representa a curva dose resposta das células na presença de diferentes concentrações do óleo de *Pterodon pubescens* e da fração ativa (FIGURAS 23 e 24).

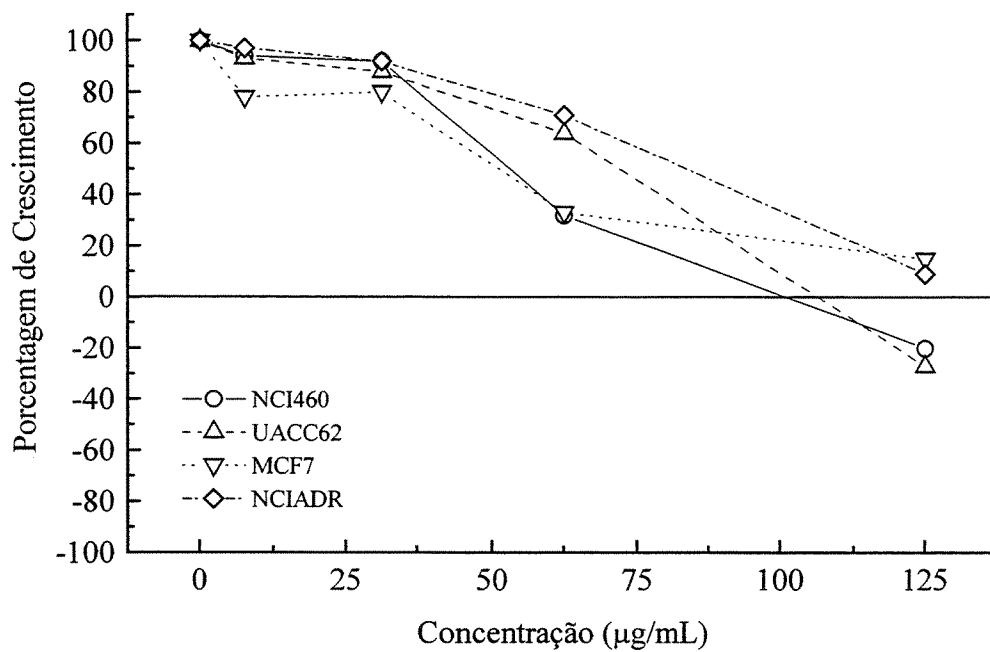


FIGURA 20: Atividade antiproliferativa da dexametasona sobre as linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição.

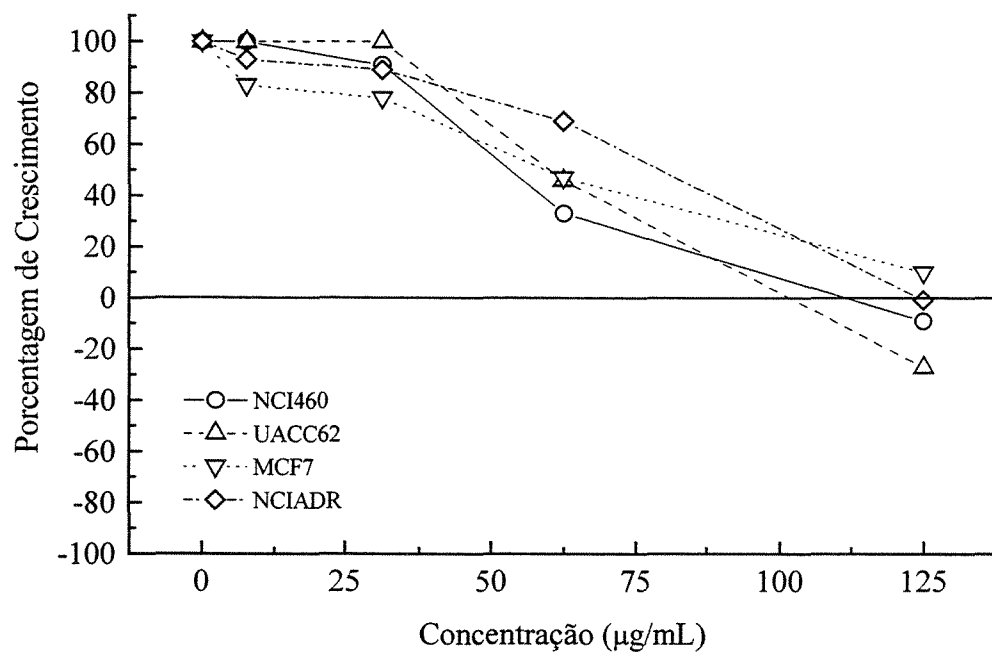


FIGURA 21: Atividade antiproliferativa da indometacina sobre as linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição.

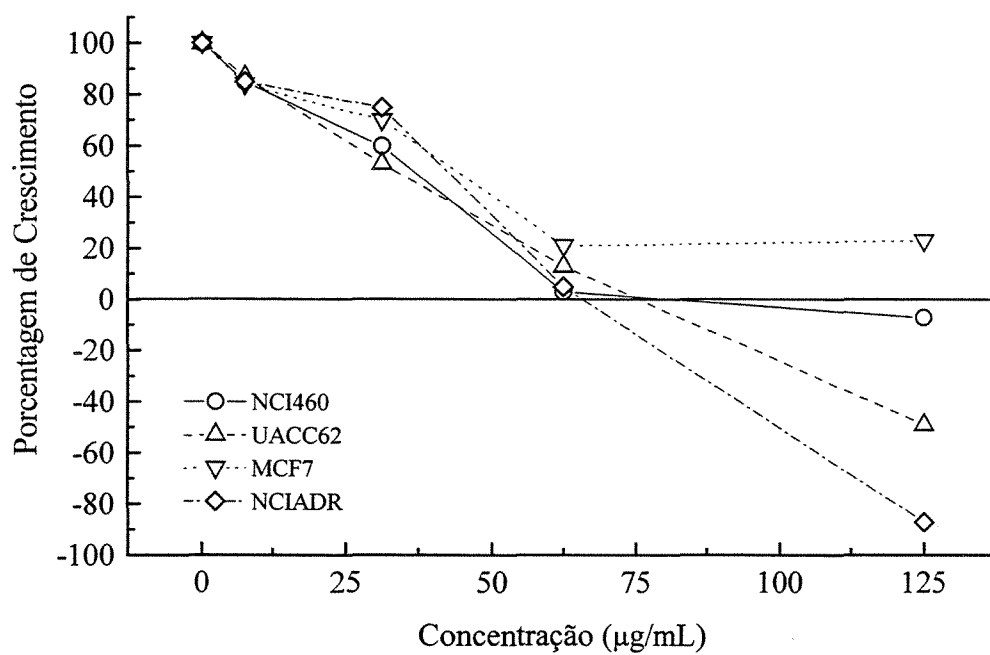


FIGURA 22: Atividade antiproliferativa do meloxicam sobre as linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição.

