

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Ricardo José Dunder

“Avaliação das atividades analgésica e antiinflamatória da fração hexânica *Agave sisalana*”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)

Ricardo José Dunder

Alba Monteiro

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Alba Regina Monteiro Souza Brito

Campinas, 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

D915a

Dunder, Ricardo José

Avaliação das atividades analgésica e antiinflamatória da fração hexânica *Agave sisalana* / Ricardo José Dunder. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadora: Alba Regina Monteiro de Souza Brito.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Sisal. 2. Inflamação. 3. Analgesia. 4. Sapogeninas. 5. Glicocorticóides. I. Brito, Alba Regina Monteiro de Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Evaluation of activities analgesic and anti-inflammatory of hexanic fraction of *Agave sisalana*.

Palavras-chave em inglês: Sisal; Inflammation; Analgesic; Sapogenins; Glucocorticoids.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Alba Regina Monteiro de Souza Brito, Clélia Akiko Hiruma Lima, Edson Antunes.

Data da defesa: 08/04/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 08 de Abril de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Alba Regina Monteiro Souza Brito
(Orientadora)


Assinatura

Prof^ª. Dr^ª. Clélia Akiko Hiruma Lima


Assinatura

Prof Dr. Edson Antunes


Assinatura

Prof. Dr. Marcos José Salvador

Assinatura

Dedicatória

Este trabalho é dedicado *in memoriam* ao professor Juliano de Souza Gracioso, um exemplo, a quem devo muito do meu conhecimento hoje.

Agradecimentos

“Uma andorinha só não faz verão”, nunca um provérbio foi tão verdadeiro para mim do que nesses últimos anos. Um trabalho científico não é feito apenas por experimentos no laboratório, ou nas planilhas de um computador, mas sim através das diversas formas de apoio que nos é dado a cada dia. Em vista disso, seguem os meus agradecimentos a aqueles contribuíram ao sucesso deste trabalho.

Aos meus pais **José Carlos (Velho Dum - Dum) e Maria (não posso falar o apelido)**, que acreditaram no meu potencial e me apoiaram sempre, principalmente na jornada do mestrado, que se mostrou árdua em alguns momentos, mas sempre estiveram ao meu lado para que vencesse meus desafios de cabeça erguida e me ensinaram valores que, todo ser humano deveria ter, como, humildade, honra e hombridade. Aqui vai o meu muito obrigado, vocês são fantásticos.

Aos meus irmãos **Karen, Karla e Marcus** que me viram sofrer na época do cursinho e sempre me deram o ombro além das ótimas conversas nas horas vagas a respeito das nossas vidas, desavenças amorosas, entre outros assuntos que apenas irmãos conseguem entender, além é claro das eventuais brigas que depois que passam apenas tornam os laços fraternos praticamente inquebráveis.

Minha namorada **Sarah**, que apareceu na minha vida em um momento turbulento, e me ajudou a vencê-lo. Muito obrigado, mas não só por isso, mas por você ser uma pessoa carinhosa, compreensiva que entendeu o meu trabalho e aceitou as minhas constantes viagens São Paulo – Campinas durante a semana, além de estar do meu lado na montagem de todo esse trabalho. Minha linda, você é muito valiosa para mim te amo.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Alba R.M. Souza Brito** por me aceitar como aluno, além de confiar no meu trabalho e reativar uma linha de pesquisa que há algum tempo ninguém no laboratório trabalhava. Por fazer com que eu enxergasse a ciência de uma maneira muito mais prazerosa através da disciplina de metodologia científica (que foi esplêndida). E principalmente por além de ser orientadora, ser uma grande amiga, tanto nos momentos de alegria quanto naqueles mais difíceis.

À equipe de laboratório, que se tornaram grandes companheiros do dia a dia. **Anderson, Aninha, Chris, Cibele, Cinza, Érika, Felipe, Néia, Silene, Victor (baiano gordo) e Vinícius**. Obrigado por aprenderem junto comigo os experimentos e terem tornado essa tese possível.

Ao **Dino** meu irmão dos tempos de objetivo, por ter me acolhido quando comecei essa fase da minha vida e pelas ótimas conversas a respeito de futebol e pela amizade de mais de dez anos, valeu irmão essa conquista também é sua.

Aos meus irmãos de UNESP, **Dri, Féster, Pablo, Patrícia e o Wandeco**, minha família na famigerada Assis, quantas histórias, quantos feitos juntos não? Sim, e agora crescemos, demos mais um passo, sim todos nós, meu mais sincero agradecimento pelos sorrisos e pelas brigas, obrigado meus irmãos.

Aos laboratórios que me ajudaram na pesquisa como o laboratório do professor **Nelson Duran** e sua equipe.

À equipe do professor **Edson Antunes** principalmente a **Gláucia** e ao **Marcelo Datti**, que me ensinaram experimentos chaves para a conclusão da tese os meus mais sinceros agradecimentos.

Aos amigos do laboratório de Neurobiologia, **Alexandre, André, César e Gustavo**, pela ajuda na área de histologia e pela força, além das boas conversas nos churrascos do departamento.

Ao **Thiago** pela ajuda nas dosagens de proteínas totais e insulina que foram dados valiosos a este trabalho.

A professora **Catarina** da Unesp de Assis, pelo apoio e pela amizade, o meu muito obrigado.

Ao professor **Marcos Salvador** do departamento de Fisiologia Vegetal por ter me ajudado nas análises químicas, mas principalmente pela calma e atenção dada, além do conhecimento que me foi passado.

À equipe da Professora **Clélia Akiko Hiruma Lima**, na Unesp de Botucatu pela acessória e apoio.

Aos professores **Carlos Amílcar Parada, Edson Antunes e Miguel Arcanjo Áreas**, pelas preciosas sugestões na qualificação, além do voto de confiança que me foi dado ao me aprovarem na qualificação.

Ao **David** aluno do quarto ano de biologia, que em 2006 mostrou que ainda é possível acreditar na honestidade das pessoas ao encontrar e devolver o meu livro de fisiologia que havia sido roubado. Muito obrigado.

Aos **ratos wistar e camundongos swiss**, pois sem eles nada poderia ter sido feito.

À CAPES, pelo apoio financeiro para minha formação científica.

E principalmente, ao professor **Juliano De Souza Gracioso**, a quem dedico esse trabalho. Muito obrigado por ter salvado minha iniciação científica em 2005, quando eu estava sem esperança e por ter acreditado em mim para que eu continuasse o trabalho com a *Agave sisalana*, muito obrigado pela confiança e por ter sido meu “pai de ciência” nos tempos de Assis, aonde quer que esteja dedico principalmente a você essa conquista meu amigo.

Epígrafe

“Toda a grande obra supõe um sacrifício; e no próprio sacrifício se encontra a mais bela e a mais valiosa das recompensas”.

Agostinho da Silva

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS:	X
LISTA DE FLUXOGRAMAS, FIGURAS, ILUSTRAÇÕES E TABELAS	XII
I.1. RESUMO	1
I.2. ABSTRACT	3
II. INTRODUÇÃO	5
II.1. DOR E INFLAMAÇÃO.....	5
FLUXOGRAMA1: CASCATA DE INFLAMAÇÃO	12
II.2. DAINES E TERAPIA NA INFLAMAÇÃO.....	13
II.3. GLICOCORTICÓIDES ESTEROIDAIIS.....	16
II.4. PLANTAS NA TERAPÊUTICA DA INFLAMAÇÃO	20
II.5. SAPONINAS E SAPOGENINAS	22
II.6. GÊNERO AGAVE – FONTE DE SAPONINAS COM AÇÃO ANTIINFLAMATÓRIA	25
II.7. AGAVE SISALANA – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	26
III.1.JUSTIFICATIVA	28
III.2. OBJETIVOS	28
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	29
IV.2. DROGAS	29
IV.3 SOLUBILIZAÇÃO DAS DROGAS	30
IV.4 MATERIAL DE ORIGEM VEGETAL	30
IV.5. PREPARO DA FRAÇÃO HEXÂNICA RICA EM SAPOGENINAS	30
IV.6.TESTES QUÍMICOS	31
A) ANÁLISE POR CLAE-UV/DAD DA FRAÇÃO FHAS	31
B) TESTE DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA	34
IV.7. TESTES FARMACOLÓGICOS	34
A. INFLAMAÇÃO	34
a.1. <i>Modelo de Edema de Orelha Induzido por Xilol</i>	34
a.2. <i>Edema de Pata Induzido por Carragenina</i>	35
a.3. <i>Edema de Pata Induzido por Carragenina</i>	36
a.4. <i>Granuloma Cotton Pellet</i>	36
a.5. <i>Modelo de Pleurisia Induzido por Carragenina</i>	37
a.6. <i>Contagem Total de Leucócitos</i>	38
a.7. <i>Contagem Diferencial</i>	38
a.8. <i>Dosagem de MPO no Lavado Pleural</i>	38
B. TESTES ANALGÉSICOS.....	39
b.1. <i>Modelo de Contorção Abdominal Causado por Injeção de Ácido Acético</i>	39
b.2. <i>Modelo de Placa Quente</i>	40
b.3. <i>Modelo de Tail Flick</i>	40
C. TESTES DE TOXICIDADE	41
c.1. <i>Dosagem de Albumina de Proteínas Totais</i>	41
c.2. <i>Dosagem de Insulina Plasmática</i>	42
c.3. <i>Peso Corporal dos Animais</i>	42
c.4. <i>Avaliação do Peso da Glândula Adrenal</i>	42
c.5. <i>Histologia da Glândula Adrenal</i>	43
IV.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
V. RESULTADOS	44
V.1 ANÁLISE QUÍMICA.....	44
a) <i>Substâncias Presentes na FHAS</i>	44

b) <i>Análise por CLAE da Fração FHAS</i>	45
c) <i>Índice de Hemólise</i>	47
V.2 TESTES FARMACOLÓGICOS	49
A) INFLAMAÇÃO	49
TESTES PRELIMINARES – EXTRATO HIDROLISADO DE <i>A.SISALANA</i> (EHAS)	49
a.1) <i>Edema de Orelha com Xilol</i>	49
a.2) <i>Edema de Pata com Carragenina</i>	50
a.3) <i>Contorções Abdominais</i>	51
TESTES FRAÇÃO HEXÂNICA DE <i>A.SISALANA</i> (FHAS).....	52
a.4) <i>Edema de orelha com Xilol</i>	52
a.5) <i>Edema de Pata - Método de Winter</i>	53
a.6) <i>Granuloma Cotton Pellet</i>	54
a.7) <i>Modelo de Pleurisia Induzido por Carragenina</i>	55
a.8.) <i>Dosagem de MPO pelo lavado Pleural</i>	58
B) ATIVIDADE ANALGÉSICA.....	59
b.1) <i>Contorções Abdominais</i>	59
b.2) <i>Modelo de Placa Quente</i>	60
b.3) <i>Teste de Tail Flick</i>	61
C) ANÁLISE DA TOXICIDADE	62
c.1) <i>Proteínas Totais</i>	62
c.2) <i>Albumina Plasmática</i>	63
c.3) <i>Dosagem de Insulina Plasmática</i>	63
c.4) <i>Evolução do Peso Corporal dos Animais</i>	64
c.5. <i>Avaliação do Peso da Glândula Adrenal</i>	65
c.6. <i>Histologia da Glândula Adrenal</i>	66
VI. DISCUSSÃO	68
VII. CONCLUSÕES	78
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ANEXOS	89

Lista de abreviaturas:

- AA= Ácido aracdônico
- AAS= Ácido acetil salicílico
- ACTH= Hormônio Adreno Corticotrópico
- AMPc= Adenosina monofosfato cíclica
- ATP= Adenosina Tri fosfato
- CLAE= Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- COBEA= Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- COX-1= Ciclooxigenase – 2 (constitutiva)
- COX-2= Ciclooxigenase – 2 (indutiva)
- COXIBS= Inibidores seletivos da COX
- DAINES= Drogas antiinflamatórias não esteroidais
- DEXA= Dexametasona
- ECB= Extrato Concentrado Bruto
- EHAS= Extrato Hidrolisado de *A. sisalana*
- EMP= Efeito Máximo Possível
- FOA₂= Fosfolipase A₂
- cFOA₂= Fosfolipase A₂ citosólica
- sFOA₂= Fosfolipase A₂ secretora
- FHAS= Fração Hexânica de *Agave sisalana*
- GC= Glicocorticóides
- GR= Receptor de Glicocorticóides
- GRE= Elementos de Resposta aos Glicocorticóides
- HE= Hematoxilina Eosina
- HPA= Eixo Hipotalamo Hipófise adrenal
- HPLC= High Performance Liquid Chromatography
- HTAB= Brometo de Hexadecil- Trimetil- Amonium
- IL1 β = Interleucina 1 β
- IL-10= Interleucina – 10
- INDO= Indometacina
- INOS= Óxido Nítrico Sintetase
- i.p= Intra- peritoneal
- IP₃= Inositol Trifosfato

- 5-LOX= Lipoxigenase 5
- 15-LOX = Lipoxigenase 15
- LT= Leucotrienos
- MPO= Mieloperoxidase
- NF- κ B= Fator Nuclear Kappa B
- NO= Radicais de Óxido Nítrico
- PAF= Fator acumulador de Plaquetas
- PBS= Tampão Salina Fosfato
- PEG= Polietilenoglicol-200 a 40%
- PGE₂= Prostaglandina
- PPD= Pata Posterior Direita
- PPE= Pata Posterior Esquerda
- OMS= Organização Mundial de Saúde
- SB= Suco Bruto
- SNC= Sistema Nervoso Central
- SNP= Sistema Nervoso Periférico
- SSF= Solução Salina Fisiológica
- TNF- α = Fator de Necrose Tumoral α
- TX₄= Tromboxanos
- v.o= Via oral

Lista de Fluxogramas, figuras, ilustrações e tabelas

Fluxograma 1: Fluxograma representativo da cascata inflamatória

Fluxograma 2: Fluxograma representativo da obtenção da FHAS a partir do suco bruto de *A. sisala*

Figura 1: Substâncias presentes na FHAS

Figura 2: Cromatograma obtido por CLAE-UV/DAD da fração FHAS

Figura 3: Cromatograma obtido por CLAE-UV/DAD da amostra Padrão de hecogenina.

Figura 4: Cromatograma obtido por CLAE-UV/DAD da Co-injeção da FHAS e padrão hecogenina.

Figura 5: Sobreposição dos cromatogramas anteriores

Figura 6: Espectro de absorção na região do UV para o pico cromatográfico com tempo de retenção de 4,31 minutos da co-injeção da fração FHAS e o padrão de hecogenina

Figura 7: Efeito da administração do EHAS por v.o e i.p nos modelos de edema de orelha induzido por Xilol.

Figura 8: Efeito do EHAS (v.o e i.p) em modelo de edema de pata induzido por carragenina segundo metodologia de Henriques

Figura 9: Efeito da administração da FHAS em quatro doses (5, 10 25 e 50 mg/kg) no modelo de edema de orelha induzido por Xilol.

Figura 10: Efeito da FHAS em modelo de edema de pata induzido por carragenina segundo método de Winter

Figura 11: Efeito de FHAS em modelo crônico de Granuloma cotton pellet

Figura 12: Efeito da FHAS no modelo de pleurisia com relação a infiltração celular

Figura 13: Efeito da FHAS na contagem diferencial de células envolvendo polimorfonucleares

Figura 14: Efeito da FHAS na contagem diferencial de células envolvendo mononucleares

Figura 15: Efeito da FHAS na liberação da MPO obtida a partir do lavado pleural

- Figura 16:** Efeito da administração oral da FHAS em modelo de contorções abdominais
- Figura 17:** Efeito da FHAS sobre as dosagens de insulina plasmática
- Figura 18:** Efeito da FHAS sobre o peso dos animais durante experimento crônico
- Figura 19:** Fotomicrografia da glândula adrenal de ratos wistar. Cortes histológicos submetidos à coloração por HE
- Ilustração 1:** Cinco sinais cardinais da dor
- Ilustração 2:** Estrutura da Glândula adrenal (córtex e medula) e divisão de suas zonas secretoras de hormônios
- Ilustração 3:** *A. sisalana*
- Tabela 1:** Apresentação das diferentes classes de DAINES
- Tabela 2:** Avaliação do índice de hemólise para o ECB, EHAS e FHAS, comparados com ECB não isotônico e Salina.
- Tabela 3:** Acompanhamento da atividade antinociceptiva do EHAS em modelo de contorções abdominais
- Tabela 4:** Avaliação do tempo de latência dos animais tratados com FHAS no modelo de placa quente
- Tabela 5:** Avaliação da atividade antinociceptiva através do tempo de latência dos animais tratados com FHAS no modelo de Tail flick
- Tabela 6:** Apresentação do tempo de latência da FHAS em modelo do Tail flick através do EMP
- Tabela 7:** Avaliação das dosagens de proteínas totais no plasma em animais tratados com FHAS e DEXA
- Tabela 8:** Avaliação das dosagens de albumina plasmática em animais tratados com FHAS e DEXA
- Tabela 9:** Avaliação do peso da glândula adrenal mediante ao tratamento da FHAS e DEXA durante uma semana

I.1. Resumo

A dor é definida como uma sensação complexa e indefinida envolvendo múltiplos fatores como estilo de vida, ambiente. Muitas vezes a dor é produto de um processo inflamatório. As inflamações são uma resposta do sistema imune a diferentes estímulos, microorganismos, danos teciduais, estímulos miogênicos ou até traumas cirúrgicos que liberam mediadores endógenos. Ao receber o estímulo, diferentes enzimas como fosfolipases e ciclooxigenases originam mediadores inflamatórios (prostaglandinas, citocinas, leucotrienos) dando continuidade à cascata inflamatória muitas vezes de maneira exacerbada, que é caracterizada pelos cinco sinais cardinais da inflamação: calor, rubor, tumor, dor e perda de função.

Para o tratamento das inflamações as drogas de primeira escolha são os antiinflamatórios não esteroidais (DAINES), que atuam na inibição da ciclooxigenase (COX-2), contudo, o uso das DAINES pode provocar o advento de úlceras pépticas, ou até mesmo falência renal e problemas cardíacos no caso dos inibidores seletivos da COX. Em inflamações crônicas utilizam-se os Glicocorticóides (GC), que são potentes antiinflamatórios, mas provocam efeitos colaterais sistêmicos como hipoglicemia, ação no sistema nervoso central e uma deficiência no sistema imune.

A utilização de princípios ativos vegetais é uma alternativa para o controle das inflamações, entre elas destacam-se plantas da família Agavaceae, principalmente do gênero *Agave*, com destaque para *Agave sisalana* rica em saponinas esteroidais. As saponinas são uma classe de metabólitos secundários que apresentam diferentes funções terapêuticas, de grande interesse comercial e farmacológico. Esses compostos apresentam um núcleo esteroidal envolto por cadeias de açúcares denominado aglicona ou sapogenina.

A partir das folhas da *Agave sisalana* obteve-se a fração hexânica de *Agave sisalana* (FHAS), que teve seu potencial terapêutico avaliado em diferentes testes de inflamação, algesia e toxicidade. A FHAS apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) de edema nos modelos agudos de inflamação; edema de orelha por Xilol e edema de pata induzido por carragenina. A FHAS também apresentou diminuições significativas no modelo crônico de inflamação Granuloma *cotton pellet*, que avalia a infiltração celular. Os valores obtidos no *cotton pellet* foram corroborados pelo modelo de pleurisia, em que também houve redução do infiltrado celular. A FHAS demonstrou um potencial antinociceptivo nos modelos de analgesia, porém com uma ação bem menor do que os fármacos padrão, o que indica que o mecanismo de ação parece não envolver atuação com receptores opióides em modelos de analgesia. Com relação à toxicidade a FHAS não apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) de proteínas plasmáticas. Na avaliação do peso dos animais nenhuma das doses da FHAS apresentou efeito significativo sobre a evolução ponderal de peso dos animais, como foi o caso do controle positivo GC, o que indica ausência de efeitos colaterais graves, semelhantes aos GC.

Através da análise dos dados, indicam que ação antiinflamatória e analgésica encontrada deve-se a presença das sapogeninas esteroidais na FHAS, principalmente a hecogenina. Devido a esses resultados, novas avaliações serão feitas para elucidar o mecanismo de ação antiinflamatório apresenta ação semelhante aos GC, trazendo assim perspectivas de uso medicinal da *Agave sisalana*.