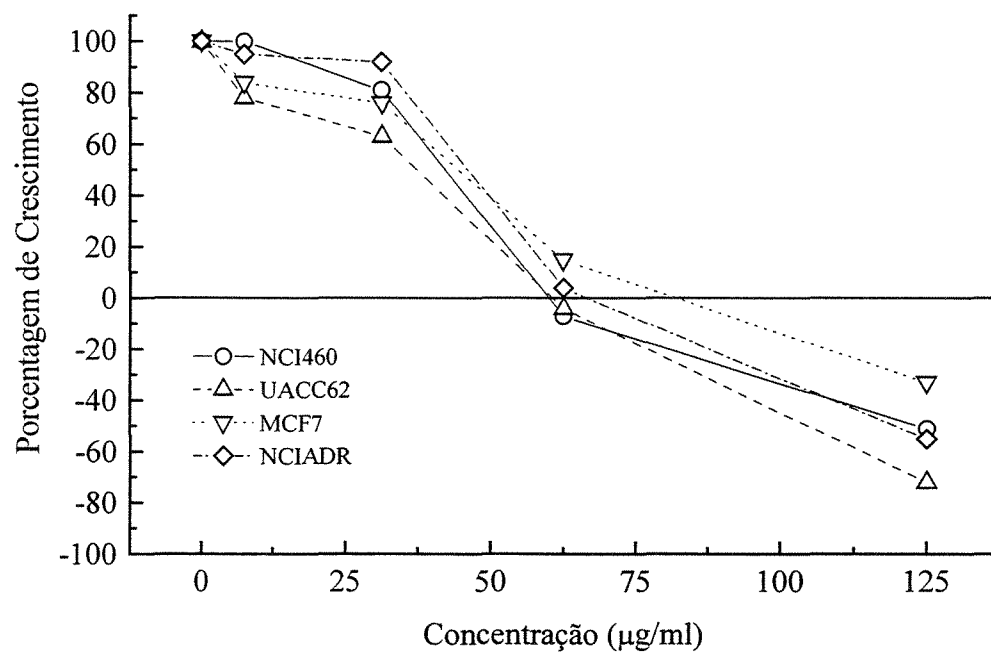


FIGURA 23: Atividade antiproliferativa do óleo de *Pterodon pubescens* sobre as linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição.

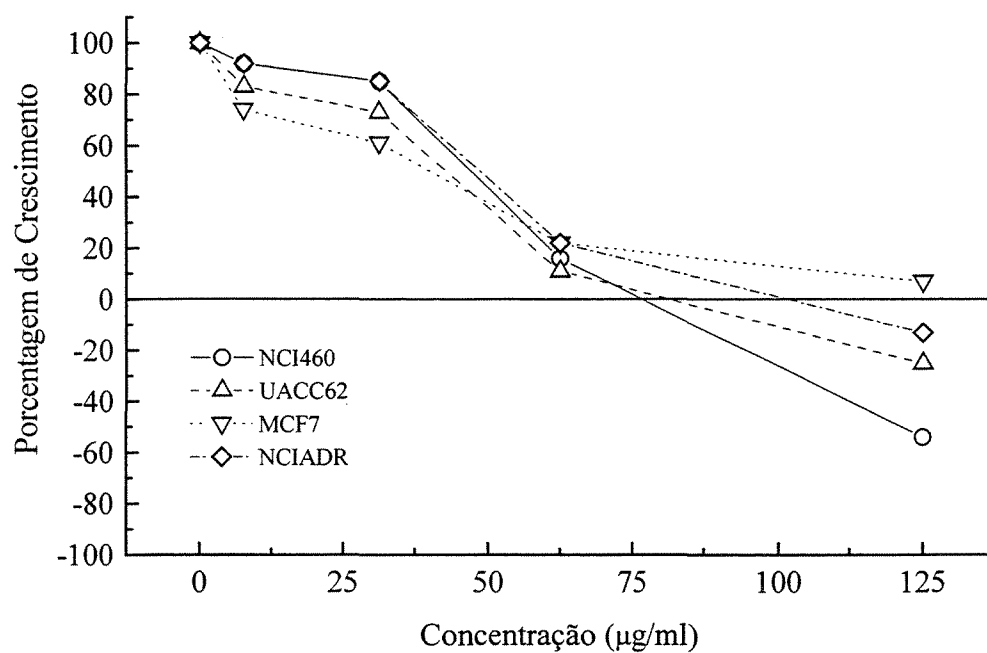


FIGURA 24: Atividade antiproliferativa da FR7-6 do óleo de *Pterodon pubescens* sobre as linhagens celulares tumorais humanas após 48 h de exposição.

4.2.4. Toxicologia

Peso corporal, níveis de glicose e análise anatomohistopatológica

O grupo tratado com o óleo de *Pterodon pubescens* na dose de 30mg/kg i.p., apresentou um aumento de peso de $28g \pm 3,0$, enquanto o controle negativo NaCl 0,9% (10ml/kg i.p.) apresentou um aumento de $18g \pm 10,0$ após 7 dias de tratamento. Ao final do experimento (14 dias) os pesos corporais dos animais controle negativo e *P. pubescens* (30mg/kg) foi de $52g \pm 6,99$ e $55g \pm 12,0$ respectivamente. Enquanto nas maiores doses de tratamento com o óleo de *P. pubescens* (100 e 300mg/kg) e a prednisona (controle positivo) ao final de 14 dias os animais tiveram um aumento menor de seus pesos corporais de $24g \pm 8,18$; $14g \pm 14,33$ e $43g \pm 4,49$, respectivamente.

As alterações histológicas do óleo de *Pterodon pubescens*, foram possíveis de serem avaliadas apenas na maior dose (300mg/kg). Os órgãos avaliados foram pulmão, coração, estômago, baço, fígado e rim.

A esplenomegalia correspondia histologicamente à hiperplasia pulpar nos animais tratados na dose de 300mg/kg. No estômago a ausência de pregas correspondia histologicamente à uma gastrite histológica, acompanhada de hiperplasia da mucosa na porção aglandular e edema da submucosa. No rim o óleo de *P. pubescens* ocasionou uma discreta nefrite intersticial. No fígado, histologicamente os hepatócitos apresentavam

vacuolização no citoplasma e núcleos picnóticos, indicando um sinal de degeneração celular.

Observamos um aumento na glicemia do grupo tratado com o óleo de sucupira 30mg/kg, os grupos tratados na dose de 300mg/kg tiveram uma diminuição significativa dos níveis de glicose e o controle positivo prednisona, não apresentou alteração significativa. (TABELA 4)

TABELA 4: Níveis de glicose após 14 dias de tratamento i.p.

Tratamento	n	Dose oral (mg/kg)	Glicose (mg/dl)*	Variação de Peso (g)
NaCl 0,9%	10	10	107,44 ± 14,59	56,83
Prednisona	10	2	108,81 ± 20,51	43,16
Óleo 30	10	30	138,44 ± 20,91	55,00
Óleo 100	10	100	105,77 ± 14,86	24,33
Óleo 300	10	300	73,68 ± 25,10	14,33

*média representativa dos valores em quadruplicata

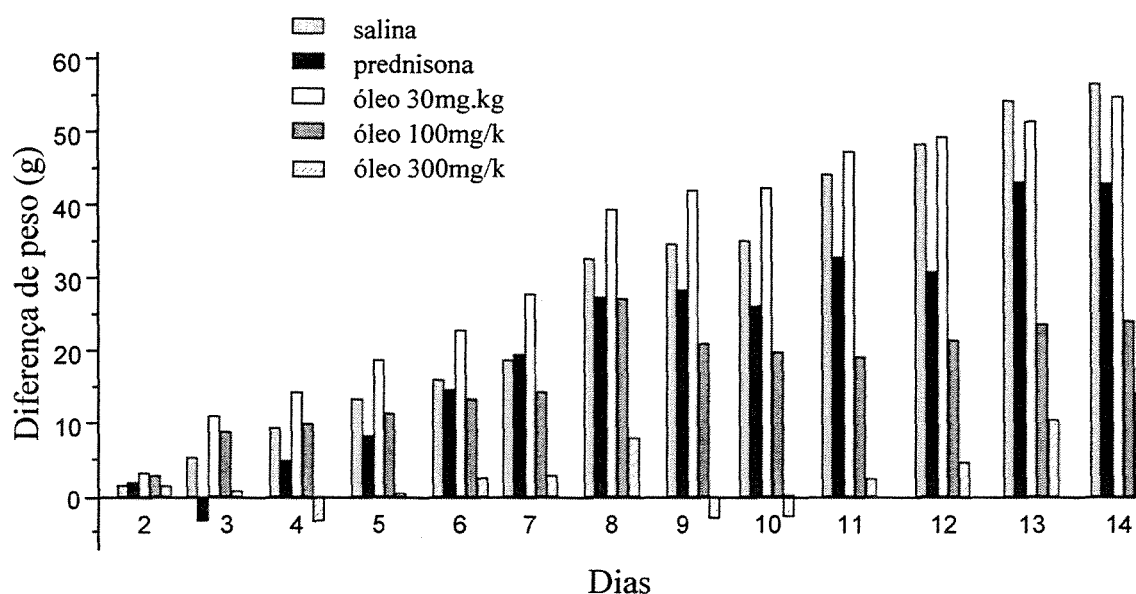


FIGURA 25: Peso corporal total de ratos *Ratus norvegicus* Wistar, durante 14 dias de tratamento, s.c. (salina 10ml/kg; prednisona 2mg/kg; óleo 30mg/kg; óleo 100mg/kg; óleo 300mg/kg) ANOVA F(4,45). 3 dias=9,33 ** $p>0,01$; 4 dias=8,51 *** $p>0,001$; 5 dias=10,04 *** $p>0,001$; 6 dias=13,25 *** $p>0,001$; 7 dias=16,88 * $p>0,05$ *** $p>0,001$; 8 dias=32,07 * $p>0,05$ *** $p>0,001$; 9 dias=67,95 * $p>0,05$ *** $p>0,001$; 10 dias=56,36 * $p>0,05$ *** $p>0,001$; 11 dias=84,41 ** $p>0,01$ *** $p>0,001$; 12 dias=53,82 *** $p>0,001$; 13 dias=55,00 ** $p>0,01$ *** $p>0,001$; 14 dias=55,02 ** $p>0,01$ *** $p>0,001$. Teste de Duncan: * $p>0,05$ ** $p>0,01$ e *** $p>0,001$.

5. DISCUSSÃO

A atividade farmacológica do óleo de *Pterodon pubescens* foi avaliada em modelos agudos de nocicepção (químico e térmico) e de inflamação.

A nocicepção induzida experimentalmente varia com o grau de consciência do animal e também com a presença de outras aferências sensoriais como o ambiente agressivo, as baixas temperaturas, o estresse ou a irritação local produzida por extratos vegetais contendo saponinas e taninos, quando injetados por via subcutânea ou intraperitoneal. Além disso, a maioria dos métodos de avaliação experimental da dor envolve uma resposta motora dos animais, de tal forma que resultados falso positivos podem ser obtidos caso os extratos ou os compostos testados produzam sedação e imobilização dolorosa, comprometendo a motricidade (Nodine e Siegler, 1964; Rates e Barros, 1994)

Na interpretação do edema como sinal de inflamação, limitações semelhantes devem ser consideradas pois sua formação depende da perfusão do tecido avaliado, da pressão sanguínea e dos níveis de glicocorticóides circulantes, podendo também determinar o aparecimento de resultados falso positivos (Rate e Barros, 1994; Souccar e Lapa, 1997).

Edema e derramamento de plasma ocorrem geralmente após, injúria da pele por agentes como calor, compostos químicos ou trauma. Diversos compostos têm produzido ações pró-inflamatórias em modelos experimentais de inflamação aguda (Correa, 1996).

A injeção intraplantar de carragenina é seguida de um aumento imediato da permeabilidade vascular, levando à exsudação de líquido e proteínas plasmáticas (edema) com migração leucocitária predominantemente de neutrófilos. Esse processo fisiopatológico envolve diferentes fases e liberação sequencial de diferentes mediadores da inflamação, como aminas biogênicas (histamina e serotonina), cininas, eicosanóides e óxido nítrico que têm comprovada participação no processo da inflamação (Giraldelo,1994; Medeiros,2001). A liberação desses mediadores acontece em fases distintas, onde inicialmente ocorre uma liberação de histamina e 5 HT, seguida por cininas e posteriormente predominantemente por prostaglandinas. (Di Rosa et al., 1970). Esse processo inflamatório é reduzido pela administração prévia de corticóides e antiinflamatórios não-esteroidais (Medeiros,2001).

A diferença básica do mecanismo de ação de drogas antiinflamatórias esteroidais e não esteroidais após inflamação por carragenina é evidente. Antiinflamatórios esteroidais impedem a produção, por múltiplas células, de fatores que são críticos na geração da resposta inflamatória; ocorrendo assim liberação diminuída de fatores vasoativos e quimiotáticos; secreção diminuída de enzimas disponíveis para síntese de intermediários de prostaglandinas; extravasamento diminuído de leucócitos e fibrose diminuída. Os não

esteroidais não afetam a mobilização de neutrófilos, mas impedem a síntese de intermediários de prostaglandinas (Strube, 1997).

O óleo de *Pterodon pubescens* promoveu uma inibição do edema de pata (de maneira dose dependente) após 3 e 4 horas da administração do agente flogístico, indicando que estudos posteriores deverão avaliar a participação dos mediadores tardios, como as prostaglandinas. Entretanto, considerando a natureza bifásica do edema de pata por carragenina, diversos estudos revelam que a segunda fase é sensível às drogas esteroidais e não esteroidais (Vinegar et al., 1976). Portanto, fica evidente a necessidade de outros experimentos para definir o possível mecanismo de ação envolvido.

Carvalho et al., em 1999 confirmou a atividade antiinflamatória do extrato hexânico das sementes de *Pterodon pubescens*, também pelo modelo de edema de pata induzido por carragenina utilizando uma dose de 500mg/kg, obtendo o pico máximo de inibição de edema na terceira hora após a administração do agente flogístico. O tratamento prévio com o extrato hexânico inibiu a formação do edema na segunda e terceira hora em 29 e 28% respectivamente, enquanto o controle positivo, indometacina inibiu 46 e 41% também após 2 e 3 horas, respectivamente. Os resultados do presente trabalho demonstraram uma efetividade no mesmo modelo, utilizando uma dose menor (300mg/kg). O óleo de *Pterodon pubescens* inibiu a formação de edema em 65% e 53% após 3 e 4 horas, respectivamente; enquanto a indometacina inibiu em 60 e 39% após 3 e 4 horas, respectivamente.

A bradicinina é um autacóide nonapeptídico que quando administrado na pata de rato produz vasodilatação intensa, dor, aumento de permeabilidade vascular com liberação de prostaglandinas. A bradicinina liga-se seletivamente ao receptor B2 (presente na maioria dos tecidos normais) que é acoplado às proteínas G, e ativa a fosfolipase A2 e a fosfolipase C. A fosfolipase C libera o trifosfato de inositol e conseqüentemente cálcio citosólico, e o diacilglicerol, que irá ativar a proteína quinase C (Tippmer et al, 1994). A fosfolipase A2 libera ácido araquidônico dos fosfolídeos ligados à membrana celular que poderá dar origem às prostaglandinas e leucotrienos (Lima P., 1994).

A bradicinina exerce uma variedade de efeitos biológicos no endotélio (promove a liberação de NO, prostaciclina, fator hiperpolarizante derivado do endotélio) e na circulação periférica, onde induz vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo. Pode ainda, promover extravasamento do plasma e vasoconstrição nos vasos cujo endotélio está danificado. Nos estados inflamatórios como asma, alergia, traumas; as cininas promovem migração celular do sangue para os tecidos e ativam vários componentes teciduais como; mastócitos, fibroblastos, macrófagos, células do sistema imune, musculatura lisa em quase todos os órgãos, sistema nervoso autônomo e nervos sensoriais. (Regoli et al., 1998)

Há evidências que as cininas são rapidamente geradas após injúria tecidual e modulam a maioria dos eventos que ocorrerem durante o processo inflamatório como; vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, extravasamento do plasma, migração celular, dor e hiperalgesia (Calixto, 2000).

Muitos autores tem demonstrado que receptores B2 são responsáveis por mediar a maioria das respostas inflamatórias agudas provocadas por bradicinina. Antagonistas de receptores B2 mostraram-se efetivos no bloqueio de respostas inflamatórias induzidas em cobaias, ratos e camundongos, principalmente em edema de pata e pleurisia induzidos por bradicinina e carragenina. Alguns autores tem proposto que a ativação de receptores B2 estão presentes no início do processo inflamatório (Calixto, 2000).