I.2. Abstract

Pain is defined as complex and vague sensation that involves several factors such as life style and environment. Many times pain is a result of an inflammatory process. The inflammation an imune system response to different kind of stimulus, microorganisms, tissue injuries, miogenic stimulus or even cirurgic traumas, which release several endogens mediators.

Receiving the stimulus, diferents enzymes as phospholipase and ciclogenasis, lead to inflammatory mediators (prostaglandins, citocins and leukotrienes) which continuity the inflammatory cascade, many times in an exarcebate manner, described by the five cardinals signs: Heat, redness, swelling, pain and loss of function.

Inflammation Treatment the first choice in medicine are non steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDS) that acts in inhibition of COX-2. However, the use of NSAIDS can bring peptic ulcers or kidney failure and cardiac problems in selective COX inhibitors. Chronic inflammation uses Glucocorticoids therapy that are powerfull drugs, but they provoque systemics side effects: as hypoglicemy, nervous system activity and immune system depression.

The use of active compounds present in plants is a way to inflammatory controll, among them there are plants of Agavaceae family mainly *Agave* genus, such as *Agave sisalana* which is rich in steroidal saponins. Saponins are a secondary metabolic class that present several therapeutic functions, with a large comercial and pharmacological interest. These compounds present steroidal nucleus involved by sugar chains called algycone or sapogenins.

From the *Agave sisalana* was taken *Agave sisalana* hexanic fraction (FHAS) that had its therapeutic potential evaluated in different inflammatory, algescic and toxicity tests. FHAS showed significant responses for acute inflammatory models with antiedematogenic activity as xylene ear edema and carrageenan hind paw edema. FHAS also presents significant results chronic models like granuloma cotton pellet, which evaluate cell infiltration. The values gotten on cotton pellet were confirmed with pleurisy model, where there were reduction of cellular infiltrate. FHAS showed antinociceptive potential in algescic tests, with a smaller action than standard medicine, which indicates that the action mechanisms does not acts on opioid receptors in analgesic models. In connection to toxicity, FHAS does not present increase of plasmatic proteins, and animal weight evaluation none of FHAS doses showed significant effects considering weight up of animals. In case of positive control GC that indicates absence of side effects such GC.

Throughout data analyses, the antiinflammatory and analgesic action founded is tempted by sapogenins presence on FHAS. These results need new evaluation to explain the antiinflammatory action mechanisms bringing new perspectives of *Agave sisalana* medical use.

II. Introdução

II.1. Dor e inflamação.

A dor é definida como uma sensação complexa e indefinida envolvendo múltiplos fatores como estilo de vida, ambiente e decréscimo à tolerância dos excessos da vida do homem moderno. Do ponto de vista fisiológico, na dor estão envolvidos diferentes neurotransmissores e mediadores inflamatórios. A variabilidade da dor sugere que existam mecanismos neurais que modulam a transmissão nas vias da dor e que, além disso, também modificam as reações emocionais do organismo.

No entanto, qualquer discussão sobre dor propõe algumas distinções. A dor, sem sentimentos e sensações psicossomáticas oriundas do meio externo, é conhecida como nocicepção: ela é definida como sinais ao Sistema Nervoso Central (SNC) sobre informações acerca do tecido lesado (Jessel & Kelly, 1991). A nocicepção é avaliada de forma indireta, pois trata apenas dos componentes fisiológicos da dor (Tjolsen & Hole, 1997).

Ao ocorrer um estímulo nociceptivo há atuação de estruturas específicas situadas nas terminações nervosas de neurônios aferentes denominadas nociceptores, que estão amplamente distribuídos pela pele, vísceras, vasos sanguíneos, músculos e articulações (Julio & Bausbam, 2001).

O impulso nociceptivo é transmitido por diferentes classes de fibras aferentes, por exemplo, nociceptores térmicos, ou mecânicos têm um diâmetro pequeno e são constituídas por fibras A- δ mielinizadas, cuja condutância é de 5 a 30 m/seg e são responsáveis por

sensação de dor forte. Já as fibras nervosas do tipo C são amielinizadas e transportam os estímulos de maneira vagarosa e de difícil localização (Pleuvry & Lauretti, 1996).

A ativação das fibras é causada por receptores específicos que são ativados por segundo mensageiro, entre eles destacam-se substâncias como a bradicinina, ATP ou mediadores inflamatórios que atuam de maneira indireta induzem a dor por sensibilizar nociceptores no sítio da inflamação (Julius & Basbaum, 2001).

Podemos classificar a dor de diferentes maneiras, como a dor nociceptiva, causada pela estimulação excessiva dos nociceptores. A dor neurogênica é aquela que reflete danos ao tecido nervoso (SNC e Sistema Nervoso periférico - SNP); já a dor neuropática difere por causar disfunção de grupo de nervos (Millan, 1999). A dor inflamatória em que ocorre significativo dano tecidual é mais persistente devido à evolução do processo inflamatório.

O processo inflamatório é caracterizado como uma resposta do sistema imune a diferentes microorganismos, danos teciduais, estímulos miogênicos ou até traumas cirúrgicos que liberam mediadores exógenos e endógenos, que assim indicam os cinco sinais cardinais da inflamação: Calor, rubor, tumor, dor e perda de função, descritos por Celsus no século primeiro (Figura 1) (Serhan & Savil, 2005). O “calor” representa o aumento da temperatura no local; o “rubor” é a dilatação de pequenos vasos com aumento da permeabilidade vascular; já o terceiro sinal, o “tumor”, é devido ao edema causado pelo extravasamento de plasma no local. Esses três sintomas exercem pressão nos nociceptores que geram o quarto sinal, a “dor”. Mais tarde foi inserido o quinto sinal cardinal conhecido como a perda de função (Brandão, 1993).

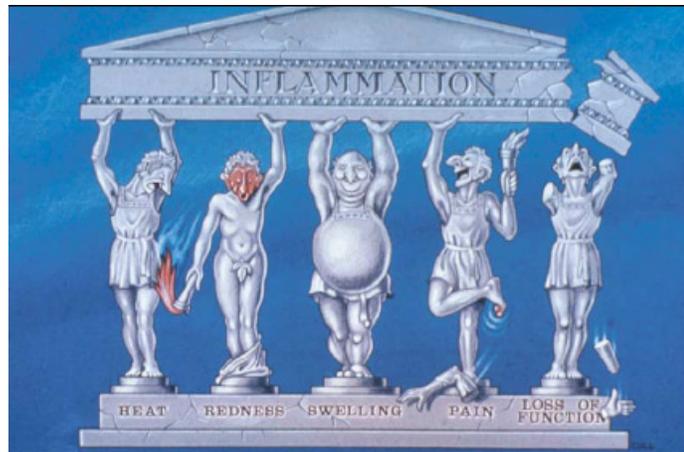


Ilustração 1- Cartoon grego mostrando os cinco sinais da inflamação: calor, rubor, tumor, dor e perda de função. Ilustração médica da faculdade de medicina de St Bartholomeu

Trata-se de uma resposta mais específica dos tecidos vascularizados, aos estímulos lesivos e manifesta-se de maneira estereotipada, ou seja, a resposta inflamatória obedece a um padrão semelhante, independente da natureza do estímulo (Garcia Leme, 1989). Essa reação do organismo promove um movimento maior no fluxo de plasma e proteínas séricas, resultando em um extravasamento plasmático do sangue para o tecido lesado (Lawrence *et al.*, 2006). Por se tratar de uma resposta imune inata, há uma tendência do organismo em voltar ao estado de homeostasia, pois o mesmo secreta mediadores antiinflamatórios como a anexina e a 15-deoxi prostaglandina. Contudo, as reações inflamatórias muitas vezes provocam efeitos deletérios ao organismo (Flower *et al.*, 2006), principalmente quando se tornam crônicas como no caso da artrite reumatóide, asma e doenças inflamatórias intestinais.

Entre os diversos mediadores inflamatórios destaca-se o fator nuclear Kappa B (NF- κ B) que desempenha papel importante já que é responsável pela produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Fröde - Saleh & Calixto, 2000). Trata-se de um fator nuclear que regula a expressão de genes envolvidos na resposta imune e

inflamatória; sua ativação ocorre da seguinte maneira: O NF- κ B é dividido em duas subunidades – p65 e p50 – que ficam aderidas ao I κ B α e I κ B β de maneira a não entrar no núcleo de células não estimuladas. Uma vez que a célula é estimulada o I κ B β sofre uma fosforilação que libera o NF- κ B dentro do núcleo, aderindo-se a seqüências específicas em regiões promotoras (Barnes & Karin, 1997).

Os produtos dos genes regulados pelo NF- κ B como fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina – IL (IL1 β) geram um efeito cíclico, pois, além de serem ativados pelo NF- κ B, eles também o ativam em outras células após se ligarem a receptores específicos, perpetuando a resposta inflamatória. Enzimas inflamatórias como a ciclooxigenase – 2 indutiva (COX-2) e a óxido nítrico sintase (INOS) também são reguladas pelo NF- κ B (Crofford, 1994).

Na inflamação aguda, com a atuação do NF- κ B, ocorre um rápido influxo de granulócitos, mais especificamente neutrófilos, seguidos pela ação de monócitos e macrófagos no tecido lesionado (Serhan & Savil, 2001). Com o infiltrado de macrófagos ocorre liberação de radicais peróxidos livres e de mediadores pró-inflamatórios como as prostaglandinas (PGE₂), a bradicinina e a histamina (Hurley, 1978; Williams, 1984). No começo da cascata inflamatória encontram-se as fosfolipases A₂ (FOA₂), enzimas da família das catalases com capacidade de hidrolisar fosfolipídios de membrana. AS FOA₂ produzem ácidos de cadeia livre (Yedgar *et al.*, 2006), em particular o ácido aracdônico (AA). Dentre as FOA₂ destacam-se duas isoformas, a FOA₂ citosólica (cFOA₂) e FOA₂ secretora (sFOA₂). A cFOA₂ hidrolisa o fosfolipídios através de canais Ca⁺² dependentes, tornando a cFOA₂ importante na inflamação, pois ela atua na produção de eicosanóides que

promovem a ativação de monócitos e a adesão endotelial. Já a sFOA₂ participam da resposta imune inata contra bactérias gram positivas (Gronroos *et al.*, 2005).

As sFOA₂ têm papel importante na inflamação crônica como colites e artrites reumatóides (Boyanovsky & Webb, 2009), pois atuam como um sinalizador celular para a liberação da cFOA₂ que fica armazenada em células inflamatórias, contribuindo para produção do AA (Gilroy *et al.*, 2004).

O AA, por sua vez, tem papel fundamental na inflamação, pois pode ser metabolizado pelas enzimas ciclooxigenase (COX-1 constitutiva, COX-2 indutiva) e lipoxigenase (15-LOX e 5-LOX), por vias diferentes, originando eicosanóides distintos como prostaglandinas, troboxanos e leucotrienos; estas substâncias estão relacionadas aos processos patológicos de inflamação (Balsinde *et al.*, 1998).

A PGE₂ é essencial para o controle do fluxo sanguíneo e dilatação das veias (Levy *et al.*, 2001). Trata-se de um prostanóide com ação semelhante a de um hormônio parácrino, apresentando inúmeras funções no organismo como aumentar a contração do útero no momento do parto, indução de sono, além de estarem ligadas aos mecanismos de proteção gástrica (Wallace, 2008). Células adjacentes ao local da inflamação sofrem influência direta dos mediadores presentes no exudato inflamatório líquido; dentre eles destacam-se elementos da cascata do sistema complemento que geram liberação de mediadores inflamatórios pelos mastócitos (Coltren, 1992).

Outra via importante na produção de eicosanóides é a via das 5-LOX (Clarkson *et al.*, 1998), que convertem o AA em leucotrienos (LT). A síntese dos LT é estimulada por influxo de cálcio citosólico, que se eleva através de um trauma ou dano tecidual (Henderson, 1994). O papel principal dos LT na inflamação é de estimular a infiltração de neutrófilos e leucócitos nas células endoteliais, amplificando a entrada de células no tecido

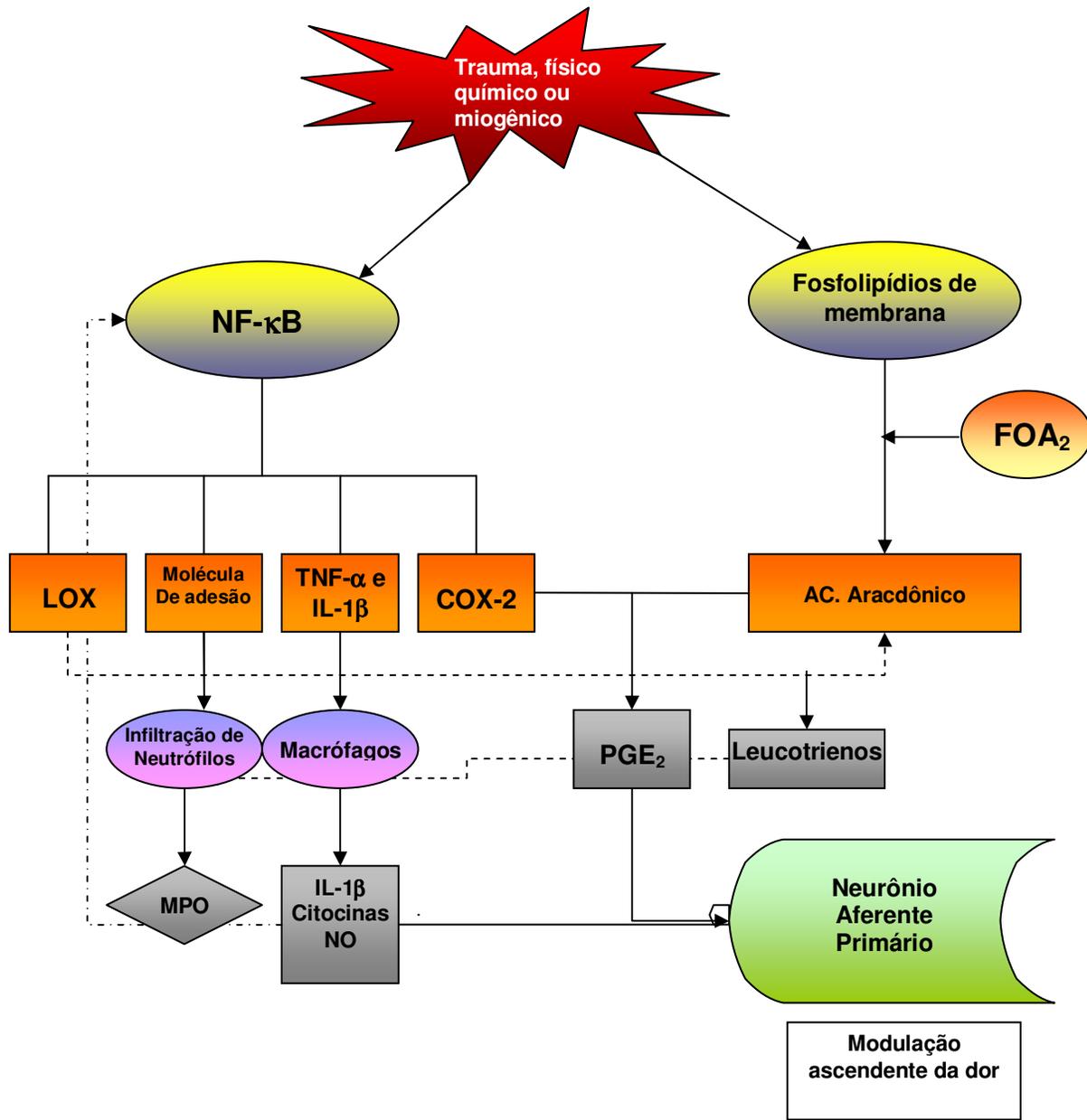
lesionado (Rabb, 1994). Existem muitas razões pelas quais pode ocorrer acúmulo celular num determinado ponto ou sítio de ação, sendo a quimiotaxia a mais conhecida no processo inflamatório agudo. Trata-se de uma reação onde substâncias químicas determinam o movimento celular a favor (fluxo positivo) ou contra (fluxo negativo) um gradiente (Dale & Foreman, 1989).

Com a infiltração celular ocorre a liberação dos radicais de óxido nítrico (NO) induzidos pela óxido nítrico sintetase (INOS). A INOS é ativada por vários estímulos imunológicos que levam à produção de grandes quantidades de NO, com atividade citotóxica contribuindo na inflamação aguda ou crônica (Pokharel et al., 2006). Outra substância presente nos neutrófilos é a mieloperoxidase (MPO), uma enzima pertencente à superfamília das peroxidase - ciclooxigenase. Os neutrófilos passam a produzi-la logo após sofrerem diferenciação em granulócitos, ainda na medula óssea, sendo um importante marcador de neutrófilos (Malle *et al.*, 2007).

Outro problema na inflamação é que alguns mediadores aumentam a permeabilidade vascular ao interagirem diretamente com receptores específicos presentes nas células endoteliais, como é o caso do fator ativador de plaquetas PAF, taquicininas e histamina (Bray *et al.*, 1981). Na permeabilidade celular ocorre formação de poros na membrana do endotélio, através da ativação do inositol trifosfato IP_3 , que acaba por promover o extravasamento de fluido e proteínas plasmáticas (Edelman & Blumenthal, 1987), dando origem ao edema.

Uma vez formado o edema ocorre liberação de substâncias químicas conhecidas como algogênicas, presentes no ambiente tecidual; dentre elas destacam-se acetilcolina, bradicinina, histamina, serotonina, substancia P, PGE_2 , $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ e AMPc. Todas elas

sensibilizam os nociceptores que, transmitem o impulso nervoso para o SNC e liberam substancia P no sitio da inflamação interagindo com linfócitos, ativando-os e estimulando vasodilatação e a instalação de um processo inflamatório de origem neurogênica (Teixeira, 2001).



Fluxograma1: Cascata de Inflamação

II.2. DAINES e Terapia Na Inflamação

Historicamente, as inflamações sempre causaram incomodo e desconforto ao homem, isso somado a sensação de nocicepção, além do risco da perda de função da região lesada estimulou a busca por drogas e substâncias analgésicas. Diante da enorme quantidade de substâncias analgésicas, o ser humano pode buscar alívio para sua dor através de várias drogas, as quais podem agir no SNC ou de maneira periférica (Gracioso, 1999).

Entre tais substâncias estão os analgésicos opióides, com destaque para a morfina. Esse grupo de compostos se liga a diversos receptores opióides presentes no SNC, modelando as atividades sensitiva, motora e psíquica dos receptores do SNP, além de alterar processos cognitivos relacionados à dor, pois sua atuação se estende ao sistema límbico e córtex cerebral (Ripamonti & Bandieri , 2009).

A busca por potentes analgésicos data do século XIX, quando Johann Andreas Buchner (1828) isolou a salicina da casca da *Salix alba*; passada uma década Rafaele Piria denominou a salicina como ácido salicílico, que é encontrado naturalmente em algumas espécies de *Spirea* (Vonkerman & Van de Laar, 2008). Felix Hoffmann, em 1899, conseguiu acetilar o ácido salicílico que apresentou propriedades antiinflamatórias e analgésicas; em 1899 surgiu a primeira droga sintética com o nome de ácido acetil salicílico (AAS).

Com relação à analgesia periférica têm-se as Drogas Antiinflamatórias Não Esteroidais (DAINES). Em geral, estes fármacos apresentam efeito analgésico devido à inibição de diferentes mediadores inflamatórios. As DAINES constituem um grupo de fármacos de estrutura química variada, os quais exercem atividade analgésica, antipirética e

antiinflamatória (Teixeira, 2001). Após o advento da AAS, cerca de 50 diferentes tipos de DAINES foram criadas, sendo indicadas no tratamento de doenças inflamatórias como artrite reumatóide, osteoartrite e cólicas renais (Vonkermann & Van de Laar, 2006). Os principais grupos de DAINES estão abaixo listados (Tabela 1).

Tabela 1 Principais classes de DAINES

Classes de DAINES	
Salicilatos	AAS
Acido arilalcanóico	Diclofenaco, indometacina, nabumetona e sulindac
Acido arilpropiónico ou profenos	Ibuprofeno, flurbiprofeno e naproxeno
Ácidos fenâmicos	Acido mefenâmico, acido meclofenâmico.
Derivados pirazolidínicos	Fenilbutazona
Oxicans	Piroxicam e Meloxicam
Sulfonanilidas	Nimesulida

DAINES inibem a síntese de PGE₂ através da acetilação da COX-1, COX-2, impedindo a conversão do AA em PGE₂, que, por conseguinte gera prostanoídes inativos (Amann & Peskar, 2002). Contudo, nos últimos tempos muitos trabalhos vêm demonstrando que algumas DAINES podem atuar em vias independentes da COX; Rhind *et al.*, (2002) concluíram que a Indometacina (INDO) inibiu a produção de citocinas e TNF- α . Outra via seria através da inibição dos mastócitos e, por consequência, bloqueio da ativação do NF- κ B (Mortaz *et al.*, 2005).

O uso das DAINES pode levar a efeitos colaterais sérios, já que há excessivo consumo dessa classe de medicamento em todo o mundo. No Reino Unido, por exemplo, no ano de 2001, o consumo de analgésicos atingiu a 1,7 bilhões de libras (Porteus *et al.*, 2005). Na Itália também foram apresentados dados semelhantes; o consumo chega a 35% (desses, 20% têm mais de 65 anos) e 18% são usuários crônicos (Motola *et al.*, 2004).

Dentre os efeitos colaterais destaca-se o surgimento de ulcerações gástricas, as quais ocorrem por inibição da síntese de COX-1 diretamente ligada aos mecanismos de citoproteção da mucosa gástrica (Yuan *et al.*, 2006). Os sintomas, entretanto, variam: De 15 a 40% dos usuários de DAINES apresentam quadros de queimação, náusea e dor abdominal; os casos mais graves com perfuração e sangramento, que podem levar a óbito, ocorrem em 1 a 2% da população, enquanto 5 a 20% são assintomáticos e evoluem para cura espontânea (Vonkerman *et al.*, 2007).

A inibição não seletiva da COX-1, que é responsável pela produção de prostaglandina constitutiva, produz hipermotilidade gástrica que provoca distúrbios microvasculares, reduzindo o fluxo sanguíneo e causando danos vasculares; esses danos induzem à infiltração de macrófagos, além de uma interação de leucócitos com o endotélio, que acaba resultando em dano à mucosa gástrica (Akiko *et al.*, 2001). Outro problema reside no fato de que as PGEs constitutivas também participam da linha de proteção da mucosa gástrica, aumentando a secreção de íons bicarbonato, reduzindo a acidez e gerando também espessamento da camada de muco protetora no estômago. Quando as linhas de proteção são rompidas por inibição da COX há sangramento, ulcerações profundas e até mesmo perfuração da parede gástrica (Silverstein *et al.*, 1995).

O risco da toxicidade gastrointestinal difere de uma DAINE para outra; ibuprofeno e diclofenaco estão associados a um risco mais baixo, enquanto o naproxeno, sulindac e AAS apresentam risco intermediário. Já o piroxicam e azaprasona apresentam um alto risco de produzir complicações gastrointestinais (Garcia Rodrigues, 1998).

Quando COX-1 e COX-2 foram descobertas floresceram as hipóteses de se desenvolver fármacos seletivos para COX-2. Na década de 90, começaram a surgir no mercado os inibidores seletivos da COX-2 (Coxibs), inicialmente utilizados para o

tratamento de artrites reumatóides e inflamações crônicas (Vonkerman & Van de Laar, 2008); os Coxibs apresentariam analgesia e ação antiinflamatória comparável às DAINES, sem levar a danos gástricos.

No entanto, a COX-2 não apresenta importância apenas na inflamação. Estudos demonstraram uma grande atividade na mácula densa e em células intersticiais da medula renal. PGE₂, derivadas da COX-2, apresentam papel crítico na manutenção do fluxo sanguíneo do rim, além de contribuir para o balanço eletrolítico (Cowley *et al.*, 1995). Com a queda dos níveis de PGE₂, através dos Coxibs, há uma perda do efeito inibitório tônico e, com ele, maior retenção de sódio gerando uma resistência às terapêuticas hipertensivas, além de comprometer fluxo sanguíneo prejudicando a viabilidade renal.

Outro local de atuação da COX-2 é o sistema cardiovascular, onde existe um equilíbrio entre as duas enzimas. A COX-1 sintetiza tromboxanos (TX₄) e mediadores pró-trombóticos tendo também ação vasoconstritora. Já a COX-2, que é secretada por células endoteliais, é responsável pela secreção de PGE₂ e prostaciclina de ação vasodilatadora (Vonkerman, 2006). Os Coxibs podem acoplar-se à COX-2, de modo irreversível, inibindo a síntese de prostaciclina antitrombótica, que equilibram as ações dos produtos da COX-1. Dessa forma há desequilíbrio da homeostase em favor da trombogênese e da vasoconstrição, promovendo assim danos ao sistema cardiovascular e infartos no miocárdio (Vonkerman, 2006).

II.3. Glicocorticóides Esteroidais

A adrenal é composta por duas unidades funcionais, medula que é responsável pela secreção de catecolaminas e córtex. Este último por sua vez, é dividido em três zonas:

glomerulosa, responsável pela produção de mineralocorticóides; fasciculata, responsável pela produção de glicocorticóides endógenos (cortisol e corticosterona) e a reticular, responsável pela produção de hormônios andrógenos (Figura 2).

O cortisol produzido na zona fasciculata é um hormônio relacionado principalmente a situações de estresse como na resposta inflamatória; trata-se de um hormônio esteroidal, contendo 19 átomos de carbono, derivado do colesterol por ação da enzima citocromo P450. A produção do cortisol é regulada através do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (Polito *et al.*, 2006), que libera hormônio adeno corticotrópico (ACTH), para a corrente sanguínea que na glândula adrenal promoverá secreção de cortisol.

Drogas antiinflamatórias esteroidais, os Glicocorticóides (GC), são importantes no tratamento das inflamações. Sua prescrição teve início em 1949, com Philip Rench, no tratamento de artrite reumatóide (Schimmer & Parker, 2001). Sua utilização em outras formas de inflamação tornou-se comum e hoje GC são muito usados em doenças ortopédicas como tendinites, bursites e compressões nervosas (Gali *et al.*, 2000).

O mecanismo de ação dos GC é de amplo espectro, pois atuam em diferentes genes inflamatórios que codificam citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas inflamatórias (Barnes, 2006). Ao entrar no organismo e atravessar rapidamente a membrana celular o GC se adere ao receptor de glicocorticóide (GR), normalmente proteínas de adesão do tipo HSP (Wu *et al.*, 2004); uma vez aderido ao GR, este se ativa e liga os elementos de resposta dos glicocorticóides (GRE), seqüências que respondem aos estímulos de esteróides (Dostert, 2004). Após aderência, os GRE promovem a ativação da síntese de mediadores antiinflamatórios (como a anexina, previamente conhecida como lipocortina), que agem dentro da célula inibindo a produção de FOA₂ (Little *et al.*, 1999). Outros mediadores antiinflamatórios são antagonistas de receptores de IL-1 e IL-10, que inibem

ainda a expressão de muitos genes para mediadores pró-inflamatórios, como citocinas (Cuzzocrea *et al.*, 2007).

Por apresentar ampla atuação, os GC inibem a ativação do NFκB através do aumento de IκBα, que se adere ao NFκB reduzindo a atividade pró-inflamatória dos genes responsáveis pela produção da COX-2 e das moléculas de adesão intercelular (Wissink, 1998).

Além do largo espectro de ação sobre diversos mediadores inflamatórios, os GC sintéticos são drogas que mimetizam a ação de hormônios corticosteróides e, por isso, apresentam muitos efeitos colaterais, de maneira sistêmica. Esse amplo espectro de atividade torna-os capazes de provocar danos em praticamente todos os tecidos humanos (Damiani, 1984). Por exemplo, os GC atuam no metabolismo intermediário metabolizando, além de carboidratos, também proteínas e lipídeos (Faiçal *et al.*, 1997). Com esse efeito os GC aumentam o substrato, e o consequente aumento de enzimas fosfoenol piruvato quinase e glicose-6-fosfatase, incrementando assim o fluxo de aminoácidos, glicerol e lactatos oriundos, em sua maioria, do tecido muscular e adiposo (Exton, 1979). Devido ao aumento da ação proteolítica, há uma redução da síntese protéica; esse efeito ocorre em usuários crônicos de GC. A ação sobre as proteínas está relacionada à ação sobre a degradação do DNA e RNA celulares (Barnes., 2006). Longui *et al.*, (2000) mostraram o potencial apoptótico dos GC em linfoblastos, através de uma via ATP dependente caracterizada por mudanças na membrana celular e mitocôndria e alterações na distribuição de Potássio e Cálcio, além de provocar desfragmentação do DNA.

O uso crônico também provoca o desequilíbrio eletrolítico, gerando quadros de hipocalemia, edema e hipertensão; além de prejudicar a reabsorção de Ca⁺⁺, induzindo quadros de osteoporose; numa estimativa de 30 a 50% dos pacientes crônicos que

desenvolvem quadros de osteoporose, sendo vértebras e costelas os locais mais afetados (Adachi *et al.*, 1993). Também atua no sistema nervoso central, provocando alterações de humor, quadros de depressão e a fase de REM (Gilin *et al.*, 1972).

Além dos efeitos já citados, os GC sintéticos provocam um quadro de insuficiência da adrenal. Tratamentos prévios com GC reduzem a secreção do ACTH que como consequência reduz a produção de cortisol gerando um quadro de hipoplasia da adrenal (Polito *et al.*, 2006).

Glândula Adrenal

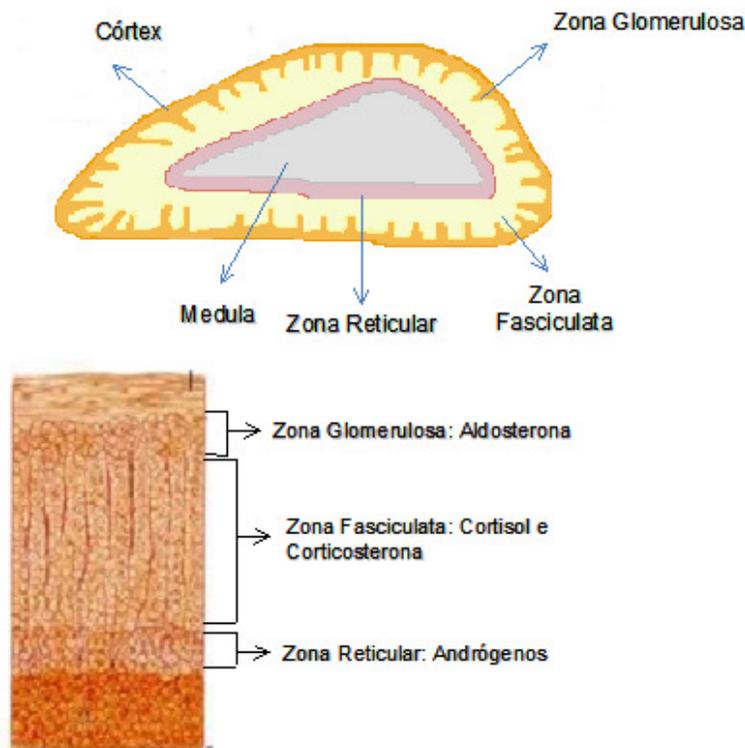


Ilustração 2: Glândula adrenal, apresentação das duas porções: Medula (cinza), e o córtex e suas três zonas, Glomerular (marrom claro), Fasciculata (amarelo) e reticular (lilás). E as zonas com os respectivos hormônios produzidos.

II.4. Plantas Na Terapêutica da Inflamação

Devido aos efeitos colaterais provocados pelas DAINES, ou ações sistêmicas provocadas pelos GC, a pesquisa com princípios ativos de plantas na busca de novos fármacos têm se tornando promissora. Entre os anos de 1981 a 2006, Newman & Cragg (2007) realizaram uma minuciosa investigação sobre o surgimento de novas drogas. Dentre 1010 drogas descobertas, 275 (cerca de 30%) são derivadas de produtos naturais, e, dessas, 13 apresentam potencial antiinflamatório. Uma explicação plausível, para tanto, é a enorme biodiversidade vegetal com seu potencial de gerar fitoterápicos, fitofármacos e/ou protótipos de novas drogas com importância econômica no mercado europeu e as grandes multinacionais tem demonstrado interesse crescente e comercialização de fármacos derivados de plantas, já que esses valores chegaram a US\$ 7 bilhões em 1997 - 50% pertencentes à Alemanha (Calixto, 2000). A Biodiversidade da flora brasileira tem promovido crescimento da produção de fitoterápicos, (da ordem de 15% ano), enquanto o crescimento anual de medicamentos alopáticos gira em torno de 3 a 4%.

Não há precisão em relação à imensa biodiversidade vegetal brasileira; estima-se a ocorrência de um total de 550.000 espécies com potencial terapêutico no Brasil; dessas, apenas 55.000 estão catalogadas (Dias, 1996) e apenas 8% das espécies da flora brasileira foram estudadas na procura por compostos bioativos. Além disso, somente 1100 espécies foram avaliadas quanto às suas supostas atividades medicinais (Garcia, 1996).

Como a maioria da população não tem acesso à alopatia, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estipula que devido à pobreza, cerca de 65 a 80% da população mundial dependem da atividade terapêutica das plantas (Farnsworth & Morris 1976). A terapêutica envolvendo os produtos naturais está inserida no contexto das medicinas tradicional e

alternativa. Define-se medicina tradicional como conhecimento passado oralmente pelos povos de geração em geração. No grupo que emprega a medicina tradicional encontram-se comunidades indígenas e quilombolas, além de caboclos e caiçaras, só citando aquelas do Brasil. Já a medicina alternativa é o conhecimento popular oriundo da observação da natureza por parte dos raizeiros e as "farmácias" de fundo de quintal (Di Stasi, 2007).

Esse conhecimento popular deu origem aos fitoterápicos; a OMS propôs como definição que fitoterápicos são substâncias ativas presentes nas plantas, de maneira geral, ou distribuída por suas estruturas (raízes, cascas e folhas), como extrato bruto, ou processado (Calixto, 2003). Em relação aos fármacos sintéticos, os fitomedicamentos apresentam algumas diferenças: São mais baratos, seu uso na medicina popular é uma importante característica, e são amplamente utilizados em tratamentos crônicos (Calixto, 2000).

No tratamento das inflamações, em geral, diversos produtos naturais apresentam potencial farmacológico. Khanna *et al.*, (2007) afirmaram, em seu trabalho, que a busca por produtos naturais para o tratamento de artrites é uma "mina de ouro"; o autor apresentou diferentes metabólitos secundários de origem vegetal que atuaram sobre diversos moduladores inflamatórios; dentre eles destacam-se flavonóides, terpenos, quinonas, catequinas e alcalóides. Na China, onde o uso de plantas medicinais é bastante antigo, a *Laggera pterodonta* mostrou ótimo resultado em modelos de pleurisia com redução de PGE₂, além de inibir a infiltração celular em modelo de inflamação crônica – *cotton pellet* (Wu *et al.*, 2006).

A *Carapa guianensis*, uma espécie rica em tetranotriterpenóides, é bastante utilizada na medicina popular amazônica para dores e inflamações; em modelos experimentais reduziu infiltração leucocitária, níveis de IL-1 β e inibiu as vias de

sinalização do NF- κ B (Penido *et al.*, 2006). O *Hypericum brasiliense*, popularmente conhecido como "mil facas" ou "alecrim bravo" mostrou resultados significativos em modelos inflamatórios agudos, além de agir sobre o sistema nervoso (Perozzo *et al.*, 2008).

A *Quassia amara*, uma planta da América do Sul pertencente à família *Simaroubaceae*, é rica em quassinóides; na dose de 500 mg/kg apresentou redução significativa do edema induzido por carragenina (Toma *et al.*, 2003).

Bighetti *et al.*, (1999) avaliaram a atividade antiinflamatória da *Croton cajucara Benth (Euphorbiaceae)*, uma espécie endêmica da região amazônica. A atividade antiinflamatória dos dois diterpenóides presentes no óleo essencial (cajucarinolídeo e isocajucarinolídeo) mostrou-se com ação semelhante àquela das DAINES inibindo a atividade da COX-1. A *Boerhaavia diffusa*, da família *Nyctaginaceae*, que apresenta alantoína e alcalóides como metabólitos secundários, apresentou considerável atividade analgésica (inibição de 50%) em modelo de algisia induzida por ácido acético. Aplicado na concentração de 1000 mg/kg; acredita-se que o extrato de *B. diffusa*, embora muito menos ativo, mimetize as propriedades analgésicas da morfina (Hiruma Lima *et al.*, 2000).

II.5. Saponinas e Sapogeninas

Uma classe de compostos com grande importância comercial e farmacológica é a das saponinas. São numerosas as atividades apresentadas por essa classe de compostos; como exemplos destacam-se as atividades antifúngica, antialérgica, antiinflamatória, dentre outras (Lacaile – Dubois & Wagner, 1996; Francis *et al.*, 2002). Quimicamente, as saponinas são classificadas como glicosídeos com esteróides ou triterpenóides. As saponinas apresentam alto peso molecular e sua purificação apresenta muitas dificuldades

(Trease & Evans, 1996). Esse grupo de compostos é amplamente distribuído no reino vegetal e, na natureza, possuem estrutura bastante característica; a presença da porção aglicona, ou sapogenina, apresentando um esteróide ou um triterpeno (Schenkell *et al.*, 2002).

Saponinas já foram descritas em mais de 100 famílias botânicas. De acordo com os dados obtidos por Sparg *et al.*, (2004), a presença da aglicona esteroidal é mais freqüente em monocotiledôneas como *Liliaceae*, *Dioscoraceae* e *Agavaceae*; as saponinas triterpênicas são mais comuns em dicotiledôneas (*Leguminoseae* e *Araliaceae*).

Outro fator importante é que esses glicosídeos são classificados de acordo com número de cadeias de açúcar. Por exemplo: se a molécula apresenta apenas cadeia de açúcar única trata-se de uma saponina monodesmosídica; no caso de apresentar duas cadeias de açúcar é uma saponina bidesmosídica (Hostettmann & Marston, 1995). Uma propriedade das saponinas é sua natureza anfipática; devido à solubilidade das sapogeninas em lipídeos e das cadeias de açúcar serem hidrossolúveis, há uma potente ação detergente e emulsificante (Wang *et al.*, 2005; Sarnthein – Graf e La Mesa., 2004).

Devido a essa última ação detergente, as saponinas são dotadas de efeito tóxico relacionado à sua propriedade de causar ruptura em eritrócitos liberando hemoglobina (Oda *et al.*, 2000). Outros efeitos tóxicos ainda relacionados à característica de causar lise celular são ações inseticida, anti-helmíntica e ictiotóxica (Schenkell *et al.*, 2007).

Um ponto importante ao se trabalhar em modelos animais com saponinas, devido à sua toxicidade, está relacionado às vias de administração (Oakenfull & Sidhu, 1990). Por exemplo, a via oral apresenta-se menos tóxica do que a via intravenosa no que diz respeito à hemólise. Fenwick *et al.*, (1991) sugeriram que a queda na toxicidade das saponinas administradas por via oral, deva-se à menor absorção que acabaria por reduzir os níveis de

hemólise. Outros testes realizados em diferentes modelos animais sugerem que as saponinas, após sofrer hidrólise enzimática, são convertidas em sapogeninas e assim perdem a característica anfipática com conseqüente redução da atividade hemolítica (Üstündag & Mazza, 2007).

Reações químicas como diferentes tipos de hidrólise (ácida, básica ou enzimática) ou uma hidrotermólise podem causar mudanças na estrutura da molécula das saponinas e, por conseqüência, alterações em suas propriedades. No caso de hidrólise ácida completa ficam separadas a aglicona e uma grande quantidade de monossacarídeos (Hostettmann & Marston, 1995).