Embora o óleo de *Pterodon pubescens* tenha reduzido o edema de pata produzido pela bradicinina, não é possível ainda, concluir que os princípios ativos desse óleo tenham interação direta com os receptores da bradicinina ou atuem numa segunda etapa, inibindo a síntese de prostaglandinas. A ação vasodilatadora da bradicinina se deve, em parte, ao fato de que, ao agir sobre células endoteliais, ela estimula a fosfolipase A2, gerando PGI₂. Os antiinflamatórios não esteroidais inibindo a ação de proteínas vasodilatadoras (PGE₂, PGI₂ e PGD₂) diminuem a vasodilatação também sinergicamente provocada por mediadores vasodilatadores como a histamina e a bradicinina (Rang e Dale, 1995).

A histamina é uma substância conhecida por aumentar a permeabilidade vascular, onde a abertura de poros endoteliais levará a um aumento do extravasamento de proteínas do plasma. Em adição aos efeitos vasculares, a histamina excita neurônios aferentes de pequenos diâmetro e provoca a liberação de mediadores vasoativos nas terminações nervosas. Portanto, a formação de edema induzido por histamina pode apresentar consequências vasculares, bem como ações neuronais (Amann et al., 1995). O óleo de *Pterodon pubescens* promoveu uma inibição do edema de pata produzido por histamina

após 30 minutos da administração de histamina. Esse modelo não é capaz de definir o possível mecanismo de ação, entretanto sabe-se que a ação de antiinflamatórios esteroidais seria bastante eficaz, uma vez que essas drogas reduzem a liberação de histamina pelos basófilos. Já os AINES reduziriam o edema com menor intensidade, por agirem de maneira indireta (a vasodilatação facilita e potencia a ação de mediadores como a histamina, que aumentam a permeabilidade das vênulas) (Amann et al., 1995).

Esse resultado sugere a necessidade de uma confirmação através de outro modelo ou injeção de outra substância que promova a liberação de histamina, como por exemplo; composto 48/80 ou dextrana. Carvalho et al., 1999, utilizando-se do mesmo modelo, não obtiveram inibição do edema de pata produzido por histamina. Da mesma forma não obtiveram efeito em modelo de edema de pata induzido por dextrana que libera sequencialmente histamina e serotonina. Provavelmente essas diferenças também podem estar relacionadas à fatores como: formas de obtenção do material (prensagem para obtenção do óleo e extração com hexano); diferentes teores de princípios ativos, por se tratarem de plantas diferentes.

Corticóides adrenais são conhecidos como substâncias antiinflamatórias. Esses efeitos antiinflamatórios são atribuídos em parte à síntese de lipocortinas, uma família de proteínas induzidas por glicocorticóides com atividade anti-fosfolipase. Lipocortinas reduzem o edema de pata induzido por carragenina através da inibição da liberação do ácido araquidônico dos fosfolípidos de membrana (Landucci, et al., 1995).

Durante o processo inflamatório o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal é estimulado aumentando os níveis de glicocorticóides circulantes. Sob ação desses hormônios, a liberação de fatores vasoativos e quimiotáticos é inibida, simultaneamente à redução de secreção de enzimas lipolíticas, proteolíticas e da fibrose, e a diminuição do extravasamento de leucócitos na área da lesão (Garcia Leme, 1981; Garcia Leme et al., 1992; Chrousos, 1995).

Em 1984 Munk et al. sugeriram que as ações antiinflamatórias e imunossupressoras desempenham papel fisiológico proeminente, pois previnem o “transbordamento” das reações de defesa extremamente poderosas do organismo, que do contrário poderiam a hemostasia. O fato de que a magnitude e a duração da inflamação aumentam muito nos ratos adrenalectomizados em comparação com os ratos submetidos a uma operação simulada proporciona apoio experimental para essa hipótese (Rang & Dale, 1995).

O óleo de *Pterodon pubescens* manteve sua atividade antiedematogênica no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos adrenalectomizados. Esse resultado elimina a exclusividade da atividade antiinflamatória por corticóides endógenos e por sua vez, confirma a ação do óleo de *Pterodon pubescens*. O grupo falso operado confirmou o sucesso da operação, uma vez que a intensidade na formação do edema foi menor quando comparado ao grupo NaCl 0,9% (controle negativo).

O óleo de cróton é um agente flogístico altamente irritante que, pode produzir uma reação inflamatória caracterizada por vasodilatação, edema, e migração leucocitária. Em

muitos casos pode ocasionar a degeneração da orelha com inchaço da cartilagem, necrose, infiltração granulocitária e hemorragia. Esse modelo é utilizado com frequência para demonstrar a ação tópica de novas drogas antiinflamatórias (Tubaro,1995). Na dermatite provocada pela aplicação de óleo de cróton, o óleo de *Pterodon pubescens* (via oral) inibiu o edema, confirmando uma ação antiinflamatória. Drogas esteroidais são inibidores efetivos dessa reação inflamatória, enquanto o efeito de antiinflamatórios não esteroidais não é evidente ou constante (Tubaro,1995). Entretanto, o resultado obtido nesse modelo, não define o grupo de drogas antiinflamatórias ao qual os princípios ativos existentes no óleo de *Pterodon pubescens* possam pertencer.

O modelo químico de nocicepção escolhido foi o das contorções abdominais em camundongos, que se baseia na contagem das contrações da parede abdominal seguidas de torção do tronco e extensão dos membros posteriores (writhing), como resposta reflexa à peritonite produzida e consequente a ativação de receptores de dor, por mediadores ou substâncias pró-inflamatórias; por redução de pH ou por uma estimulação mecânica (Brito et al., 2001). Introduzido por Sigmund e colaboradores (1957) utilizando fenilquinona, o teste foi posteriormente padronizado com outros agentes como ácido acético, bradicinina, ácido araquidônico, caolim entre outros (Whittle,1964; Dubinsky et al., 1987; Fujiyoshi et al., 1989; Rates e Barros, 1994; Lapa e De Lima, 1998)

Neste teste, a reação dolorosa é sensível a drogas de atividade analgésica semelhantes à aspirina, aos antagonistas de receptores cininérgicos e aos analgésicos opióides de ação central e periférica (Siegmund et al., 1957; Vacher et al., 1964; Smith et

al., 1982; Steranka et al., 1987, Brignola et al., 1994; Barber et al., 1994). Dados da literatura mostram neste modelo uma boa correlação entre potência e eficácia clínica de drogas analgésicas (Siegmund et al., 1957).

A importância das prostaglandinas no desenvolvimento da dor inflamatória, tem sido confirmada por estudos em camundongos deficientes de receptores de prostaglandinas, com uma redução na resposta às contorções abdominais por ácido acético quando comparadas aos animais normais (Belleruche, 1998).

Os resultados do presente estudo demonstraram que, no modelo das contorções abdominais pelo ácido acético, o óleo de *Pterodon pubescens* inibiu em 67% o número de contorções abdominais, onde utilizamos para esse experimento a dipirona como controle positivo, que apresentou uma inibição de 70%. A resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético ocorre, provavelmente pela liberação de mediadores algícos endógenos, principalmente bradicinina, histamina, serotonina e as prostaglandinas que, através da estimulação das terminações nociceptivas, desencadeariam a sensação dolorosa. Entretanto, devido a baixa especificidade da resposta antinoceptiva neste teste, ensaios complementares são necessários para a interpretação dos resultados, pois uma variada gama de compostos essencialmente não analgésicos como anti-histamínicos, parassimpatomiméticos, estimulantes do SNC, inibidores da MAO, antagonistas serotoninérgicos, neurolépticos e bloqueadores adrenérgicos podem também inibir essas contorções. (Rates e Barros, 1994)

A analgesia moderada produzida por exemplo pelo ácido acetilsalicílico e pela indometacina é explicada pela inibição da atividade da cicloxigenase e redução da síntese de prostaglandinas (Vane,1971). Entretanto, nos testes padrões em animais nos quais se induz uma reação inflamatória, tem sido difícil separar a influência da atividade antiinflamatória destes compostos, de um efeito analgésico singular (Hunnskaar et al., 1986).