As sapogeninas esteroidais são precursoras de esteróides farmacologicamente ativos, incluindo anticoncepcionais de via oral, corticosteróides e hormônios sexuais, apresentando assim considerável importância econômica. A sapogenina de maior valor agregado é a diosgenina, cuja extração comercial é feita quase que inteiramente das espécies do gênero *Dioscorea*. Vale lembrar que na semi-síntese desses medicamentos a indústria baseia-se unicamente no extrativismo dessas espécies, fazendo com que estejam tornando-se cada vez mais raras em algumas áreas, sendo assim mais difícil e dispendioso explorar as fontes selvagens em busca de novas fontes para esses medicamentos (Oashi, 1999).

Entre as plantas ricas em saponinas com propriedades antiinflamatórias destaca-se a *Kalopanax pictus*, uma árvore decídua presente na Coréia, Japão e China apresenta uma saponina – a kalopanaxsaponina (α -Hederina). Essa substância apresentou potente ação antiedematogênica, na dose de 50 mg/kg, no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos, além de potente inibição da permeabilidade vascular na dose de 60

mg/kg, quando comparada ao fármaco padrão, ibuprofeno, usado na dose de 200 mg/kg (Lid *et al.*, 2002).

Em outro estudo testou-se a atividade da *Asculus chinensis*, uma planta usada tradicionalmente na medicina chinesa, que apresenta em suas sementes quatro tipos de saponinas (Escina 1a, Escina 1b, Isoescina a e Isoescina b). Essas saponinas apresentaram um potencial antiinflamatório promissor na dose de 30 mg/kg em modelos de inflamação induzidos por dimetil benzeno (Feng Wei *et al.*, 2004).

Já Kim *et al.*, (2005) avaliaram o potencial da *Platycodon grandiflorum* rica em saponinas, que reduziram a produção de COX-2 e os níveis de PGE₂ e TNF- α em cultura de macrófagos ativados, além de diminuir o edema de pata induzido com carragenina.

II.6. Gênero Agave – fonte de saponinas com ação antiinflamatória

Entre as plantas que apresentam saponinas encontram-se aquelas pertencentes ao gênero *Agave*. Esse gênero de vegetais pertence à família *Agavaceae* e abrange um grupo com quase 300 espécies vegetais, que ocupam posição de destaque entre as plantas nativas de características semidesérticas. As regiões que produzem as espécies do gênero *Agave* estão localizadas dentro de zonas tropicais e subtropicais. Do ponto de vista global, as regiões onde a temperatura permanece elevada a maior parte do ano (20 a 25°C) se revelam ideais para o bom desenvolvimento e produtividade da cultura do *Agave*. (Ferreira da Silva & Macedo Beltrão, 1999)

Entre as espécies de *Agave*, a *Agave americana* apresenta saponinas esteroidais; dentre elas, a hecogenina e a tigogenina, que depois de purificadas e liofilizadas foram administradas em doses de 200 e 300 mg/kg por via intraperitoneal em ratos albinos Wistar e apresentaram ação antiedematogênica em edema induzido por carragenina, mas sem

apresentar atividade ulcerogênica como apresentou a indometacina (5 mg/kg), a droga de referência usada no trabalho (Peana *et al.*, 1996).

Garcia *et al.*, (1999) avaliaram a atividade da *Agave intermixta trel*, em edema de pata induzido por carregenina, nas doses de 300 e 500 mg/kg apresentando resultados significativos, além da redução no nível de MPO, o que indica a redução de infiltrado celular. Já a *Agave attenuata* demonstrou atividade antiinflamatória ao reduzir a permeabilidade vascular causada pelo ácido acético, um típico estágio do processo antiinflamatório (Da Silva *et al.*, 2002).

II.7. Agave sisalana – considerações gerais

Dentre as plantas de gênero *Agave* existe uma que se destaca, não por seu potencial terapêutico, mas sim pelo valor comercial de suas fibras - *Agave sisalana*, conhecida popularmente no Brasil como sisal. Pertencente à família *Agavaceae* e subfamília *Agavoidea*, o sisal é espécie de clima tropical e seu plantio em regiões fora desse ambiente é raro (Nunes Moreira *et al.*, 1999). É endêmica nas Americas do Norte e Central, sendo introduzida no Nordeste brasileiro em meados de 1900. Devido ao clima quente e seco a planta teve excelente adaptação no sertão Nordestino (Barros, 1999). Após a segunda guerra mundial, o sisal teve uma rápida expansão na Paraíba, em virtude da alta demanda dos mercados interno e externo o que o tornou o principal exportador da fibra, mas por volta da década de 60 em razão do pouco interesse dos produtores a Bahia retomou a produção.

Morfologicamente é uma planta simples, de característica herbácea com grandes folhas espatuladas, quase achatadas, que variam de 1,2 a 2,0 m de comprimento dispostas em espiral, muitas vezes apresentando espinhos cônicos nas laterais e apenas um espinho

no ápice; possui flores verde-amareladas e frutos capsulados; em geral são carnosas, duras, com ápice pungente e pendão floral de 6 a 9 m de altura por 15 cm de diâmetro (Joli, 1985). O sistema radicular é fibroso com raízes adventícias transportadoras e alimentadoras. O sisal é freqüente nos estados da Bahia e Paraíba, além de outros países como Bahamas e Havaí (Correa, 1984).

O Brasil é o maior produtor mundial de sisal, com receitas superiores a 100 milhões de dólares (FAO, 1996), sendo o Nordeste o maior exportador da planta. A importância do cultivo do sisal para o semi-árido nordestino merece destaque, pois é fonte de renda e emprego para parte significativa da população (Moreira *et al.*, 1996).

Contudo, os valores citados são referentes às fibras que trituradas geram suco; na maior parte das vezes, no entanto, o suco é descartado; em outras é processado para obtenção de álcool industrial, pectina e saponinas.

Como a *A. americana*, a *A. sisalana* também é rica nas sapogeninas esteroidais hecogenina e tigogenina (Beltrão & Ferreira da Silva, 1999).

A Hecogenina (substância marjoritária) é uma sapogenina esteroidal de peso molecular 430.63 e sua fórmula estrutural é $C_{27}H_{42}O_4$ e sua nomenclatura na IUPAC é: 3 β -hidroxi-5 α -spirostan-12-ona. (Pharmaloialty)



Ilustração 3: *A. sisalana*

III.1. Justificativa

Devido aos resultados obtidos anteriormente com outras plantas do gênero *Agave* para as atividades antiinflamatória e analgésica, justifica-se o estudo com o mesmo propósito, da espécie *A. sisalana* ainda não estudada e encontrada em abundância no Brasil. Ensaio preliminares com o extrato hidrolisado de *A. sisalana* evidenciaram possível atividade antiinflamatória e analgésica, que justifica também o estudo da FHAS com o mesmo propósito.

III.2. Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram enumerados abaixo.

- 3.1 Estudar, identificar e confirmar a presença de sapogeninas esteroidais na fração hexânica de *Agave sisalana*.
- 3.2 Validar a ação farmacológica previamente detectada.
- 3.3 Avaliar a atividade antiinflamatória da fração Hexânica da *Agave sisalana* em modelos agudos.
- 3.4 Avaliar a atividade antiinflamatória em modelos de inflamação crônica.
- 3.5 Avaliar a atividade analgésica em modelos de nocicepção.
- 3.6 Avaliar a atividade analgésica quanto ao sistema nervoso.
- 3.7 Realizar um estudo comparativo de uma possível atividade tóxica da *Agave sisalana* quanto a natureza esteroidal da sapogenina.

IV. Materiais e métodos

IV.1. Animais

Os animais serão fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB). Os animais foram mantidos em câmaras com temperatura controlada ($20 \pm 2^\circ \text{C}$), com alternância ciclos claro–escuro de 12 horas, água e ração “*ad libitum*”. Para os experimentos serão utilizados ratos Wistar machos com quatro semanas de idade e peso corporal entre 150 a 200g e camundongos swiss machos com 25 a 35g. Os experimentos que foram realizados no presente trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação animal da Universidade Estadual de Campinas (CEEA – IB - UNICAMP) protocolo nº 1281-1, Por estar de acordo com Princípios Éticos na Experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Nos experimentos onde foi realizado cirurgia, os animais foram anestesiados com Ketamina 0,5 ml/kg e Xilasina 0,1 ml/kg. Já experimentos como edema de pata em que somente ocorreu a aplicação do agente indutor os animais foram anestesiados com halotano.

IV.2. Drogas

Foram utilizadas às seguintes drogas e reagentes: Indometacina, Polietilenoglicol-200 (PEG), ácido acético, morfina hidrocloreídrica, sulfentanil, hexano, metanol, carragenina e Xilol (Sigma Chemical CO, U.S.A),. Dexametasona (DEXA) (2mg/kg e 0,5mg/kg) (Laboratórios Ache). Cristal violeta, (Merk CO, U.S.A). Acido acetil salicílico (Bayern) e Cloridrato de Ketamina (Fort Dodge LTDA) e Cloridrato de Xilasina (König Ltda. ARG) cloreto de sódio (CHEMCO, Campinas Brasil) Hematoxilina- Eosina (Nuclear).

IV.3 Solubilização das Drogas

Todas as drogas exceto foram solubilizados em Polietilenoglicol – 200 (PEG) a 40% e água destilada. Exceto os fármacos opióides (morfina e sufentanil) que foram solubilizados e solução salina fisiológica (SSF) a 0,9 %.

IV.4 Material de origem Vegetal

A *A. sisalana* foi cultivada no Estado da Bahia. Após a colheita da planta para obtenção das fibras foi feito o processamento da mesma, de onde foi separado o suco bruto (SB) oriundo da moagem das folhas. O suco não processado de *A. sisalana* foi doado pela “Corona Comércio e Indústria LTDA” situada em Salvador – Bahia.

IV.5. Preparo da Fração Hexânica Rica em Sapogeninas

SB foi processado com aquecimento a 100° C para ser concentrado 10 vezes. O concentrado do SB apresentou consistência semelhante a “caramelo”, devido à quantidade de açúcar contida, e foi codificado como Extrato Concentrado Bruto (ECB).

O ECB (40 g) foi submetido à hidrólise ácida com 2N HCl (300 ml) durante 4 h sob agitação, para separação das cadeias de açúcar. Após hidrólise, um precipitado preto foi formado e a solução ácida foi filtrada. Esse precipitado foi codificado como Extrato Hidrolisado de *A. sisalana* (EHAS). O EHAS foi seco e depois lavado, primeiramente com água destilada e depois com uma solução de NaOH a 10% para neutralização. Após a última lavagem com água destilada ele foi seco.

Depois de neutralizado e seco EHAS foi colocado em refluxo com Hexano a temperatura de 60 °C por 60 h. A solução de Hexano foi então filtrada e colocada para evaporar a vácuo. O produto obtido nessa evaporação foi um pó de coloração verde amarelada (0,35% do ECB particionado) que foi codificada como Fração Hexânica de *A. sisalana* (FHAS). Os passos descritos estão resumidos no Fluxograma 2 apresentado na seqüência.

IV.6. Testes Químicos

a) Análise por CLAE-UV/DAD da Fração FHAS

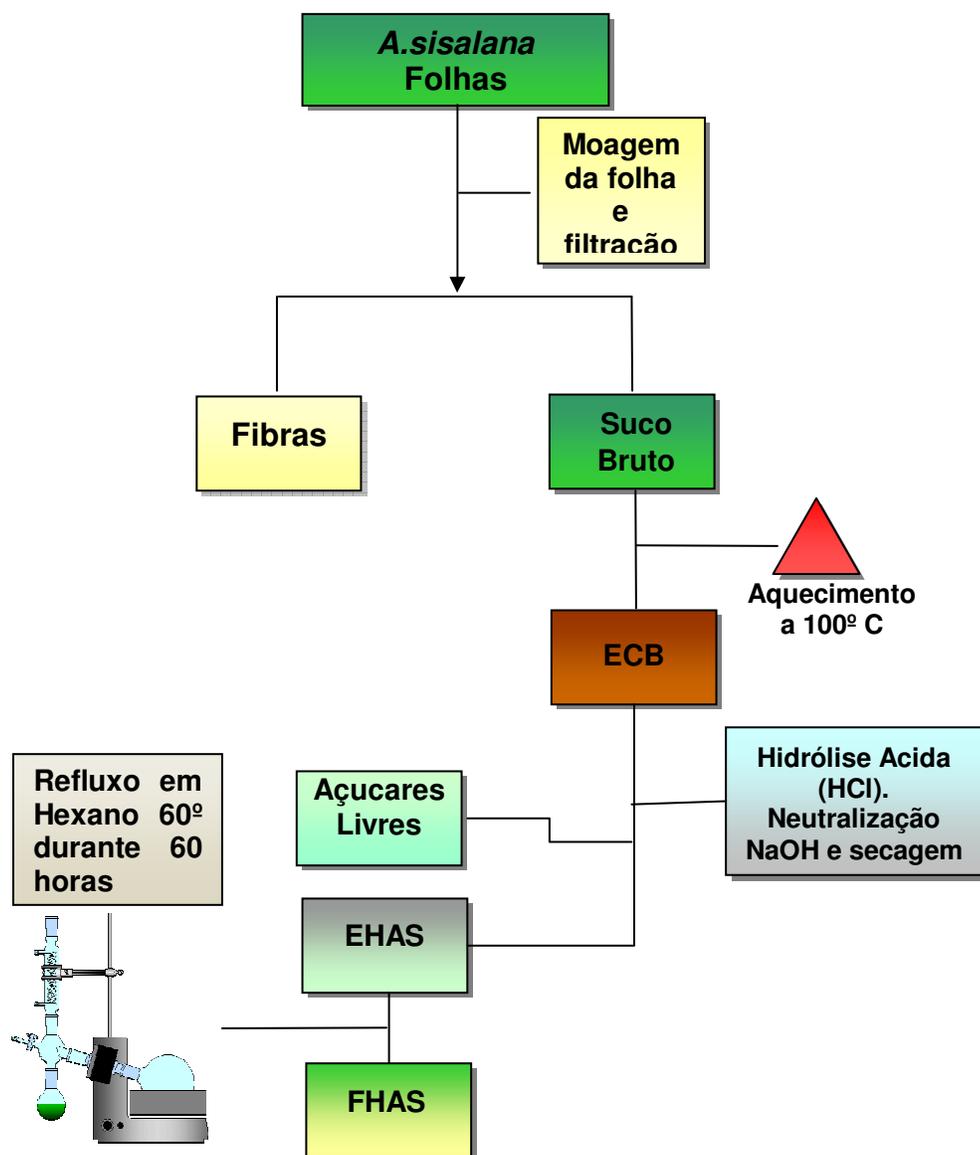
Utilizando-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de ultravioleta com arranjo de foto-diodos (UV-DAD) traçou-se o perfil cromatográfico da fração FHAS.

Como substância padrão empregou-se a amostra padrão de Hecogenina com resíduos de Tigogenina, doado pela Universidade Federal de Feira de Santana. Tanto a fração FHAS, quanto a substância-padrão isolada (1,0 mg) foram solubilizados em 1,0 mL de metanol e 20,0 µL analisados. Foram realizadas injeções da amostra e da respectiva amostra-padrão, como também a co-injeção das amostras com as amostras-padrão.

As condições cromatográficas de operação para as análises por CLAE foram:

- aparelhagem: cromatógrafo líquido shimadzu-LC 10, equipado com duas bombas LC10ADvp shimadzu, detector por varredura de espectro ao ultravioleta por arranjo de fotodiodos (UV/DAD) SPD-M10Avp, sistema de controle SCL-10Avp e autoinjeter SIL-10Avp com volume de injeção de 20,0µL.

- para as análises empregou-se a CLAE em fase reversa utilizando coluna ACE 5 C18 (250,0 x 4,6 mm x 5 μ m), temperatura da coluna de 35°C. Como fase móvel empregou-se metanol (Merck) em sistema isocrático. A vazão da fase móvel permaneceu a 0,6 mL/min, com tempo de análise de 15 min. Detecção por varredura de espectro de 200 a 400 nm com acompanhamento em 2 comprimentos de onda 212 e 254 nm.



Fluxograma 2 –Obtenção Fração Hexânica de *A. sisalana* (FHAS) a partir das folhas da *A. sisalana*

b) Teste da Atividade Hemolítica

O teste de atividade hemolítica teve como objetivo avaliar a presença de saponinas com ação hemolítica no ECB, EHAS e FHAS, além de validar o processo de obtenção da FHAS que, ao ser hidrolisada, perde a atividade hemolítica.

Esse experimento foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Sun (2006) com algumas modificações. Alíquotas de 5 ml de sangue de ratos Wistar foram lavadas com Salina 0,9% e centrifugados a 180 G por cinco min. Com o pellet formado após a centrifugação foi obtida a solução de hemáceas a 2% em SSF (0,9%). A 2 ml da solução de hemácias foram adicionados 2 ml de soluções de ECB, EHAS e FHAS, preparadas em diluições seriadas 100, 50, 25, 12.5, 6.25 e 3.12 µg/ml. As soluções foram incubadas por 30 min. a 37° C e depois centrifugadas a 70 G por 10 min. A hemoglobina livre foi lida em leitor de ELISA na faixa de 540 nm. A solução salina e o ECB não isotonicado foram usados como referência e o experimento foi realizado em triplicata.

IV.7. Testes Farmacológicos

a. Inflamação

a.1. Modelo de Edema de Orelha Induzido por Xilol

O edema de orelha induzido por Xilol promove a permeabilidade vascular seguida de edema por se tratar de um agente irritante, sendo um dos testes básicos para avaliação da atividade antiedematogênica.

O experimento foi realizado de acordo com o modelo descrito Young & De Young, (1989). Para este experimento foram utilizados camundongos swiss machos entre (25 e 35

g) com 8 semanas de idade, separados em grupos de 8 animais cada. Os animais receberam por v.o e i.p o EHAS na dose de 500 mg/kg; os controles foram SSF e AAS, na dose de 10 mg/kg. Uma hora após os animais tiveram a superfície interna e externa das orelhas limpas com etanol e, em seguida, aplicou-se 20 µl de Xilol na superfície interna e externa da orelha direita; na orelha esquerda foi aplicado volume equivalente de solução fisiológica. Depois de uma hora os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e discos padronizados das orelhas esquerda e direita (8 mm) foram retirados com o auxílio de um *punch*. Cada disco foi pesado separadamente e a diferença do peso foi considerada como edema produzido pelo xilol. Além do teste preliminar com o EHAS, FHAS também administrado por via oral, foi avaliado nas doses de 5, 10, 25 e 50 mg/kg, tendo indometacina (5 mg/kg) como controle positivo e o PEG como controle negativo.

a.2. Edema de Pata Induzido por Carragenina

Camundongos Swiss foram submetidos a jejum de 12 h, separados aleatoriamente em grupos de 8 animais cada por tratamento, de acordo com a metodologia descrita por Henriques *et al.*, (1987).

EHAS foi aplicada, por gavagem, em dose única de 500 mg/kg; o controle positivo – indometacina, na dose de 5 mg/kg enquanto o controle negativo recebeu salina 0,9%. A aplicação da droga foi feita 1 h antes da inflamação induzida por carragenina (0,02 ml a 1%) na região sub-plantar da pata posterior direita (PPD) e SSF 0,9% na pata posterior esquerda (PPE).

Após 3 h da administração da carragenina, os camundongos foram sacrificados e suas patas posteriores foram seccionadas na junção tíbia társica, sendo imediatamente

pesadas em balança analítica. A diferença de peso entre PPD e PPE foi considerada como edema.

a.3. Edema de Pata Induzido por Carragenina

A aplicação subcutânea de carragenina na pata dos ratos promove um aumento agudo do volume da pata injetada. O edema induzido por carragenina é resultante da ação integrada de vários mediadores inflamatórios como PGE₂, histamina e bradicinina, o que torna o modelo um parâmetro útil na avaliação anti-inflamatória de novos compostos.

Para esse modelo de inflamação foram utilizados ratos Wistar (n=5). Os animais foram tratados por gavagem, com FHAS nas doses de 5, 10, 25 e 50 mg/kg sendo o PEG usado como controle negativo e a DEXA 2 mg/kg como controle positivo. Uma hora após os tratamentos, os animais receberam uma injeção sub-plantar de 0,2 ml de carragenina a 1% na PPD e a PPE recebeu 0,2 ml de salina. O diâmetro das patas dos animais foi medido com o auxílio de um Pletismômetro (UGO, Basile) antes (valor basal) e ½, 1, 2, 3 e 4 h após a injeção do agente edemogênico. O cálculo do edema é feito subtraindo-se o valor basal daquele valor obtido em cada tempo. Winter *et al.*, (1962)

a.4. Granuloma Cotton Pellet

O granuloma *cotton pellet* é um modelo de inflamação crônica que avalia a infiltração celular. É um processo que começa com infiltração de neutrófilos seguida por fibroblastos terminando na fase proliferativa com secreção de colágeno no local da inflamação.

Ratos Wistar machos, com peso variando entre 150 g e 200 g, foram aleatoriamente separados em grupos de 7 animais cada. Os grupos foram previamente tratados, por gavagem,

com FHAS nas concentrações de 10 e 25 mg/kg, com o PEG como controle negativo e com DEXA (0,5 mg/kg) como controle positivo. Uma hora após o tratamento, os animais foram anestesiados e submetidos à uma inserção do pellet feito de fio dental pesando 20 mg.

O pellet foi retirado 7 dias após a implantação; no decorrer desse período, todos os grupos receberam diariamente administração da FHAS e dos controles. Um dia após o último tratamento, os animais foram sacrificados e os pellets retirados e secos a 70° C por 18 horas. O peso seco de cada pellet foi determinado e subtraiu-se desse valor 20 mg (peso inicial do pellet); a diferença foi considerada como relativa à fase proliferativa da resposta inflamatória. O experimento foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Swingle & Shideman com algumas modificações (1972).

a.5. Modelo de Pleurisia Induzido por Carragenina.

A técnica de pleurisia induzida por carragenina tem como parâmetro avaliar a infiltração celular (neutrófilos e mononucleares) na cavidade pleural, através de uma inflamação induzida por carragenina.

A técnica foi descrita por Mikani & Miyasaka, (1983). Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre (180 e 200 g) separados em grupos de 7 animais cada. Dois grupos receberam FHAS nas doses de 10 e 25mg/kg, enquanto o grupo controle positivo recebeu DEXA (2,5 mg/kg) e o negativo, uma solução de PEG Após 1 hora dos tratamentos, 0,2 ml de carragenina em solução salina foram administrados na cavidade pleural de cada animal.

Quatro horas após, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram a sua cavidade pleural aberta e lavada com 5 ml de tampão PBS heparinizado (5

µl/ml). O exudato resultante foi recolhido para a contagem total de células e contagem diferencial de neutrófilos e mononucleares em câmara de Neubauer.

a.6. Contagem Total de Leucócitos

A contagem total foi feita a partir de 10 µl do lavado pleural e 190 µl de solução de Turk (solução mãe: 2 ml de ácido acético glacial, 1 ml de solução de cristal violeta 1% em metanol e 97 ml de Água deionizada). A contagem total foi feita em câmara de Neubauer. Após a contagem, multiplicou-se o valor obtido por 50.000 para obter o valor total da contagem.

a.7. Contagem Diferencial

As lâminas foram preparadas com 200 µl de lavado pleural que foram colocados em citocentrífuga durante 10 min a 300 RPM. Após este tempo, as lâminas foram coradas com Hematoxilina 3 minutos e eosina 3 minutos. A contagem diferencial foi feita com a utilização de um contador digital de células obtendo-se a porcentagem de neutrófilos e mononucleares infiltrados.

a.8. Dosagem de MPO no Lavado Pleural

Foram coletados 250 µl do lavado pleural e 250 µl de uma solução de HTAB (Brometo de Hexadecil- Trimetil- Amonium diluído em Tampão fosfato 50Mm, ph 6,0). O material foi sonificado durante 10 s em banho de gelo e foi centrifugado a 12.000g a 4° C durante 15 minutos. Foi coletado 10 µl do sobrenadante que será misturado a 290 µl meio contendo 0,167 g/l de Dihidroclorato de O- Dianisidina, 0,0005% H₂O₂ diluído em tampão fosfato 50 Mm, ph 6,0). O sobrenadante acrescido do meio foi lido em placas de ELISA a

450 nm. Os valores de absorvância foram lidos 10 minutos em intervalos de 1 em 1 minuto e comparados com a curva padrão (MPO leucócito humano). Os valores da MPO serão dados em $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lavado. (Frode Saleh, 2000)

b. Testes Analgésicos

b.1. Modelo de Contorção Abdominal Causado por Injeção de Ácido Acético

Esse modelo caracteriza-se por contração e rotação do abdômen, seguida pela extensão das patas traseiras. Esta resposta motora decorre da aplicação de um estímulo nociceptivo por via intraperitoneal (ácido acético). É um modelo que promove a liberação de vários neurotransmissores que promovem a nocicepção, sendo um modelo sensível a substâncias analgésicas de ação central, ou de ação periférica com outro mecanismo de ação.

Para esse experimento foram utilizados camundongos Swiss machos (25 a 35 g) separados em grupos de 8 animais cada. Os camundongos receberam os tratamentos com FHAS (5, 10, 25 e 50 mg/kg), PEG e indometacina 5 mg/kg, todos administrados por gavagem. Uma hora depois receberam uma administração, via i.p., de ácido acético a 0,6%. Após a administração os animais foram separados individualmente e o número de contorções foi verificado durante 6 a 21 min. A atividade antinociceptiva das doses de FHAS foi avaliada de acordo com o número de contorções abdominais de acordo com a metodologia descrita por Koster *et al.*, (1959). Neste modelo, a possível ação antinociceptiva do EHAS também foi avaliada.

b.2. Modelo de Placa Quente

O modelo de placa quente visa avaliar a atividade analgésica mediante um estímulo nociceptivo térmico, que é avaliado pelo tempo de latência em que o animal permanece na superfície aquecida da placa.

Grupos de 8 camundongos swiss, pesando entre 30 a 35 g, foram pré-tratados com 10 mg/kg de morfina s.c. (controle positivo), 10 ml/kg solução PEG (controle negativo) e várias doses 5, 10, 25 e 50 mg/kg da FHAS. Os animais, colocados em um cilindro de vidro de 24 cm de diâmetro, foram selecionados 24 h antes, com base em sua reatividade para o teste, numa placa quente mantida a 56° C (Eddie & Leinbarck, 1953). O tempo de latência é considerado como aquele entre o animal colocar a pata na superfície da placa e retirá-la; somente aqueles animais que demonstraram um tempo de reação na faixa de 3,9 – 6,9 foram selecionados. Após os tratamentos, todos os animais foram avaliados nos tempos 0, 30, 60 e 90 min na placa quente novamente e um período de latência de 20 seg. foi estabelecido como completa analgesia.

b.3. Modelo de Tail Flick

O método descrito por Ness & Gebhart, (1986) avalia a nocicepção através de estímulo térmico na calda do animal, modulado por um reflexo medular. A magnitude da latência do reflexo da retirada da cauda fornece um índice do limiar nociceptivo do animal. Foram utilizados nesse experimento, camundongos Swiss machos em que foi avaliado previamente o tempo de latência basal, selecionando-se apenas aqueles com tempo entre 2 a 3 seg. Após seleção os animais (n=8 para cada grupo), receberam as várias doses da FHAS (5, 10, 25 e 50) e os controles PEG e o sufentanil (1µg/ kg) via intramuscular. O período

de latência foi avaliado nos tempos 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 e 240 min após os tratamentos. O valor da atividade farmacológica é considerado como efeito máximo possível (EMP), calculado da seguinte forma:

$$\text{EMP} = (\text{Latência teste-Linha Basal}) / (\text{Cut-off-Linha basal}) \times 100$$

O tempo de *cutt-off* foi dado como 10 seg. para evitar qualquer dano à cauda do animal e definido como completa analgesia.

c. Testes de Toxicidade

c.1. Dosagem de Albumina de Proteínas Totais

Para a avaliação da toxicidade da FHAS foram dosadas, no plasma, albumina e proteínas totais. Nesse experimento foram utilizados ratos Wistar (n=7), tratados durante uma semana com FHAS (nas doses de 10 e 25 mg/kg), com polietilenoglicol -200 (PEG) e DEXA na dose de 0,5 mg/kg. Todos os animais foram sacrificados no 8º dia. Amostras de sangue foram obtidas por veia caudal e centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos a 4º C. O plasma foi separado e utilizado para a dosagem de proteínas totais e albumina com o kit PROtal (Laborlab), adaptado para microensaio. Para a dosagem foram utilizados 2 µl de plasma e 200 µl de reativo Biureto (para proteínas totais), ou 200 µl de Verde de Bromocresol (albumina). Passados 10 min da adição dos reativos ao plasma, as amostras foram lidas em leitor de ELISA, na faixa de 540 nm (proteínas totais) e 620 nm (albumina). Os valores foram dados em g/dl.

c.2. Dosagem de Insulina Plasmática

Devido à capacidade dos GC de aumentar os níveis de insulina plasmática foi objetivo de este experimento avaliar a quantidade de insulina por ml nos grupos experimentais FHAS em comparação com o controle positivo DEXA.

Nesse experimento foram utilizados ratos Wistar (n=7) tratados com FHAS nas doses de 10 e 25 mg/kg e os controles utilizados foram tratados PEG e DEXA (0,5 mg/kg) durante uma semana. Os animais foram sacrificados no 8º dia. Amostras de sangue foram obtidas pela veia caudal e centrifugadas à 12.000 rpm por 15 minutos a 4° C. O plasma foi separado e a insulina foi dosada por radioimunoensaio; os valores apresentados foram apresentados em ng/ml segundo a metodologia de Scott *et al.* (1981).

c.3. Peso Corporal dos Animais

Durante o experimento subagudo também foi realizado um acompanhamento do peso dos animais para avaliar possíveis alterações do peso como possível efeito colateral provocado pelo controle positivo (DEXA) e também do FHAS sobre o metabolismo.

c.4. Avaliação do Peso da Glândula Adrenal

Após uma semana dos tratamentos descritos os animais foram sacrificados, por deslocamento cervical, e suas glândulas adrenais foram retiradas e pesadas aos pares (peso absoluto), no sentido de avaliar alterações de peso das mesmas. Também foi calculado o peso relativo por 100 g/animal de maneira a padronizar o peso dos grupos. Novamente foram avaliados os grupos controle negativo e positivo (PEG e DEXA 0,5 mg/kg, respectivamente) e a FHAS nas doses de 10 e 25 mg/kg.

c.5.Histologia da Glândula Adrenal

A histologia da glândula adrenal teve o objetivo de avaliar a ação GC da FHAS e do controle positivo DEXA no córtex da adrenal.

Após pesagem, os pares de glândulas adrenais foram conservados em formaldeído e depois passaram por um processo de convencional desidratação, com álcool e xilol. Após desidratação, as glândulas foram colocadas em blocos de parafina para serem cortadas em micrótomo (corte de 7 μ m). Após este procedimento, os cortes foram colocados em lâminas e corados com Hematoxilina e Eosina (HE). O Objetivo da análise histológica foi avaliar o efeito GC no córtex da adrenal, através como alteração nas zonas corticais.

IV.8. Análise Estatística

Para avaliação dos resultados e análise estatística foi utilizado o software Graph Pad PRIZMA 5.0.

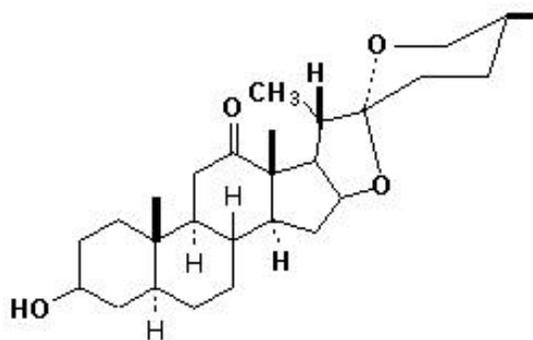
A avaliação estatística dos resultados foi realizada empregando-se análise de variância (ANOVA), com nível crítico igual ou menor que 0,05 ou 0,001 para rejeição de hipótese de nulidade. Na presença de significância na ANOVA procedeu-se à análise de contraste entre as médias pelo teste de Dunnet's e Tukey para os resultados com FHAS, e Tukey para testes com o EHAS com o valor de p como 0,05 de referência.

V. Resultados

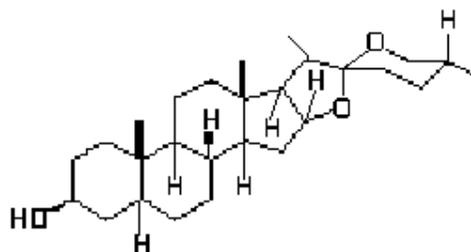
V.1 Análise Química

a) Substâncias Presentes na FHAS

A figura 1, abaixo, apresenta as sapogeninas esteroidais presentes na *A. sisalana* que foram separadas das cadeias laterais de açúcar através da hidrólise ácida seguida por refluxo. A FHAS, obtida a partir de refluxo em Hexano, definiu a característica lipofílica das sapogeninas. Foram essas as sapogeninas em mistura utilizadas para os testes farmacológicos.



FHAS: Sapogenina Esteroidal Hecogenina



FHAS: Sapogenina Esteroidal Tigogenina

Figura 1: Sapogeninas esteroidais presentes na FHAS

b) Análise por CLAE da Fração FHAS

Nas análises por CLAE foram observados picos com tempos de retenção similares aos apresentados pela sapogenina padrão Hecogenina (4,308 min). O perfil cromatográfico ($\lambda=212$ nm) da FHAS está apresentado na figura 2. Pode observar um pico majoritário com tempo de retenção de 4,308 min. e outros picos menores em 4,587; 4,946 e 5,285 min. A Figura 3 apresenta o perfil cromatográfico do padrão hecogenina, em que aparece o pico majoritário indicando a presença da mesma 4,308 min. e um pico menor representado pelo resíduo de tigogenina que apresenta um tempo de retenção um pouco maior 4,587 min. Na figura 4 tem-se o perfil cromatográfico da fração FHAS enriquecida com o padrão de Hecogenina, indicando que não há a detecção de outros picos na amostra. A Figura 5 apresenta a sobreposição dos picos das três figuras anteriores.

A figura 6 apresenta o espectro de absorção na região de UV do pico em 4,308 min da amostra da FHAS enriquecida com o padrão hecogenina (212 nm).

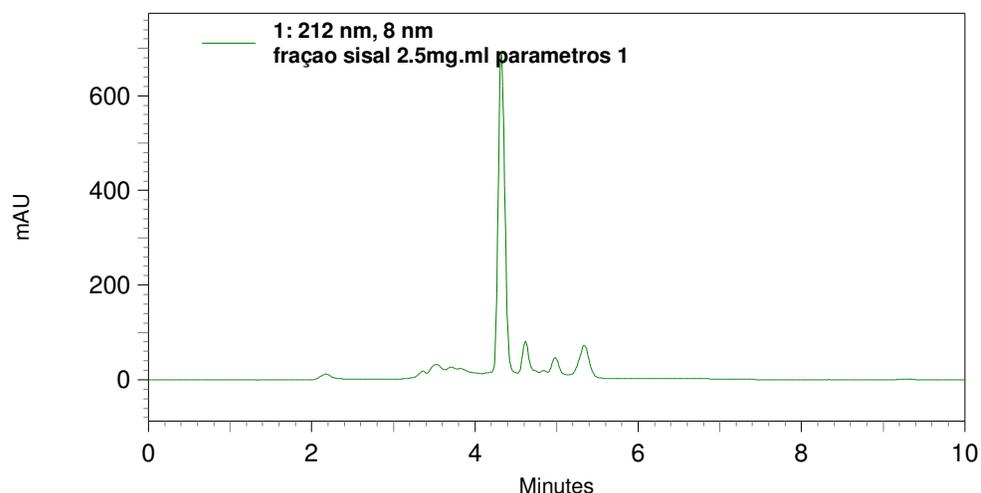


Figura 2: Cromatograma obtido por CLAE-UV/DAD da fração FHAS. Tempo de retenção de 4,30 minutos

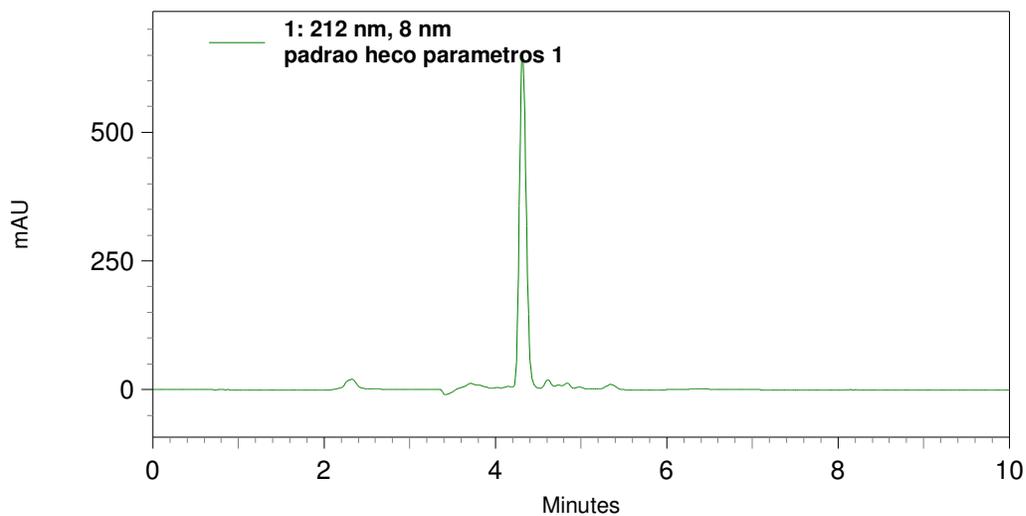


Figura 3: Cromatograma obtido por CLAE-UV/DAD da amostra Padrão de hecogenina tempo de retenção de 4,30 minutos.

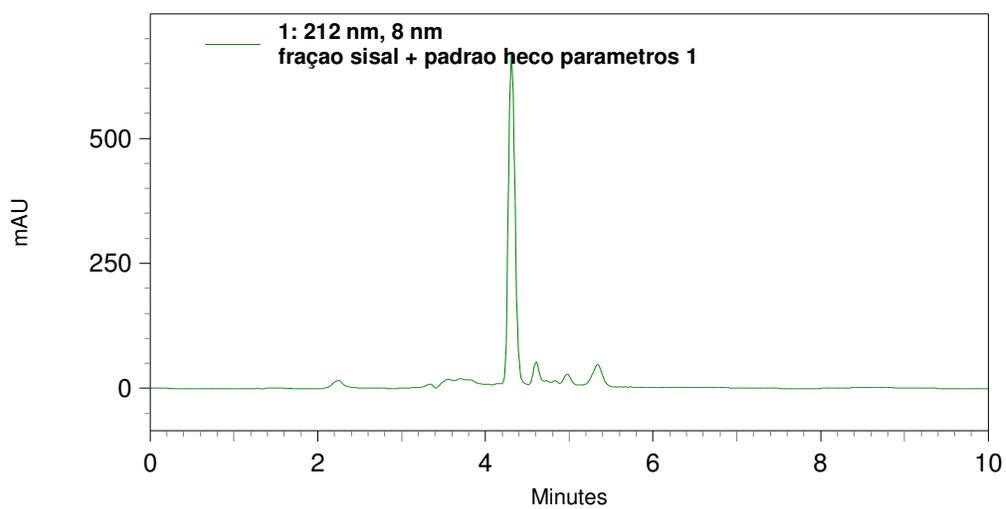


Figura 4: Cromatograma obtido por CLAE-UV/DAD da Co-injeção da FHAS e padrão hecogenina. Tempo de retenção de 4,30 minutos.