A atividade antinociceptiva do óleo de *Pterodon pubescens*, também foi estudada no teste da placa quente (hot plate) em camundongos. Este modelo mede o tempo de reação do animal a um estímulo térmico (Woolfe e McDonald, 1994) sendo semelhante ao teste do tail-flick descrito por D'amour e Smith (1941).

O tratamento com o óleo de *Pterodon pubescens* pela via intraperitoneal, utilizando a morfina como controle positivo, mostrou um aumento do tempo de reação ao estímulo térmico. Esse ensaio é sensível a drogas opióides tipo morfina (Janssen et al., 1963), cuja atividade analgésica é mediada por receptores μ , κ e δ , distribuídos tanto periféricamente como no SNC (Elmer et al., 1998; Tornos et al., 1999).

O óleo *Pterodon pubescens* foi fracionado através do uso de cromatografia em coluna seca dando origem à sete frações; das quais três delas foram separadas por apresentarem perfis cromatográficos bem distintos e avaliadas pelo modelo de edema de pata induzido por carragenina. A fração número 7, a de menor polaridade, apresentou melhor atividade, confirmada posteriormente pela realização de curva dose-resposta em

modelo de inflamação. Estudos fitoquímicos revelaram a presença majoritária de terpenos na fração ativa, indicando a possibilidade desses compostos serem responsáveis pela atividade antiinflamatória do óleo de *Pterodon pubescens*.

A atividade do óleo de sucupira diminuindo o edema provocado por carragenina, bradicinina, histamina e óleo de cróton sugere atividade semelhante aos esteróides adrenais. No entanto a participação exclusiva de esteróides adrenais foi excluída com a manutenção da atividade antiedematogênica em animais adrenalectomizados. Dessa forma a presença de esteróides no óleo poderia justificar os efeitos obtidos. No entanto, até o momento, foram identificados somente compostos terpenóides no óleo de sucupira. A biossíntese de terpenos e esteróides em plantas tem uma via comum, ramificando-se nas etapas finais. Portanto, é possível que estruturas muito próximas às dos esteróides sejam responsáveis pelos efeitos obtidos. Outra alternativa, seria a presença de grupos funcionais semelhantes aos dos esteróides. A elucidação estrutural dos princípios ativos desse óleo poderá colaborar na determinação do mecanismo de ação do óleo de *Pterodon pubescens*.

300 mg/kg.. Além dessas alterações o grupo tratado com a dose de 300 mg/kg, apresentou esplenomegalia, gastrite, nefrite e degeneração hepática., que se assemelham aos danos causados pelos antiinflamatórios.

O baço atua como órgão filtrante para o sangue. As células fagocitárias do baço removem do sangue circulante partículas estranhas, inclusive bactérias, leucócitos em degeneração. (Bailey, 1973) A esplenomegalia correspondia histologicamente à hiperplasia pulpar nos animais tratados na dose de 300mg/kg.

A irritação gástrica está relacionada à ação direta sobre a mucosa e com a inibição da síntese de prostaglandinas gástricas, em especial a PGE2 e a prostaciclina PGI2 que modulam a secreção gástrica e promovem a secreção de um muco protetor pelo intestino. A inibição da síntese dessas prostaglandinas pode tornar o estômago mais susceptível à lesão (Oga, 1996). A análise anatômica do estômago, mostrou uma ausência de pregas que correspondia histologicamente à uma gastrite, acompanhada de hiperplasia da mucosa na porção aglandular e edema da submucosa; caracterizando uma toxicidade gástrica do óleo de *P.pubescens*.

O rim possui várias funções importantes. Excreta uréia e outros produtos nitrogenados, elimina substâncias estranhas ao organismo e, pela eliminação do excesso de água mantém constante o volume de sangue sendo o principal órgão de eliminação de drogas (Bailey, et al., 1973). O óleo de *Pterodon pubescens* provocou uma discreta nefrite

intersticial. Como as prostaglandinas são importantes para o suprimento sanguíneo renal, a inibição de sua síntese provoca lesão renal e insuficiência hepática.

O fígado, constitui o principal órgão de eliminação de drogas. Parte da hepatotoxicidade de esteróides é decorrente da formação de metabólitos que interferem na eliminação da bilirrubina. Ocorre êxtase e acúmulo de bile nos capilares biliares da porção central do lóbulos hepáticos, sem obstrução dos ductos maiores. As células hepáticas geralmente sofrem apenas pequenas mudanças histológicas e continuam viáveis (Oga,1996).

A degeneração celular caracteriza-se por alterações nos componentes celulares. Entre as principais causas de degeneração celular estão: deficiência de nutrientes essenciais para a célula; lesão mecânica, térmica ou elétrica; ou intoxicação química (Hopps, 1989). No tratamento com o óleo de *Pterodon pubescens* histologicamente os hepatócitos apresentavam vacuolização no citoplasma e núcleos picnóticos, indicando um sinal de degeneração celular. O uso crônico de doses elevadas de inibidores de síntese de prostaglandinas também pode provocar hepatite.

Como foi demonstrado o óleo de *Pterodon pubescens* apresentou uma atividade antiinflamatória em modelo animal. Atualmente, diversos estudos sugerem o uso de inibidores da COX2 na prevenção do câncer. Em células normais do epitélio intestinal transfectadas com ciclooxigenase-2, ocorreram mudanças fenóticas similares às aquelas encontradas em células malignas, como por exemplo, resistência à apoptose (Ota et al.,

1999). Estudos imunohistoquímicos tem mostrado que a expressão da COX2 não está presente em células tumorais, mas em células epiteliais. Isso conduz à hipótese de que o mecanismo de ação dos AINES, suprimindo a carcinogênese de cólon, está relacionado em parte, através da supressão de um fator produzido por fibroblastos, o fator de crescimento do hepatócito (HGF), que inibe a produção de prostaglandinas.(Ota et al., 1999).

Dessa forma, o óleo de *Pterodon pubescens* e a fração ativa forma avaliados em cultura de células tumorais humanas. Para comparação foram realizados experimentos com a dexametasona, indometacina e meloxicam.. Em cultura de células neoplásicas de mama (MCF 7), mama resistente (NCI-ADR), melanoma (UACC-62) e rim (NCI-460), o óleo de sucupira e sua fração ativa apresentou atividade citostática e citocida concentração dependente. A indometacina, inibidor não seletivo da COX e o corticóide dexametasona, apresentaram discreta atividade citostática e citocida nas linhagens celulares. Já o meloxicam, inibidor seletivo da COX-2 foi mais potente e eficaz. Os resultados obtidos em cultura de células tumorais aliados aos efeitos antiedematogênicos, reforçam a hipótese de que a inibição da síntese de prostaglandinas está envolvida no mecanismo de ação do óleo de sucupira. No entanto, outros efeitos relacionados com essa atividade antiproliferativa devem ser investigados.

Esses resultados também estimulam o processo de isolamento e identificação dos princípios ativos do óleo de sucupira pois, os testes em cultura de células tumorais consomem baixas quantidades de extratos e princípios ativos, quando comparados com

testes *in vivo*. Muitas vezes o uso de modelos animais acaba inviabilizando o monitoramento do processo de isolamento e identificação de princípios ativos em virtude do baixo rendimento desses processos. Já a cultura de células tumorais vai permitir esse monitoramento.

6. CONCLUSÃO

O óleo de *Pterodon pubescens* é indicado na medicina popular para doenças que envolvem dor ou processos inflamatórios. Estudos farmacológicos anteriores, revelaram atividades antiinflamatória do extrato hexânico dessa espécie, sem entretanto ter identificado sua fração ativa.