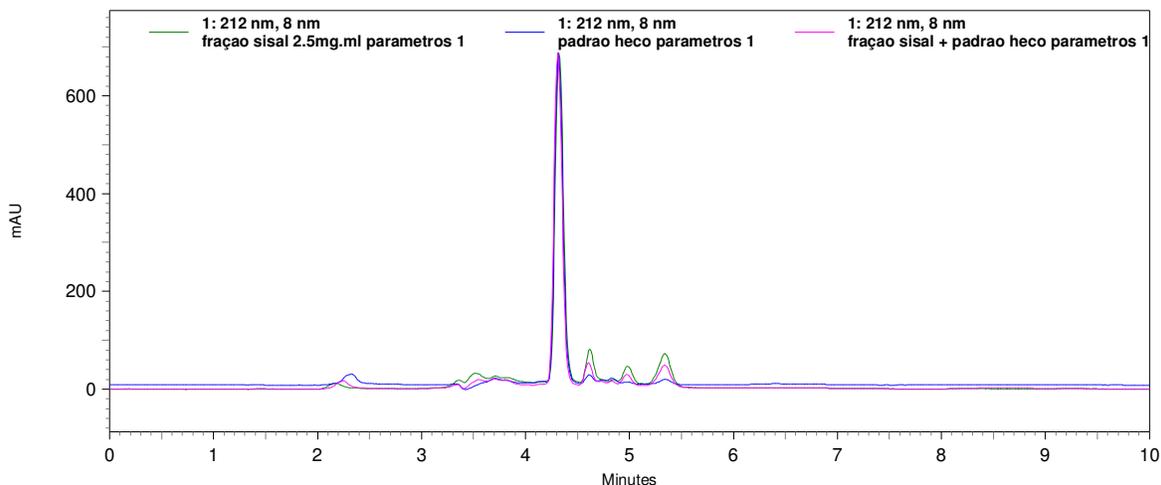


Figura 5: Sobreposição dos cromatogramas anteriores.

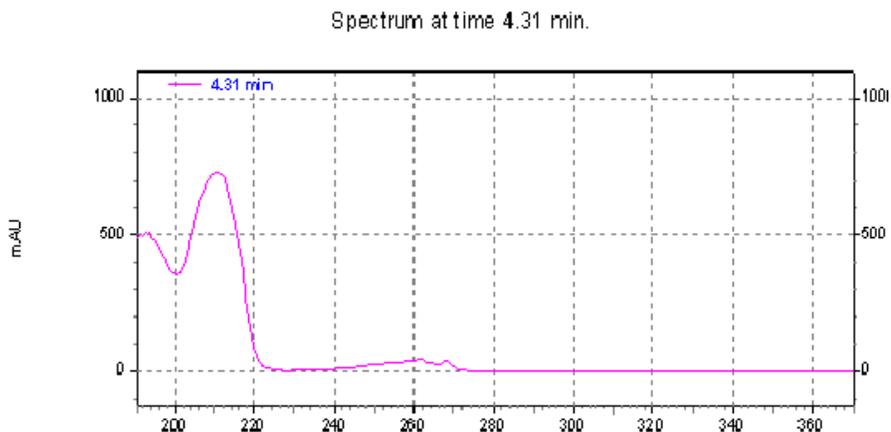


Figura 6: Espectro de absorção na região do UV para o pico cromatográfico com tempo de retenção de 4,31 minutos da co-injeção da fração FHAS e o padrão de hecogenina

c) Índice de Hemólise

O teste do índice de hemólise teve como objetivo avaliar a presença de saponinas com esta ação farmacológica que é típica para esta classe de substâncias. Nesse experimento, foram avaliados os índices de sucesso de hidrólise (em retirar as cadeias laterais de açúcar) comparando-se ECB, EHAS e FHAS. O objetivo da hidrólise foi reduzir o grau de hemólise e conseqüente liberação de hemoglobina. Um segundo objetivo de teste foi avaliá-lo com relação à toxicidade nas hemáceas.

Os testes mostram que houve redução da atividade hemolítica quando foram comparados FHAS e ECB, em relação à absorvância. Estes resultados indicaram redução no índice de hemólise. O EHAS apresenta redução do índice a partir de 25 µg/ml.

Tabela 2: Avaliação do índice de hemólise para o ECB, EHAS e FHAS, comparados com ECB não isotonzado e Salina.

Grupos	Valores de absorvância	Porcentagem hemolítica (%)
SB não Isotonizado	1,569	100
Salina	0,187	
ECB 100 µg/ml	1.361 ± 0.01	86,7
ECB 50 µg/ml	1.527 ± 0.03	97,3
ECB 25 µg/ml	1.607 ± 0.02	102,0
ECB 12,5 µg/ml	1.522 ± 0.02	97,0
ECB 6,25 µg/ml	0.931 ± 0.01	59,3
ECB 3,12 µg/ml	0.632 ± 0.008	40,3
EHAS 100 µg/ml	1.095 ± 0.02	69,8
EHAS 50 µg/ml	1.092 ± 0.18	69,6
EHAS 25 µg/ml	0.237 ± 0.08	15,1
EHAS 12,5 µg/ml	0.156 ± 0.02	9,9
EHAS 6,25 µg/ml	0.136 ± 0.02	8,6
EHAS 3,12 µg/ml	0.109 ± 0.01	6,9
FHAS 100 µg/ml	0.319 ± 0.007	20,3
FHAS 50 µg/ml	0.227 ± 0.02	14,4
FHAS 25 µg/ml	0.183 ± 0.007	11,6
FHAS 12,5 µg/ml	0.162 ± 0.03	10,3
FHAS 6,25 µg/ml	0.141 ± 0.007	8,9

Os resultados são expressos pela média das s ± desvio padrão.

Teste de Dunnet's $p < 0,001$ para FHAS e EHAS.

V.2 Testes Farmacológicos

a) Inflamação

Testes Preliminares – Extrato hidrolisado de *A.sisalana* (EHAS)

a.1) Edema de Orelha com Xilol

O edema de orelha com Xilol é um teste que avalia a formação de edema e o extravasamento plasmático. A figura 7 abaixo indica o efeito inibitório do EHAS por duas vias (v.o e i.p). O teste com o EHAS apresentou valores significativos para as duas vias v.o (13 ± 4 mg) com inibição de 52% e i.p (10 ± 2 mg) com inibição de 63%, comparados com os controles AAS ($13,5 \pm 4$ mg) inibição de 50% e Salina (27 ± 5 mg).

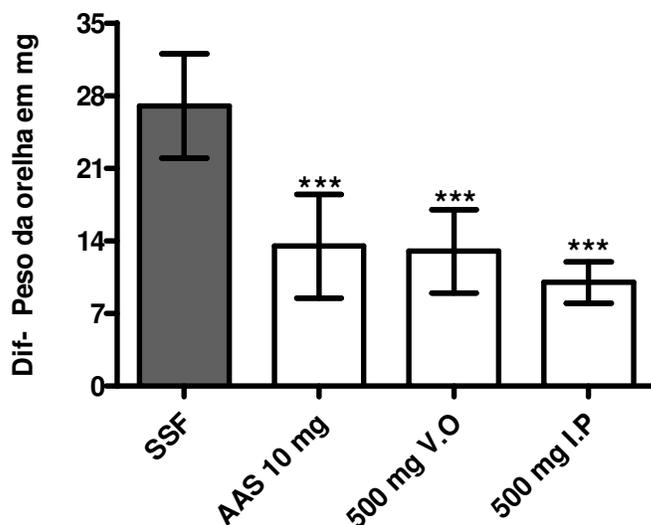


Figura 7: Efeito antiedematogênico no modelo de edema de orelha por xilol. Os dados no gráfico são apresentados na forma de média \pm d. p. *** indicam que $P < 0,0001$, comparando o EHAS por duas vias (v.o e i.p) e o controle positivo (AAS - 10 mg/kg) com o grupo controle negativo SSF (solução salina fisiológica) através do teste de ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

a.2) Edema de Pata com Carragenina

Nesse experimento foi avaliado o potencial do EHAS de inibir a ação inflamatória da carragenina em edema de pata que promove a liberação de diferentes mediadores inflamatórios.

Os resultados obtidos após o pré-tratamento com EHAS estão apresentados na forma de média \pm de desvio padrão (Figura 9). O EHAS demonstrou, no edema, inibição significativa, quando comparado ao grupo Salina. EHAS, administrado v.o, apresentou 19% de inibição (42 ± 5 mg) e 67% de inibição administrado i.p (17 ± 4 mg), quando comparado aos controles SSF (52 ± 5 mg). A INDO, o padrão utilizado apresentou inibição de 81% ($10,05 \pm 5$ mg).

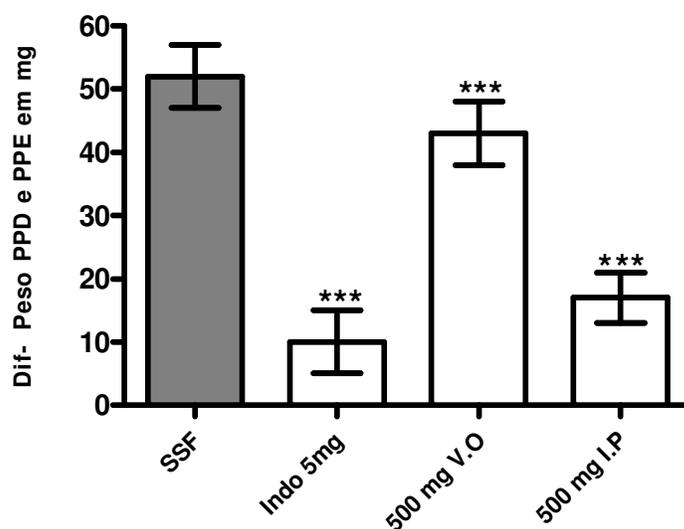


Figura 8: Efeito Antiinflamatório do EHAS nas vias v.o e i.p no modelo de edema de pata induzido por carragenina. Os valores são apresentados na forma de média e d.p a análise estatística realizada por teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey. *** $p < 0,0001$ para as duas vias (v.o e i.p) e controle positivo (INDO 5mg/kg) comparado ao controle negativo SSF.

a.3) Contorções Abdominais

No modelo de contorções abdominais por ácido acético foram feitos testes preliminares com o EHAS na dose de 500 mg/kg na vias v.o e i.p, e ambas mostraram-se ativas em reduzir as contorções. Os valores obtidos neste experimento aparecem como média do número de contorções \pm dp da porcentagem de inibição e estão resumidos na Tabela 3. EHAS, administrado na dose de 500 mg/kg v.o, produziu 30% de inibição sobre as contorções, enquanto essa mesma dose, administrada por via i.p, produziu 88% de inibição, quando ambos os grupos foram analisados em comparação ao grupo solução salina fisiológica SSF. Utilizando-se o mesmo critério de comparação, a droga padrão AAS (10 mg/kg) inibiu 71 % das contorções abdominais.

Tabela 3: Efeitos de EHAS, AAS e SSF sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.

Grupos	Número de Contorções	Inibição (%)
SSF	52 \pm 4	—
AAS	15,3 \pm 5 ***	70,6
EHAS 500 mg V.O	36 \pm 4 ***	30,7
EHAS 500 mg I.P	6 \pm 2 ***	88,7

Valores apresentados como média \pm d.p e porcentagem de inibição. Valores significativos em ***P<0.0001 dos grupos tratados com o controle negativo SSF.

Testes Fração Hexânica de *A.sisalana* (FHAS)

a.4) Edema de orelha com Xilol

O teste feito com a FHAS, nas doses de 5; 10; 25 e 50 mg/kg (dados apresentados na figura 9). Todas as doses apresentaram uma redução significativa do edema. A dose de 5 mg/kg apresentou uma redução de 52 % ($6,6 \pm 2,4$ mg), a dose de 10 mg/kg apresentou uma redução de 71,6% ($3,9 \pm 1,4$ mg). Já a dose de 25 mg/kg reduziu o edema em 62% ($5,2 \pm 1,9$ mg) mg/kg e por fim a dose de 50 mg/kg inibiu o edema 42,4% ($7,9 \pm 1,5$). A inibição foi significativa quando comparada ao controle negativo polietilenoglicol 200 - PEG ($13,70 \pm 3,6$ mg) e o fármaco padrão a INDO (5 mg/kg), que inibiu em 73,8% ($3,6 \pm 1,2$ mg).

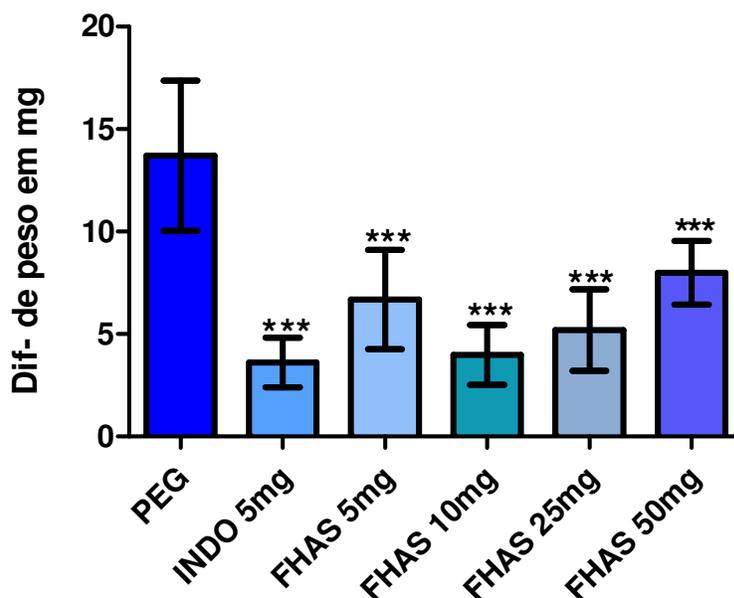


Figura 9: A atividade antiedematogênica da FHAS (doses de 5;10;25;50 mg/kg) .Os valores são apresentados no gráfico como média e d.p da diferença de peso entre orelha esquerda e direita. *** Indica o valor de $P < 0,0001$ quando são comparados os valores dos grupos experimentais e controle positivo (INDO-5mg/kg) com o grupo controle PEG Teste de ANOVA seguido por teste de Dunnet's e teste de Tukey.

a.5) Edema de Pata - Método de Winter

O método de Winter para edema de pata difere do método mostrado nos testes preliminares por apresentar diferentes estágios da evolução do edema, num período de quatro horas (dados mostrados na figura 10). Nesse modelo, apenas a dose de 25 mg da FHAS apresentou valores inibitórios significativos em comparação ao controle negativo PEG durante todo o período do teste. A FHAS apresentou um valor médio do tempo experimental de $0,233 \pm 0,11$ ml (valor médio dos tempos) enquanto os controles apresentaram $0,551 \pm 0,28$ ml e $0,198 \pm 0,09$ ml (PEG e DEXA - 2 mg/kg, respectivamente). A inibição média da FHAS foi 58%, enquanto a inibição da DEXA foi de 64%.

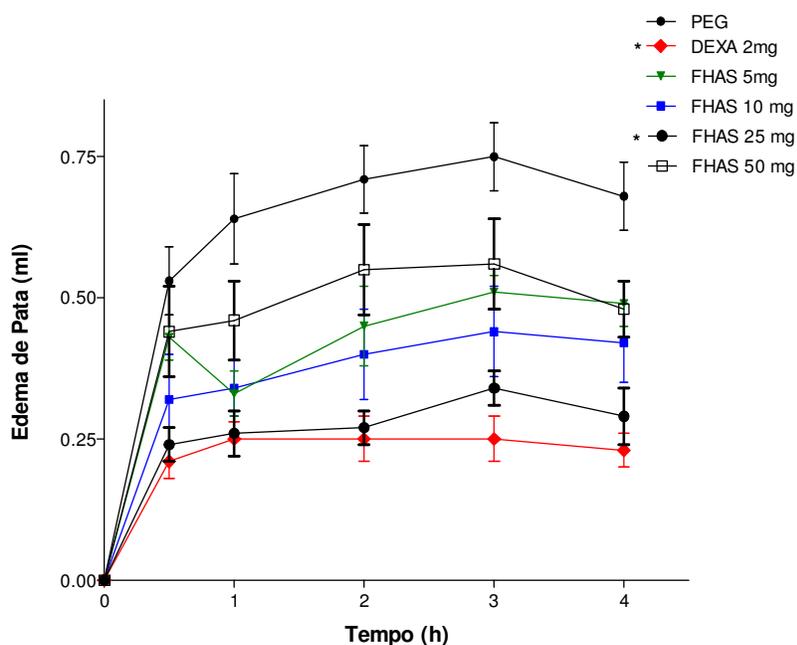


Figura 10: Efeito anti-inflamatório da FHAS durante o edema de pata valores da média e d.p do volume deslocado de água em ml. ANOVA seguido pelo teste de Dunnet's * $p < 0,05$ para a dose de 25mg/kg e controle positivo DEXA (2 mg/kg) em comparação com o controle negativo PEG.

a.6) Granuloma *Cotton Pellet*

O modelo inflamatório experimental de granuloma (*cotton pellet*) teve como objetivo avaliar o processo inflamatório mais cronicamente instalado utilizando-se, como parâmetro, a infiltração de neutrófilos em direção ao pellet implantado nos animais. Foram testadas as doses de 10 mg e 25 mg de FHAS e ambas, além do controle positivo DEXA (0,5 mg/kg), apresentaram inibição significativa da infiltração. Os valores, mostrados como média \pm dp na figura 11 indicam inibição de 46% ($35 \pm 6,9$ mg) para FHAS (10 mg/kg) e de 58% ($27 \pm 3,9$ mg) para FHAS (25 mg/kg), enquanto a inibição obtida pela DEXA foi de 90 % ($6,8 \pm 4,4$ mg), quando os valores dos tratamentos foram comparados ao controle PEG (65 ± 6 mg).

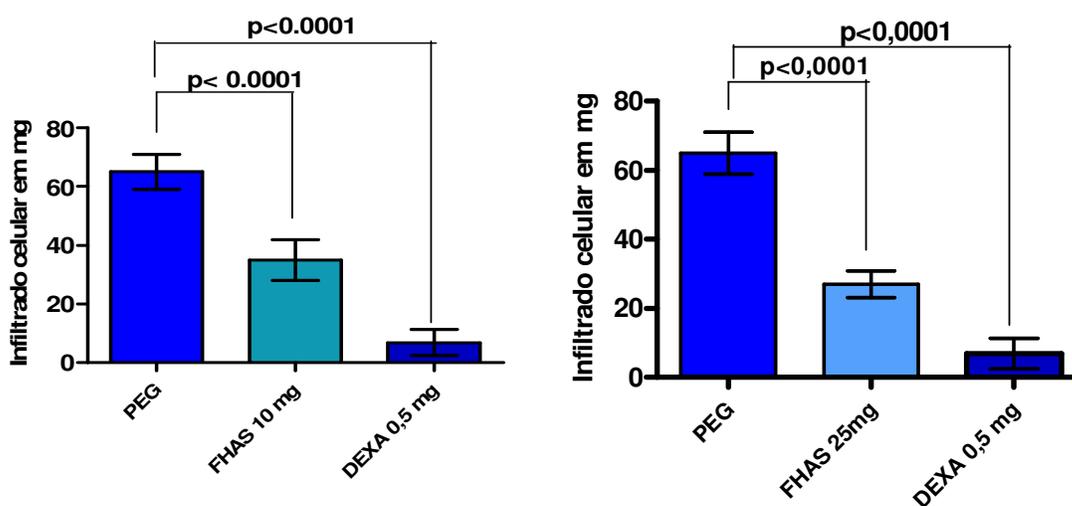


Figura 11: Efeito inibitório da FHAS (10 e 25 mg/kg) e DEXA(0,5 mg/kg) no modelo de inflamação crônica *cotton pellet*. Os valores são expressos como média \pm d.p do infiltrado celular nos pellets. Foi feito o teste de ANOVA seguido de Dunnet's e de Tukey em ambos o valor de significância $p < 0,0001$ em comparação com o controle negativo (PEG).

a.7) Modelo de Pleurisia Induzido por Carragenina

O próximo modelo empregado corrobora os resultados obtidos com o modelo anterior, para a avaliação da infiltração celular; só que agora a infiltração ocorre em outro sítio de inflamação. O modelo de pleurisia utiliza-se da carragenina administrada na cavidade pleural do animal, o que induz uma inflamação com a conseqüente infiltração de leucócitos. Nesse modelo foram feitas contagem total (Figura 12) e contagem diferencial específica para células polimorfonucleares (neutrófilos) e mononucleares (Figuras 13 e 14).

Os valores apresentados como média \pm dp da estimativa celular na cavidade pleural, apresentados na Figura 12, demonstram que na contagem total, ambas as doses testadas de FHAS (10 e 25 mg/kg) produziram redução na infiltração (41 e 50 %, respectivamente) com um potencial mais promissor para a dose de 25 mg. Os valores apresentados para contagem total foram de $2,25 \times 10^6 \pm 0,48$ (FHAS 10 mg/kg) e $1,89 \times 10^6 \pm 0,48$ leucócitos/ cavidade (FHAS 25 mg/kg) em relação ao PEG $3,8 \times 10^6 \pm 0,87$ leucócitos/ cavidade. Já a DEXA produziu 76 % de redução na infiltração com um valor de $0,9 \times 10^6 \pm 0,13$ leucócitos/cavidade.

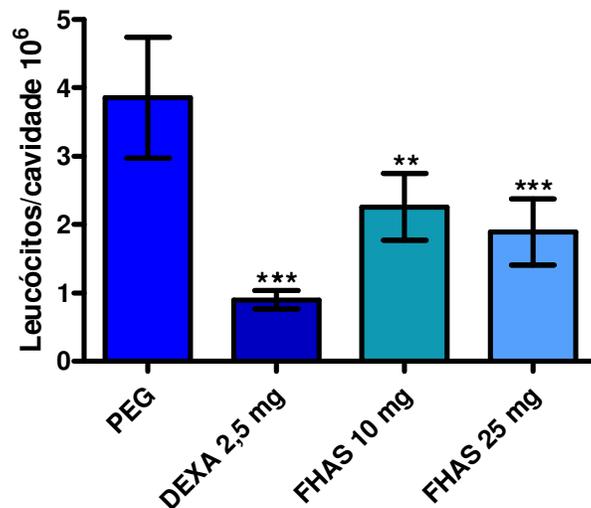


Figura 12: Inibição do infiltrato celular pela FHAS e DEXA através do modelo de pleurisia induzido por carragenina. Valores apresentados em média \pm d.p. do total de células infiltradas na cavidade pleural. Teste de ANOVA seguido de Dunnet's com valor de ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$ em comparação com o controle negativo (PEG).

A contagem diferencial foi feita para evidenciar e indicar qual tipo celular apresentou maior alteração. Com valores expressos em média \pm dp da estimativa total de células, a Figura 13 mostra que o tratamento dos animais, com ambas as doses de FHAS (10 mg/ kg e 25 mg/ kg), produziu redução significativa na contagem de neutrófilos em 55% e de 62%, respectivamente. Enquanto os valores de neutrófilos para FHAS (10 mg/kg e 25 mg/kg) foram de $1,29 \pm 0,30 \times 10^6$ e $1,08 \pm 0,31 \times 10^6$ neutrófilos/ cavidade, respectivamente, aqueles de PEG estiveram em $2,86 \pm 0,74 \times 10^6$ neutrófilos/ cavidade. Já a DEXA com valores de $0,29 \pm 0,07 \times 10^6$ neutrófilos/ cavidade apresentou 90% de inibição na migração de neutrófilos quando comparada ao PEG.

Para os mononucleares (Figura 14), os valores de migração destas células para o sítio inflamatório, quando comparados a aqueles obtidos para o PEG ($1,18 \pm 0,29 \times 10^6$ mononucleares/ cavidade), só se mostraram significativos quando os animais foram tratados com FHAS na dose de 25 mg/ kg ($0,78 \pm 0,16 \times 10^6$ mononucleares/ cavidade), ou uma redução de 34% na migração. A DEXA ($0,61 \pm 0,14 \times 10^6$ mononucleares/ cavidade), assim como FHAS na dose de 25 mg/ kg, inibiu em 48% a migração destas células, quando seus valores foram comparados ao controle PEG.

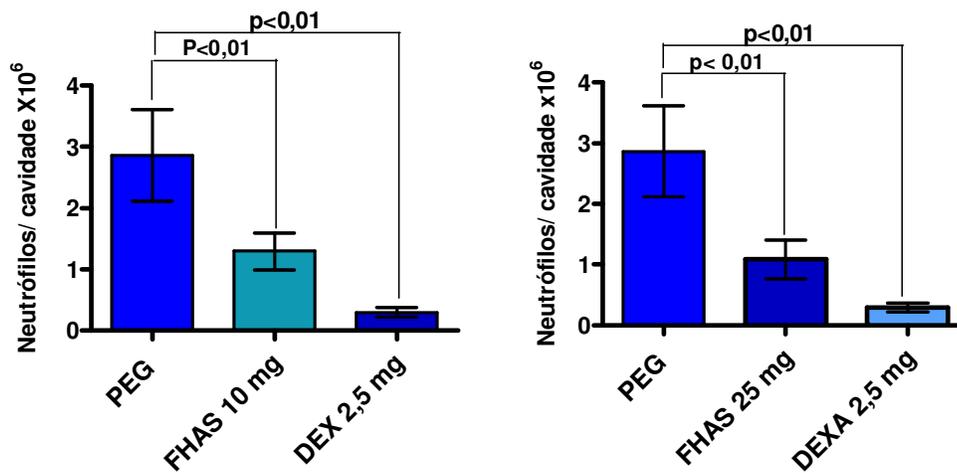


Figura 13: Redução da infiltração de neutrófilos na contagem diferencial de células no modelo de pleurisia induzida por carragenina pela ação da FHAS e DEXA. Valores expressos como média \pm d.p de neutrófilos por cavidade pleural. Teste de ANOVA seguido de Dunnet's, valores significativos de $p < 0,01$ em comparação com o controle negativo polietilenoglicol (PEG).

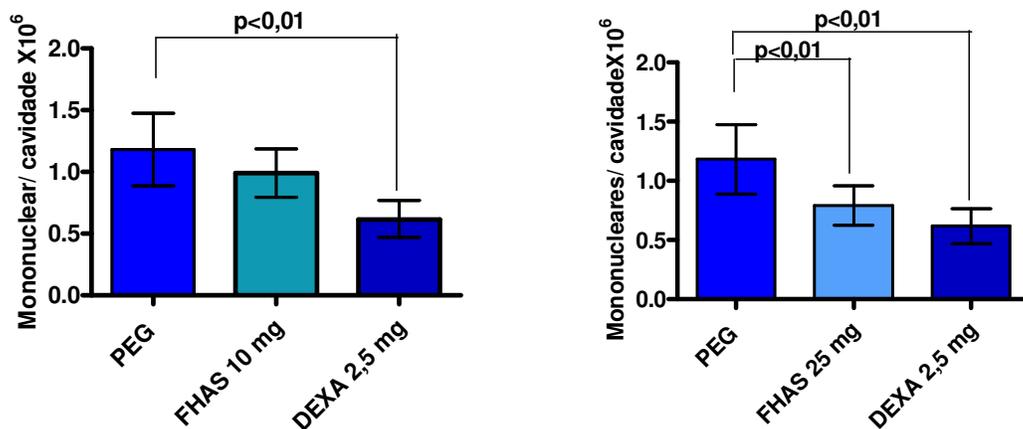


Figura 14: Redução de mononucleares na cavidade pleural pela FHAS e controle positivo DEXA, dados obtidos a partir da contagem diferencial de células no modelo de pleurisia induzida por carragenina. Valores expressos como média \pm d.p por cavidade pleural. Teste de ANOVA seguido de Dunnet's, valores significativos de $p < 0,01$ comparados ao controle negativo polietilenoglicol (PEG).

a.8.) Dosagem de MPO pelo lavado Pleural.

A figura 15 apresenta o gráfico com os valores da MPO no lavado pleural obtido através da pleurisia induzida por carragenina, no modelo experimental, a dose de 25 mg/kg apresentou uma redução significativa da MPO no lavado pleural de 43% ($7,8 \pm 1,20 \mu\text{g/ml}$), o controle positivo (DEX 2,5 mg/kg) apresentou redução significativa ($p < 0,0001$) inibindo 84% ($2,2 \pm 0,15 \mu\text{g/ml}$), enquanto a FHAS 10 mg/kg apresentou respectivamente $10,5 \pm 1,13 \mu\text{g/ml}$, quando comparados ao controle negativo polietilenoglicol 200 (PEG) $13,29 \pm 2,39 \mu\text{g/ml}$.

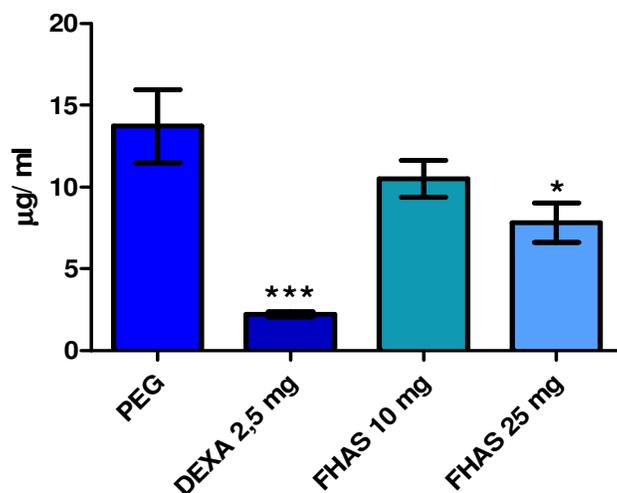


Figura 15. Redução dos valores da MPO pela FHAS e controle positivo DEXA (2,5 mg/kg). Valores expressos como média \pm d.p de MPO (μg por ml) do lavado pleural. Os valores são expressos como média \pm d.p. * $p < 0,05$ e *** $P < 0,0001$.

b) Atividade Analgésica

b.1) Contorções Abdominais

Na Figura 16 estão expressos os valores em média \pm desvio padrão do número de contorções obtidas após o tratamento dos animais com FHAS, INDO e PEG. O tratamento oral com a FHAS, administrada nas doses de 5; 10; 25 e 50 mg/kg, mostrou inibir, de modo significativo, as contorções abdominais ($31,8 \pm 2$; $21,6 \pm 5$; $24,3 \pm 4$ e 33 ± 8 , respectivamente), quando o mesmo foi comparado ao grupo tratado com PEG ($47,4 \pm 11$); porém, esta inibição (22, 54, 48 e 30%, respectivamente) não se deu de modo dose-dependente. Da mesma maneira, a INDO ($26 \pm 5,9$) inibiu as contorções em 45%.

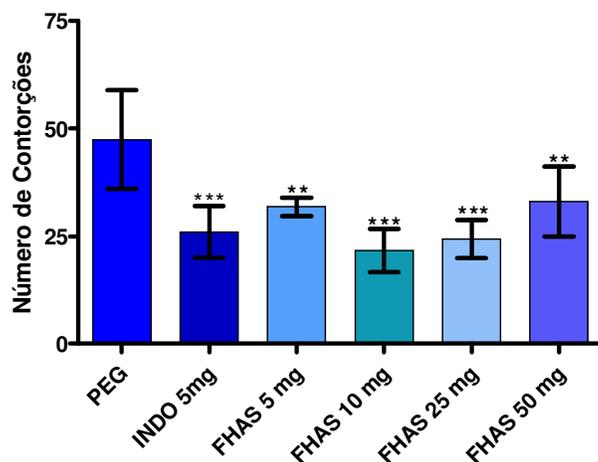


Figura 16: O gráfico apresenta a redução significativa do número de contorções abdominais induzida por ácido acético pela FHAS e controle positivo INDO (5mg/kg). O número de contorções abdominais é apresentado como média \pm d.p de cada grupos tratado. Foi realizado o teste de ANOVA seguido de Dunnet, valores de significância ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

b.2) Modelo de Placa Quente

Após uma premissa positiva de potencial analgésico no modelo de contorções abdominais, o modelo de placa quente teve o objetivo de avaliar o potencial analgésico relacionado ao SNC. O teste de placa quente apresentou, atividade analgésica voltada para o sistema nervoso central. A tabela 4 resume os resultados obtidos neste experimento. Os valores estão expressos como média e dp do período de latência em segundos. Nesse modelo além do controle positivo morfina, as doses de 10, 25 e 50 mg/kg apresentaram aumento do tempo de latência a partir dos 90 minutos. Respectivamente $7,4 \pm 1,24$ (50 mg/kg) para os 90 minutos e $5,91 \pm 0,89$ (10mg/kg), $6,58 \pm 0,68$ (25 mg/kg) e $7,49 \pm 1,14$ (50 mg/kg), valores apresentados por volta dos 120 minutos.

Tabela 4 Valores dos tempos de latência expressos por média e erro padrão Teste de Dunnet, *p<0.05; **p<0.01

Grupos	Tempo de latência (s)				
	Dose	30 min	60 min	90 min	120min
PEG	10ml/kg	2,85 ± 0,24	3,42 ± 0,31	3,27 ± 0,21	3,41 ± 0,26
Morfina	10mg/kg	12,34 ± 1,24**	15,03 ± 2,1**	6,25 ± 0,79*	4,36 ± 0,46
FHAS	5 mg/kg	3,7 ± 0,55	5,63 ± 1,01	4,45 ± 0,86	5,41 ± 0,37
FHAS	10mg/kg	5,81 ± 0,53	7,16 ± 0,69	5,78 ± 0,65	5,91 ± 0,89*
FHAS	25mg/kg	5,68 ± 1,16	5,23 ± 0,49	5,54 ± 0,65	6,58 ± 0,68**
FHAS	50 mg/kg	5,61 ± 0,4	6,65 ± 0,68	7,4 ± 1,24*	7,49 ± 1,14**

b.3) Teste de Tail Flick

O Tail Flick é um teste semelhante ao modelo de placa quente. Nesse experimento, FHAS nas doses de 10, 25 e 50 mg/kg demonstrou um período de latência maior do que o controle negativo (PEG). Os resultados são expressos como média e d.p da latência (Tabela 5) e como EMP (Efeito Máximo Possível) mostrado na Tabela 6.

Tabela 5: Evolução temporal da latência, no teste de tail flick em camundongos pré tratados com sufentanil e a FHAS.

Tempo de Observação min	Latência(s)					
	PEG	Sufentanil	FHAS 5 mg	FHAS 10mg	FHAS 25mg	FHAS 50mg
0	3.24 ± 1.35	3.8 ± 1,92	2,08 ± 0,75	2,72 ± 1,27	2,41 ± 0,51	2,83 ± 0,71
15	3,60 ± 1,57	9,28 ± 1,49*	3,16 ± 1,60	5,45 ± 2,33	3,83 ± 1,33	5,50 ± 2,68
45	3,10 ± 1,59	9,42 ± 1,51*	3,20 ± 0,70	5,45 ± 1,96*	5,66 ± 1,87*	7,58 ± 1,78*
60	2,50 ± 1,35	9,71 ± 0,75*	2,80 ± 0,93	4,85 ± 1,37*	7,08 ± 1,56*	5,75 ± 1,71*
90	2,50 ± 1,58	9,71 ± 0,75*	3,33 ± 1,50	5,77 ± 2,26*	6,60 ± 1,95*	4,80 ± 1,11*
120	3,30 ± 1,41	10 ± 0,0*	3,16 ± 1,47	4,90 ± 1,51	5,58 ± 1,97*	6,25 ± 1,76*
180	2,80 ± 0,91	8 ± 1,91*	3,10 ± 1,43	4,60 ± 1,79	5 ± 1,70*	6,37 ± 1,70*
240	2,70 ± 0,94	6,85 ± 1,06*	2,66 ± 1,03	3,18 ± 1,77	3,62 ± 1,43	3,66 ± 1,72

Tabela 5: Dados apresentados como média ± d.p. Teste de ANOVA, seguido pelo teste de Dunnet's. Valores de significância comparados com o PEG. Sufentanil (p<0,0001) FHAS 10, 25 e 50 (P<0,01).

Tabela 6: Representação do EMP na evolução temporal de latência, no teste de Tail flick em camundongos pré-tratados com sufentanil e a FHAS.

Tempo de Observação min	EMP%					
	PEG	Sufentanil	FHAS 5 mg	FHAS 10mg	FHAS 25mg	FHAS 50mg
0	---	---	---	---	---	---
15	-2,0	90,6*	14,1	37,5	18,7	37,2
45	-10,9	95,3*	9,0	37,5	42,8*	66,2*
60	-10,9	95*	15,7	29,2*	61,5*	40,7*
90	0,8	100*	13,6	41,8*	55,2*	27,4*
120	-6,5	67,7*	12,8	29,9	41,7*	47,6*
180	-7,9	49,1*	7,3	25,8	34,1*	49,3*
240	5,3	88,3*	13,6	6,3	15,9	11,5

Dados apresentados como EMP apresentando o máximo efeito de inibição da FHAS e Sufentanil.

c) Análise da Toxicidade

c.1) Proteínas Totais

Os resultados de proteínas totais estão apresentados em g/dl de plasma na tabela 7. Os valores foram dados em média \pm d.p e também em porcentagem de aumento. As doses da FHAS não apresentaram alteração significativa nos níveis de proteínas plasmáticas quando comparado ao grupo controle negativo PEG. O controle positivo DEXA, também não apresentou alterações quando comparado com o PEG.

Tabela 7: Dosagem de proteínas totais valores apresentados em média \pm d.p. Teste de ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Grupos	Proteínas Totais g/dl
	Média \pm d.p
PEG	4,95 \pm 0,543
DEXA	5,69 \pm 0,390
FHAS 10	5,93 \pm 0,506
FHAS 25	5,64 \pm 0,397

c.2) Albumina Plasmática

Nas dosagens de albumina plasmática os valores estão apresentados na forma de média \pm d.p. na Tabela 8. A utilização das duas doses de FHAS (10 e 25 mg/kg) não produziu alterações significativas nos níveis de albumina plasmática quando as mesmas foram comparadas aos níveis do grupo controle negativo (PEG). O grupo controle positivo tratado com DEXA também não apresentou alteração, de modo significante (15%), nos níveis de albumina plasmática quando os mesmos foram comparados ao grupo tratado com PEG ($2,9 \pm 0,25$ e $2,5 \pm 0,14$ g/ dl, respectivamente). A FHAS apresentou respectivamente $2,7 \pm 0,33$ g/dl (FHAS 10 mg/ kg) e $2,8 \pm 0,34$ g/dl (FHAS 25 mg/ kg).

Tabela 8: aumento dos níveis de albumina plasmática. Valores expressos na forma de média d.p. Teste de Anova seguido pelo teste de Tukey.

Grupos	Albumina Plasmática g/dl
	Média \pm d.p
PEG	$2,54 \pm 0,142$
DEXA	$2,92 \pm 0,251$
FHAS 10	$2,73 \pm 0,337$
FHAS 25	$2,80 \pm 0,342$

c.3) Dosagem de Insulina Plasmática

A avaliação da insulina plasmática foi expressa pela média \pm e.p e os resultados estão reunidos na Figura 17. Comparado ao grupo tratado com PEG, apenas o controle positivo DEXA apresentou aumentos significativos nos níveis de insulina plasmática que foram observados. Os valores apresentados foram de $16,8 \pm 1,9$ ng/ ml para a DEXA. As

doses de FHAS apresentaram $3,8 \pm 0,41$ e de $4 \pm 1,17$ ng/ ml respectivamente (10 e 25 mg/kg) e $3,7 \pm 1$ ng/ ml para o PEG. De acordo com os dados apresentados a DEXA provocou um aumento de 454% de insulina plasmática em comparação ao controle negativo PEG.

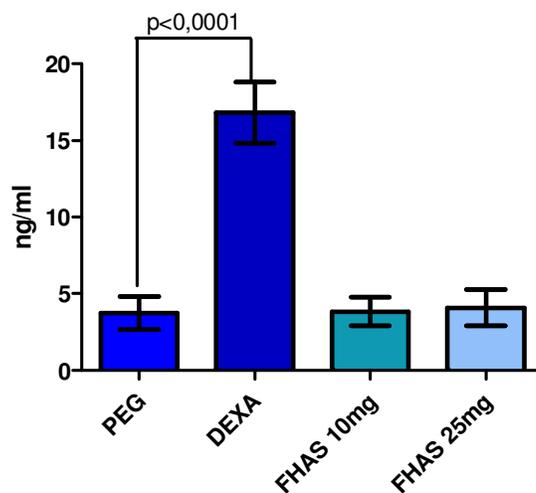


Figura 17: Avaliação do aumento da concentração de insulina plasmática na FHAS e grupo controle positivo DEXA. Valores expressos pela média \pm e.p. Teste de ANOVA seguido por Dunnet's. $P < 0,0001$ apenas para o grupo DEXA em comparação com o grupo PEG.

c.4) Evolução do Peso Corporal dos Animais

O acompanhamento de peso dos animais durante o experimento crônico indica uma queda significativa de peso do grupo DEXA. Os demais grupos não apresentaram queda no peso, no decorrer do tratamento. Os valores são expressos pela média de peso. Todos os grupos apresentaram peso em torno de 220g, e terminaram o tratamento com peso médio de 240 g exceto o grupo DEXA que apresentou um valor reduzido de 197 g, ou seja, 18% da massa corpórea.