A atividade antiinflamatória e antinociceptiva do óleo de *Pterodon pubescens*, foi confirmada e a identificação da fração ativa realizada através de modelo animal. Esse efeito foi mantido no edema de pata induzido por carragenina em ratos adrenalectomizados, sugerindo dessa forma sua ação ser independente da liberação de corticóides endógenos. A atividade antiedematogênica foi confirmada nos modelos de pata produzidos por histamina e bradicinina. Essa atividade foi reproduzida no modelo edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton.

No modelo de nociceção químico o óleo de *Pterodon pubescens* inibiu o número de contorções abdominais pelo ácido acético. O efeito nociceptivo foi confirmado no teste da placa quente ocorrendo um aumento do tempo de reação ao estímulo térmico.

O óleo de *Pterodon pubescens* apresentou toxicidade após 14 dias de administração na dose considerada efetiva em modelos de inflamação e dor, evidenciada por hipoglicemia, diminuição no peso corporal e pelas análises anatomohistopatológicas. A toxicidade foi confirmada *in vitro* em cultura de células tumorais humanas. O óleo e a

fração ativa (FR 7-6) de *Pterodon pubescens*, apresentaram atividade antiproliferativa concentração-dependente, apresentando citotoxicidade na maioria das concentrações estudadas. A fração ativa apresentou uma curva concentração bastante semelhante à do meloxicam, confirmando a hipótese de que a prostaglandinas produzidas pela ciclooxigenase -2 estarem possivelmente relacionadas ao crescimento tumoral.

Análises cromatográficas permitiram identificar terpenos presentes na fração ativa que em breve terão sua estrutura química elucidada. Esses compostos provavelmente seriam responsáveis pela atividade antiinflamatória dessa espécie .

Os resultados sugerem a continuidade na investigação do mecanismo de ação dos terpenos identificados na fração ativa, para a determinação do composto ativo e para elucidação de sua estrutura química. Além disso, a realização de estudos em modelos de toxicidade, acompanhados de modelos crônicos de inflação, à fim de se confirmar a segurança no uso terapêutico dessa espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alice, C.B.; Siqueira, N.C.S.; Mentz, L.A.; Silva, G.; José K.F.D. **Plantas Mediciniais de Uso Popular. Atlas farmacognóstico**: 1a ed, Canoas, Ulbra: 9, 1995.
- Bailey, F.R.; Copenhaver, W.; Bunge, R.; Bunge, M. **Histologia** 16 ed., 1973.
- Belch, J.J.F.; Hill, A. Evening primrose oil and borage oil in rheumatologic conditions. **Am J Clin Nutr.**71: 352S-6S,2000
- Belleroche, J.S. and Hay, C.H. Dexamethasone prevents the induction of COX-2 mRNA and prostaglandins in the lumbar spinal cord following intraplantar FCA in parallel with inhibition of oedema **Neuropharmacology** 37:: 739-744, 1998.
- Bodin, P.; Burnstock, G. Increased release of ATP from endothelial cells during acute Inflammation. **Inflammation. Res.** 47:351-354, 1998.
- Brito, G.A.C.; Saraiva, S.N.R.; Falcão, J.L.A.A.; Vale, M.L. Lima, A.A.M.; Cunha, F.Q. Ribeiro, R.A. Dual Effect of cAMP on the writhing response in mice. **European Journal of Pharmacology** 416: 223-230, 2001.
- Brooks, P.M.; O Day, R. COX-2 inhibitors. **MJA**: 173: 433-436, 2000.
- Calixto, J.B.; Cabrini, D.A.; Ferreira, J.; Campos, M.M. Kinins in pain and inflammation. **Pain** 87:1:5, 2000.

- Calixto, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**. **33**:179-189, 2000.
- Carvalho, J.E. Fitoterápicos: Alimentos ou Medicamentos? III Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos. Campinas, SP, 16 a 19 de novembro de 1999.
- Carvalho, J. C. T., Sertié, J. A.A.; Barbosa, M. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog **Journal of Ethnopharmacology** **64**: 127-133, 1999.
- Chang, J. Medicinal Herbs: Drugs or Dietary Supplements? **Biochemic Pharmacology** **59**: 211-219, 2000.
- Cicala, C.; Cirino, G. Linkage between inflammation and coagulation: an update on molecular basis of crosstalk. **Life Science** **62(20)**: 1817-1824, 1998.
- Cirino, G. Multiple controls in inflammation. **Biochemical Pharmacology**, **55**:105-111, 1998.
- Cirino, G; Napoli, C.; Bucci, M.; Cicala, C. Inflammation-coagulation network: are serine Proteases receptors the knot? **TIPS** **20**:170-173, 2000.
- Coelho, M. G. P.; Marques, P. R.; Gayer, C. R. M.; Vaz, L.C.A.; Neto, J. F. N.; Sabino, K. C.C. Subacute toxicity evaluation of a hydroalcoholic extract of *Pterodon pubescens* seeds in mice with collagen-induced arthritis. **Journal of Ethnopharmacology** **77**:159-164, 2001.

- Cohran, J.B.; Genovese, F.; Ogura, S.; Teti, G.; Cook, J. Effect of nitric oxide donors and nitricoxide synthase inhibitors in neonatal rat endotoxic shock. **Biochemical Pharmacology**,**58**:687-691, 1999.
- Coltren, H.R. Tissue-specific regulation. **J. Appl. Physiol.**, **72(1)**:1-7, 1992.
- Cragg, G. M., Newman, D. J. Discovery and Development of Antineoplastic Agentes from Natural Sources. **Cancer Investigation**, **17(2)**, 153-163, 1999.
- Davies, P. Macrophages. **Blackwell Scientific Publication**,**5**:64-74.,1994.
- Dworski, R.; Sheller, J.R. Differential sensitives of human blood monocytes and alveolar macrophages to the inibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by IL-4. **Prostaglandins** **53**: 237-251, 1997.
- Duarte, I. D. G.; Alves, D. L. F. ; Veloso, D. P.; Nakamura-Crag, M. Evidence of the involvement of biogenic amines in the antinociceptive effect s vouacapan extrated from *Pterodon polygalaeflorus* Benth **Journal of Ethnopharmacology** **55**:13-18, 1996.
- Eckly AM, Marin V, Lugnier C. Involvement of cyclic nucleotide dependent protein kinases in cyclic AMP-mediated vasorelaxation. **British Journal of Pharmacology** **122**, 158-164, 1997
- Ferri, M.G. *Plantas do Brasil. Espécies do cerrado*. Editora Edgard Blücher. São Paulo, 1969, p.12-13 and p 50-1.

- Filho, V.C.;Yunes, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceito sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova** **21(1)**: 99-104, 1998.
- Foglio, M.A.; Rehder, V.L.G.; Queiroga, C.L.; Santos, A Da S.; “ Coluna Cromatografica Seca Para Separações Preparativas Com Resolução Moderada”; 22^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG, 25 a 28 de maio de 1999
- Folch, E.; Closa, D.; Prats, N.; Gelpí, E.; Catafau-Roselló. Leukotriene generation and neutrophil infiltration after experimental acute pancreatitis. **Inflammation.**, **22(1)**:83-87,1998.
- Foreman,K.E.; Glovsky, M.M.; Warner, R.L.; Horvath, S.J.; Ward, P.A. Comparative effect of C3a and C5a on adhesion molecule expression on neutrophils and endothelial cells.**Inflammation.**, **20(1)**: 1-8, 1996.
- Fraser, D. Animal ethics and animal welfare science: bridging the two cultures. **Applied Animal Behaviour Science** **65**: 171-189, 1999.
- Furchgott, R.F.; Zawadski, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial muscle by acetylcholine. **Nature** **288**: 373-376, 1980.
- Gahmberg, C.G.; Valmu, L.; Fagerholm, S.; Kotovuori, P.; Ihanus, E.; Tian, L.; Morikawa P. Leukocyte integrins and inflammation. **Cellular and Molecular Life Science** **80**:549-555, 1998.
- Garcia-Pastor, P; Randazzo, A.; Paloma, L.G.; Alcaraz, M.J.; Paya, M. Effects of Petrosaspongiolide M, a Novel Phospholipase A. Inhibitor, on Acute and Chronic Inflammation. **Pharmacology and Experimental Therapeutics** **289**:166-172, 1999.

- Gualillo, O.; Eiras, S.; Lago, F.; Diéguez, C.; Casanueva, F.F. Elevated serum leptin concentrations induced by experimental acute inflammation. **Life Sciences** **67**: 2433-2441, 2000.
- Hamburger, M.; Hostettmann, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**: **30 (12)**: 3864-3874, 1991.
- Hamburger, M.; Marston, A.; Hostettmann, K. Search for new drugs of plant origin. **Advances in Drug Research**, **20**: 167-169, 1991.
- Heiman, A. S.; Ko, D.H.; Chen, M.; Lee, H.J. New steroidal anti-inflammatory antedugs: Methyl 3,20-dioxo-9 α -fluoro-11 β ,17 α -carboxylate and methyl 21-acetyloxy-3,20-dioxo-11 β ,17 α -dihydroxy-9 α -fluoro-1,4-pregnadiene-16 α -carboxylate **Steroids** **62**: 491-499, 1997.
- Hopps, H. C. **Patologia** 5 ed. pp 82-83, 1989.
- Huguet, A. I.; Recio, M. del C.; Máñez, S.; Giner, R.M.; Ríos, J.L. Effect of triterpenoids on the inflammation induced by protein kinase C activators, neuronally acting irritants and other agents. **European Journal of Pharmacology** **410**: 69-81, 2000.
- Hunskar, S.; Berger, O.G.; Hole, K. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. **Pain** **25**: 125-132, 1986.
- Ishii, S.; Shimizu, T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. **Progress in Lipid Research** **39**: 41-82, 2000. Izzo, A.A.; Costa M.; Mascolo, N.; Capasso, F. The role of histamine H1, H2 and H3 receptors on

- enteric ascending synaptic transmission in the guinea pig ileum. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **287**:952-957, 1998.
- Jagels, MA.; Daffern, P.J.; Hugli, T.E. C3a and C5a enhance granulocyte adhesion to Endothelial and epithelial cell monolayers: epithelial and endothelial priming is require for C3a-induced eosinophil adhesion. **Immunopharmacology** **46**: 209-222., 2000.
- Janero, D.R. Forum: Therapeutic Application of Reative Oxygen and Nitogen Species in Human Disease,. **Free Radical Biology & Medicine** **28(10)**: 1495-1506, 2000.
- Jansen-Olesen; Ottosson, A.; Cantera, L.; Strunk, S.; Lassen, L.H.; Olessen, J.; Mortensen, A.; Engel, U.; Edvinsson, L. Roe of endothelium and nitric oxide in histamine-induced responses in human arteries and detection of mRNA encoding H₁ and H₂- receptors by RT-PCR. **British Journal of Pharmacology** **121**: 41-48, 1997.
- Junger, H.; Sorkin, L.S. Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNF α . **Pain** **85**:145-151, 2000.
- Kam, P.C.A.; See, A.U-L. Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role. **Anaesthesia** **55**:442-449, 2000.
- Kilgore, K.S.; Ward, PA.; Warren, J.S. Neutrophil adhesion to human endothelial cells is induced by the menbrane attack complex: The role of P-selectin and platelet activating factor.**Inflammation**., **22**:583-597, 1998.
- Klaassen, C.D. **Toxicology – The Basic Sciece of Poisons** 5 ed., 1996.
- Kostner, R.; Anderson, M.; De Beer, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.**,**18**:412, 1959.

- Langenbach, R., Loftin, C., Lee, C., Tiano, H. Cyclooxygenase Knockout Mice – Models for elucidating isoform specific functions. **Biochem. Pharmacol.** **58**: 1237-1246, 1999.
- Lima Pereira, F.E.; Bogliolo, L. **Inflamações. Etiopatogênese geral das doenças** :20-45, 1994. Male D, Roitt I. Introdução ao sistema imune. Texto de imunologia 4ta ed. Por Roitt Brostoff, Male. Cap1.p:1.2-1.12, migração celular e inflamação. Cap 14p:14.2-14.8, 1994.
- Linardi, A.; Costa, S.K.P.; Silva, G.R.; Antunes, E. Involvement of Kinins, mast cells and sensory neurons in the plasma exudation and oedema induced by staphylococcal enterotoxin B in mouse. **European Journal of Pharmacology** **399**: 235-242, 2000.
- Máñez, S.; Recio, M.C.; Giner, R.M.; Ríos J.L. Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. **European Journal of Pharmacology** **334**:103-105, 1997.
- Marathe, G.K.; Harrison, K.A.; Murphy, R.C.; Prescott, S. M.; Zimmerman, G.A.; McIntyre, T.M. Bioactive phospholipid oxidation products. **Free Radical Biology & Medicine** **28 (12)**: 1762-1770, 2000.
- Masferrer, J.L., Leahy, K.M., Koki, A.T., Zweifel, B.S., Settle, S.L., Woerner, M., Edwards, D.A., Flickinger, A.G., Moore, R.J., Seibert, K. Antiangiogenic and Antitumor Activities of Cyclooxygenase-2 Inhibitor. **Cancer Research** **60**: 1306-1311, 2000.
- Mascio, P.D.; Medeiros, M. H. G.; Sies,H.; Bertolotti, S.; Braslavsky, S.E.; Veloso, D. P.; Sales, B.H.N.; Magalhães, E.; Braz-Filho, R.; Bechara, E. J.H. Quenching of singlet molecular oxygen by natural furan diterpenes. **Jounal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** **38**:169-173, 1997.

- Matsukawa, A.;Yoshinaga, M. Sequential generation of cytokines during the initiative phase of inflammation, with reference to neutrophils. **Inflammation res.**, **47(3)**: 7-144, 1998.
- Matsumoto, H.; Naraba, H.; Ueno, A.; Fujiyoshi, T.; Murakami, M.; Kudo, I.; Oh-ishi, S. Induction of cyclooxygenase-2 causes enhancement of writhing response in mice. **Europ. J. Pharmacol.** **352**: 47-52, 1998.
- Mayers, I.; Johnson, D. The nonspecific inflammatory response to injury. **Can J Anaesth.**,**45(9)**:871-879, 1998.
- Mayhan, W.G. Role of nitric oxide in modulating permeability of hamster cheek pouch in response to adenosine 5-diphosphate and bradykinin. **Inflammation**, **16(4)**: 295-305, 1992.
- Medeiros, R; Cabrini, D; Calixto, J.B. The “in vivo and “ex vivo” roles of cyclooxygenase-2, nuclear factor- κ B and protein kinases pathways in the up-regulation of B₁ receptor-mediated contraction of the rabbit aorta. **Regulatory Peptides** **97**:121-130, 2001.
- Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P. et al. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 83, p. 757-766, 1991.
- Mors, W. B., Pellegrino, J., Santos Filho, M. F. Ação profilática do óleo dos frutos de sucupira-branca (*Pterodon pubescens* Benth.) contra a infecção pelo *Schistosoma mansoni*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, **38**: 325-330, 1966.
- Moreno, J. Juan Antiflammins: Endogenous Nonapeptides With Regulatory Effect on Inflammation **Gen. Pharmac.** **28**:23-26, 1997.

- Myers, C.; Koki, A.; Pamukcu, R.; Wechter, W., Padley, R. J. Proapoptotic anti-inflammatory drugs **Urology** **57**: (Supl. 4A) 73-76,2001.
- Nemerson, Y. Tissue factor and hemostasis. **Journal of American Medical Society of Hematology**,**71**:1-8, 1988.
- Ochi, T.; Motoyama, Y.; Goto, T. The analgesic effect profile of FR122047, a selective cyclooxygenase-1 inhibitor, in chemical nociceptive models. **Euro. J. Pharmacol.** **391**: 49-54, 2000.
- Oga, Seigi Fundamentos de Toxicologia pp 366-372, 1996.
- Okabe, T.; Hide, M; Koro, O.; Yamamoto, S. Substance P induces tumor necrosis factor-release from human skin via mitogen-activated protein Kinase. **European Journal of Pharmacology** **389**: 309-315.,2000.
- Opal, S.M.; DePalo, V.A. Anti-inflammatory cytokines.. **Impact of Basic Research on Tomorrow's Medicine**: **117**:1162-1172., 2000.
- Ota, Shinichi; Tanaka, Y.; Bamba, H.; Kato, A.; Matsuzaki, F. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs may prevent colon cancer through suppression of hepatocyte growth factor expression **European Journal of Pharmacology** **367**:131-138,1999.
- Phillipson, J.D. New Drugs from Nature- It could be Yew. **Phytotherapy Research** **3**:2-9,1999.
- Porter, D.G. Ethical scores for animal experiments. **Nature** **356**: 101-102, 1992.

- Pozetti, G. L., Bernardi, A. C. Contribuição ao estudo químico de *Brosimum gaudichaudii* Trec. **Revista da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara**, v.5, n.2, 189-193, 1971.
- Prado, F. C.; Ramos, J.; Valle, J.R. **Atualização Terapêutica** 20 ed., 2001.
- Rang, H.P.; Dale, M.M. & Ritter, J.M. Fármacos Analgésicos. In: *Pharmacology*. 4rd ed. Churchill Livingstone. New York, USA, pp. 485-505, 1999.
- Rates, S.M.K.; Barros, H.M.T. Modelos animais para avaliação da dor: métodos para triagem de novos analgésicos. **Ver. Bras. Farm.**75(2):31-34, 1994.
- Rates, S.M.K. Plants as source of drugs **Toxicon** 39:603-613, 2001.
- Regoli, D.; Allogho, S.N.; Rizzi, A.; Gobeil, F.J. Bradykinin receptors and their antagonists **European Journal of Pharmacology** 348:1-10, 1998.
- Ribeiro, R.A.; Vale, M.L.; Thomazzi, S.M.; Paschoalato, A.B.P.; Poole, S.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Europ. J. Pharmacol.** 287: 111-118, 2000.
- Rocha e Siva, M.; Beraldo, W.T.; Rosenfeld, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor release from plasma globulin by snake venoms and trypsin. **Am J Physiol.** 156:261-273, 1949.
- Roitt I. *Essential Immunology*. **Blackwell Scientific Publication**. 1994.

- Sahu, A.; Lambris, J.D. Complement inhibitors: a resurgent concept in anti-inflammatory therapeutics. **Immunopharmacology** 49:133-148, 2000.
- Sammons, M.J.; Raval, P.; Davey, P.T.; Rogers, D.; Parsons, A.A.; Bingham, S. Carrageenan-induced thermal hyperalgesia in the mouse: role of nerve growth factor and the mitogen-activated protein kinase pathway. **Brain Res.** 876: 48-54, 2000.
- Saunders, M.A.; Belvisi, M.G.; Cirino, G.; Barnes, P.J.; Warner, T.D.; Mitchell, J.A. Mechanisms of prostaglandin E2 release by intact cells expressing cyclooxygenase-2: Evidence for a two component model. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.**, 288: 1101- 1106, 1999.
- Schaefer, U.; Schneider, A.; Rixen, D.; Neugebauer, E. Neutrophil adhesion to histamine stimulated cultured endothelial cells is primarily mediate via activation of phospholipase C and nitric oxide synthase isozymes. **Inflammation Res.**, 47:256-264, 1998.
- Schianterelli, P.; Cadel. S.; Acerbi, D.; Pavesi, L. Antiinflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. **Arzneim - rsch / Drug res.**, 32 (3): 230-235, 1982.
- Schwartz, L.B. Mast Cells: function and contents. **Current Opinion in Immunology** 6: 91-97, 1994.
- Siegmund, E.; Cadmus, R.; Lu, G. Method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. **Proc. Soc. Exper. Biol. Med.** 95: 729, 1957.
- Sim, E. Complement. **Blackwell Scientific Publication.**, 13:155-169, 1994.
- Simmons, D.L. and Wagner, D. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, Acetaminophen, Cyclooxygenase 2, and Fever **Clinical Infections Diseases** 31(suppl e):s211-218, 2000.

- Skehan P, Storeng R, Scudiero D et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of National Cancer Institute**, **82 (13)**: 1107-1118, 1990.
- Soslow, R. A.; Dannenberg, A. J.; Rush, D.; Woerner, B. M.; Khan, K. N.; Masferrer, J.; Koki, A. T. COX-2 is Expressed in Human Pulmonary, Colonic, and Mammary Tumors. **Cancer** **89(12)**:2637-2645.
- Souccar, C. and Lapa, A. J. Analgesic and anti-inflammatory screening of two Brazilian medicinal plants: A positive and a false-positive result. **Ciência e Cultura J. Braz. Assoc. Advencem of Sci.** **49(5/6)**: 417-421, September/December,1997.
- Struebe, M. G. Molecular Mechanisms Involved in the Regulation of Prostaglandin Bioynthesis by Glucocorticoids **Biochemical Pharmacology**, **53**:1389-1395,1997.
- Sugita, N.; Kimura ,A.; Matsuki, Y.; Yamamoto, T.; Yoshie, H.; Hara, K. Activation of transcription factors and IL-8 expression in neutrophils stimulated with lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* **Inflammation** **22(3)**:253-260, 1998.
- Tippmer, S.; Quitterer, U.; Kolin, V.; Faussner, A.; Roscher, A.; Mosthaf, L.; Muller-Esterl, W.;Haring, H. Bradykinin induces translocation of the protein kinase C isoforms α e ζ . **Eur. J. Biochem.**, **225**: 297-304, 1994.
- Tubaro, A.; Dri, P.; Delbello, G.; Zilli, C.; Loggia, R. D. The Croton oil ear tes revisited. **Agents and Actions** **17**:347-349,1985.
- Vacher, P.J.; Duchene-Marullaz, P.J.; Barbot, P. A propes de quelques produits usuels comparaison de deux methodes detude des analg iques. **Med. Exp.**, **11**:51-58, 1964.
- Vane, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biol.** **5**: 231-235, 1971.

Vane, JR.; Botting, R.M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Inflamm. Res.**, **44**:1-10,1995.

Vane, J.R.; Botting, R.M. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. **Inflammation. res.**,**47(2)**: 78-87, 1998.

Whittle, B.A. Release of a Kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice **Int. J. Neuropharmacol.** **3**: 369-378, 1964.

Winter, C.A.; Risley, EA.; Nuss, G.W. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**: **111**: 544-547, 1962.

Woolfe, G.; MacDonald, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **80**: 300-307, 1944.

Xiong, Q.; Tezuka, Y.; Kaneko, T.; Li, H.; Tran, L.Q.; Hase, K.; Namba, T.; Shigetoshi, K. Inhibition of nitric oxide by phenylethanoids in activated macrophages. **European Journal of Pharmacology** **400**:137-144, 2000.

Yedgar, S.; Lichtenberg, D.; Schnitzer, E. Inhibition of phospholipase A₂ as a therapeutic target. **Biochimica et Biophysica Acta** **1488** 182-187, 2000.

Yoshimura, R.; Sano, H.; Masuda, C.; Kawamura, M.; Tsubouchi, Y.; Chargui, J.; Yoshimura, N.; Hla, T.; Wada, S. Expression of Cyclooxygenase-2 in Prostate Carcinoma. **Cancer** **89(3)**:589-595, 2000.