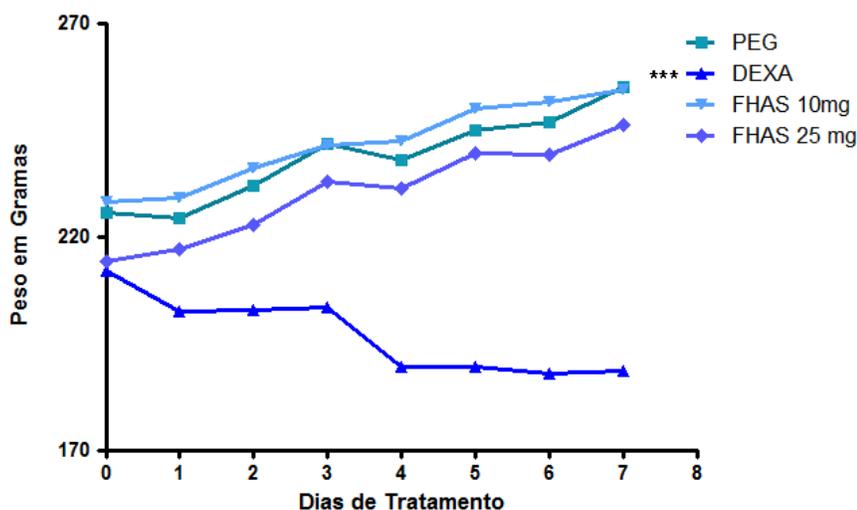


Figura 18: O gráfico apresenta a avaliação do peso dos animais, no decorrer de 8 dias de tratamento. Valores expressos pela média do peso dos animais, teste de ANOVA seguido pelo teste de Dunnet's *** $p < 0,0001$.

c.5. Avaliação do Peso da Glândula Adrenal

A determinação do peso da glândula adrenal foi feita após a avaliação do peso total. Foi feito o peso relativo em mg de adrenal por 100g de animal. Apenas o grupo DEXA apresentou redução do peso da glândula adrenal. Os valores foram 120 ± 23 mg (PEG), $61 \pm 8,6$ mg (DEXA), $106,7 \pm 20$ mg (FHAS 10 mg/kg) e $91,3 \pm 11$ mg (FHAS 25 mg/kg).

Tabela 9: Análise do peso relativo da adrenal em animais tratados durante uma semana com as duas doses de FHAS e DEXA. Teste de ANOVA seguido por teste a posteriori de Dunnet's * $p < 0,05$ para DEXA em comparação com o controle PEG

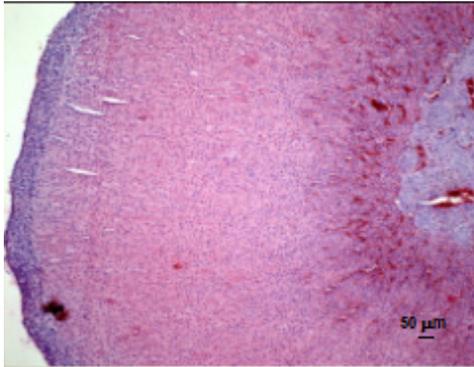
Grupos	Glândula Adrenal		
	Peso Absoluto (mg)	Peso médio do animal (g)	Peso Relativo (mg/100g animal)
PEG	$120,2 \pm 23,6$	$238,7 \pm 10,6$	$0,044 \pm 0,007$
DEXA	$61,00 \pm 8,6$	$197,1 \pm 9,2$	$0,031 \pm 0,005^*$
FHAS 10 mg/kg	$106,7 \pm 20,2$	$241,8 \pm 10,0$	$0,040 \pm 0,010$
FHAS 25 mg/kg	$91,28 \pm 11,2$	$230,5 \pm 11,4$	$0,037 \pm 0,005$

c.6. Histologia da Glândula Adrenal

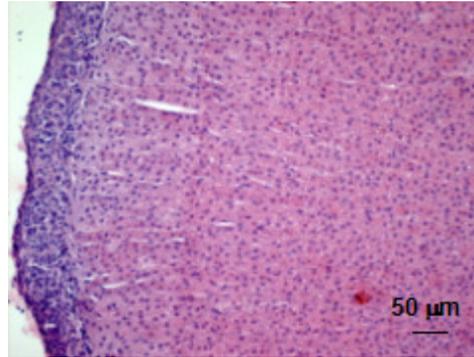
Após a pesagem, as glândulas sofreram um processo de desidratação e foram preparadas, para histologia. A histologia comparou os 3 grupos, PEG, FHAS 25 mg/ kg e DEXA. As imagens (A1, B1 e C1) apresentam as glândulas em aumento de 10 (a2) vezes, apresentando uma visão geral do córtex com suas respectivas zonas secretora (tom avermelhados) e a medula (roxo).

Qualitativamente não há diferença entre o PEG (A1) e a FHAS (B1) 25 mg/ kg, enquanto a DEXA apresenta uma redução do córtex (Ver proximidade do córtex com medula). As imagens A2, B2 e C2 estão no aumento de 20X (a3) e foca melhor as zonas granular, fasciculada e reticular, novamente entre o PEG (A2) e a FHAS (B2) não há diferença visual, e há uma clara diferenciação entre as três zonas, mas o grupo DEXA apresenta diferenças com relação à integridade das zonas fasciculada e reticular.

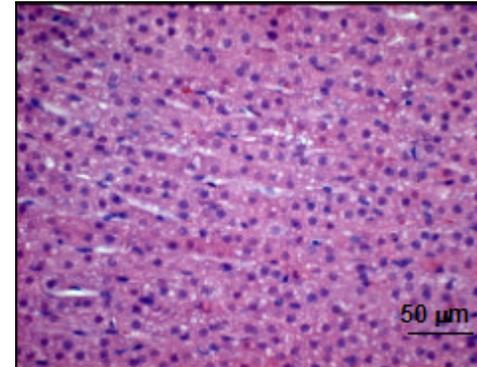
E as imagens A3, B3 e C3 estão em um aumento de 40 X (a4) em que são visíveis os grânulos lipídicos. Apenas no grupo DEXA evidencia-se a perda desses grânulos, enquanto os grupos PEG e FHAS foram observados a presença dos grânulo



A1- 10X HE a2

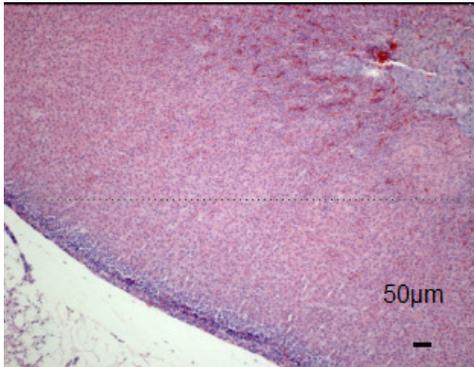


A2- 20X HE a3

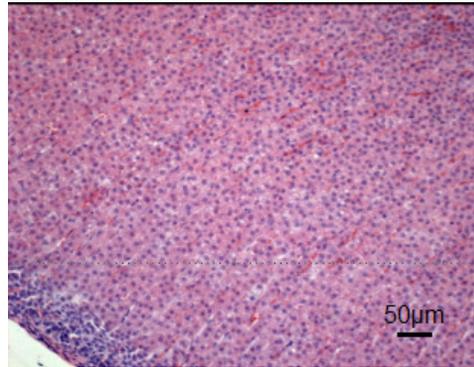


A3- 40X HE a4

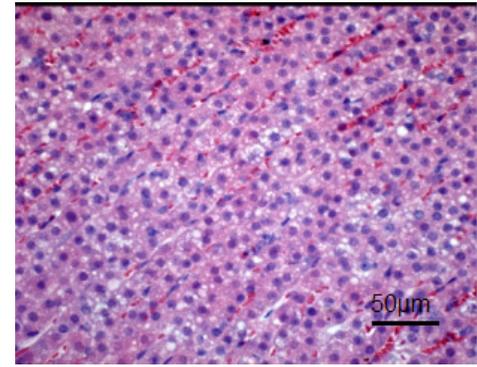
PEG



B1- 10X HE a1

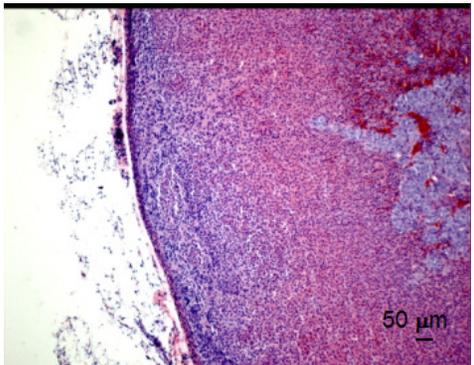


B2- 20X HE a2

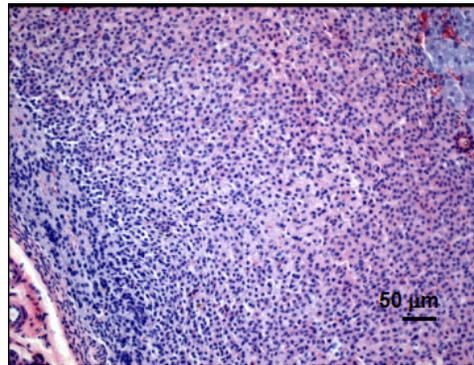


B3- 40 X HE a3

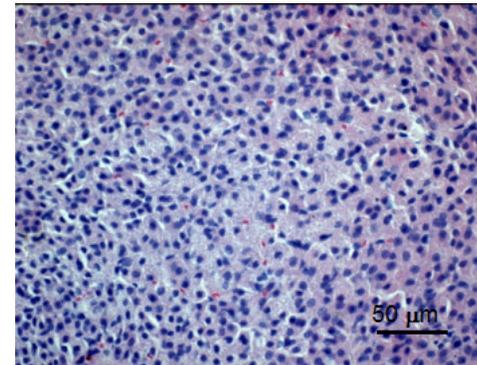
FHAS 25 mg



C1- 10X HE a1



C2- 20X HE a3



C3- 40 X HE a4

DEXA

VI. Discussão

As saponinas são amplamente utilizadas na medicina popular e trazem contribuições benéficas à saúde (Kerwin, 2004), pois diversas são as propriedades terapêuticas desses glicosídeos. Contudo, no processo de retirada das cadeias laterais de açúcar as saponinas são convertidas em sapogeninas, o que, muitas vezes, acarreta perda de função da molécula. Um exemplo recente, a saponina quillaja, perdeu sua atividade adjuvante após passar por um processo de desacetilação (Üstünda & Massa, 2007).

De modo geral, o isolamento de sapogeninas tem importância significativa, já que muitas delas são utilizadas como precursores de esteróides. A extração de sapogeninas é realizada através de hidrólises (ácida, básica ou enzimática), seguida de extração por solvente orgânico. Em nosso trabalho, o processo de purificação empregado foi semelhante ao realizado por Peana *et al.*, (1997) e compreendeu hidrólise ácida (HCl), seguida do refluxo em hexano. Ding *et al.*, (1989), através de uma hidrólise ácida do extrato metanólico de *A. sisalana*, comprovaram a presença da tigogenina. Neste trabalho, através de análise por CLAE, detectou-se as sapogeninas esteroidais hecogenina e tigogenina na fração FHAS, verificando-se similaridade entre o tempo de retenção e o espectro de absorção no UV. Schenkel *et al.*, (2007) sugerem que a análise por CLAE para saponinas seja feita em baixos comprimentos de onda (203-210nm); desse modo o comprimento de onda de 212 nm foi utilizado e a detecção das sapogeninas nas amostras corroborou a sugestão do autor.

Dando continuidade aos experimentos químicos, foi realizado o teste de atividade hemolítica. Saponinas, devido a suas propriedades anfipáticas, provocam desorganização

celular e rompimento de eritrócitos. Santos *et al.*, (1997), em testes com saponinas candidatas a adjuvantes, testaram aquelas presentes em *A. sisalana* (esteroidal) e *Smilax Officinales* (triterpênica), concluindo que aquelas saponinas, cuja aglicona é esteroidal, apresentavam maior capacidade de produzir hemólise do que aquelas com aglicona de natureza triterpênica. Isso se deve ao fato do esteróide apresentar alta afinidade pelo colesterol da membrana dos eritrócitos (Oda *et al.*, 2000).

A hidrólise ácida das saponinas retira sua característica anfipática e impede a solubilidade em água. No caso da *A. sisalana* os resultados obtidos para FHAS demonstraram que, na concentração máxima 100 µg/ml, houve 20% de hemólise, enquanto o ECB em sua concentração mínima (3,12 µg/ml) apresentou 40% de índice de hemólise.

Assim, os resultados do trabalho químico realizado indicaram que o processo de obtenção da FHAS, por hidrólise ácida a partir de ECB, foi bem sucedido já que as sapogeninas estavam presentes na análise realizada por CLAE (tempo de retenção de 4,30844); além disso, a redução significativa do índice de hemólise da FHAS, promovido por hidrólise e conseqüente retirada das cadeias de açúcar (restando apenas a aglicona), possibilitou uma molécula mais segura para condução dos ensaios farmacológicos.

Devido aos resultados apresentados na literatura, em relação ao amplo potencial terapêutico das saponinas, em especial aquelas presentes nas plantas do gênero *Agave*, outro objetivo do nosso trabalho foi traçar o perfil das atividades antiinflamatória e analgésica apresentada pela FHAS.

A inflamação é uma resposta normal dos tecidos vascularizados a danos mecânicos, agentes patogênicos ou substâncias químicas que provoquem danos ao organismo. É uma resposta protetora do organismo cujo objetivo é restaurar a homeostasia. Contudo, quando não há modulação desta resposta, o processo tende a se tornar crônico e pode conduzir a

perda de função. Assim, do mesmo modo que existem mediadores inflamatórios, como PGEs, LT, Substância P, o próprio organismo secreta também mediadores antiinflamatórios, como lipoxina, anexinas e mediadores de apoptose (Gilroy *et al.*, 2004). Entretanto, se os mediadores antiinflamatórios não modularem adequadamente a cascata inflamatória no processo agudo, haverá infiltração de neutrófilos no local seguida de um crescimento de fibroblastos. Estas células secretam colágeno gerando uma área fibrosa denominada fibrose ou cicatriz (Coltren *et al.*, 1999).

Em condições experimentais, diversos modelos reproduzem a inflamação. Os modelos “*in vivo*” são utilizados na triagem de compostos com atividades antiinflamatória e analgésica. De modo geral, tais experimentos reproduzem sinais e sintomas das respostas, tais como edema, alteração da permeabilidade, infiltração de neutrófilos, dentre outros, ou até mesmo alguns comportamentais, como aqueles causados por dor como o reflexo de retirada da cauda (Lapa *et al.*, 2000).

Um destes experimentos é o edema de orelha induzido por xilol, um agente irritante que provoca aumento da permeabilidade vascular e, conseqüentemente, edema devido à liberação de mediadores e infiltração celular (Hosseinzadeh *et al.*, 2003). Em dados preliminares, EHAS (administrado pelas v.o e i.p), produziu redução significativa do edema e o teste com FHAS mostrou forte inibição do edema, assim como o fármaco padrão utilizado (INDO).

Com a atividade antiedematogênica confirmada para a FHAS, modelos mais abrangentes de inflamação foram utilizados. Estes modelos incluíram o edema de pata com carragenina, um modelo de inflamação que libera histamina e bradicinina e, conseqüentemente, ativa a cascata de citocinas (TNF- α e IL-1 β). TNF- α e IL-1 β atraem

neutrófilos que liberam PGEs e MPO dando origem à dor inflamatória. O pico da resposta edematogênica ocorre duas horas após a administração de carragenina, agente flogístico (Torres *et al.*, 2000). Dados preliminares com o EHAS novamente mostraram significativa atividade sobre o edema (inibição de 19,3 % para administração por v.o e 67,3 para administração via i.p). A FHAS também mostrou significativa atividade antiedematogênica no edema avaliado durante o período de 4 horas de inflamação, sendo a dose de 25 mg/ kg da FHAS aquela que apresentou maior inibição (58% ,em média), comparada ao controle negativo PEG.

Outras espécies do gênero *Agave* também demonstraram atividade antiinflamatória. Peana *et al.*, (1997) avaliaram *A. americana* no modelo de edema de pata e constaram que a atividade antiinflamatória da planta deve-se a ação sinérgica de suas sapogeninas (hecogenina e tigogenina). No presente trabalho não houve dosagem de citocinas ou PGE₂, contudo, em outros trabalhos já foram demonstrados que a migração de leucócitos apresentou um papel essencial na permeabilidade capilar e formação de exudato promovendo estímulos inflamatórios (Cunha *et al.*, 2008).

Após FHAS ter sido analisada quanto às suas ações antiedematogênica, a atividade da mesma foi avaliada no modelo crônico do granuloma *cotton pellet*. Esse modelo avalia outro aspecto da resposta inflamatória, a infiltração de neutrófilos, seguida por migração de fibroblastos (resposta de resolução) e, por fim, a formação de tecido fibroso devido à deposição de colágeno (Swingle & Shideman, 1972). Esses mesmos autores dividiram esse modelo em três fases: transudativa, exudativa e proliferativa; estas fases ocorrem entre o terceiro e o sexto dia após a implantação do pellet. Foram selecionadas as doses de 10 e 25 mg/ kg da FHAS e 0,5 mg/ kg de DEXA (droga padrão) para avaliação dos efeitos sobre a infiltração celular. FHAS 10 mg/ kg e 25 mg/kg apresentaram um percentual de inibição de

46% e 58 % respectivamente, enquanto que a DEXA promoveu uma inibição de 90 % quando avaliado o infiltrado neutrofílico. Esses resultados indicam que a FHAS apresenta uma ação antiinflamatória envolvida com a infiltração celular da fase proliferativa. Outras espécies como *Trichodesma indicum*, que também apresentam metabólitos secundários de esqueleto esteroidal, respondem bem no modelo granuloma cotton pellet reduzindo a fase proliferativa (Perianayagam *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos em modelo de pleurisia corroboram aqueles do modelo de granuloma *cotton pellet* (infiltração celular). Trata-se de um modelo tão bem caracterizado que permite a quantificação do exudato e a migração celular (Wu *et al.*, 2006). O efeito da FHAS neste modelo confirmou a atividade antiinflamatória sobre a infiltração celular, já que a dose de 25 mg/ kg reduziu (50 %) não somente a infiltração celular total, como também o número de neutrófilos (62 %). Há poucos trabalhos relacionando modelo de pleurisia e saponinas e/ou sapogeninas; um deles demonstra que as saponinas extraídas das raízes do *Platycodon grandiflorun* reduziram significativamente o número de neutrófilos, o que foi sugerido como potencial antiinflamatório desta classe de substância com relação a infiltração celular (Kim *et al.*, 2005).

Além disso, foram quantificados os níveis de MPO no lavado pleural, um indício da infiltração de neutrófilos. A FHAS na dose de 25 mg/kg apresentou uma redução de 43% dos níveis de MPO, sendo que o controle positivo DEXA apresentou redução significativa de 84% na atividade da enzima.

Cunha *et al.*, (2008) avaliaram a participação de neutrófilos e derivados liberados nos mecanismos de hipernocicepção, que culminam na formação do edema, febre e liberação de mediadores que estimulam nociceptores. A infiltração de neutrófilos está presente em modelos crônicos de inflamação aumentando os danos no sítio inflamatório.

Os modelos apresentados sugerem que a atividade da FHAS está relacionada com a inibição da infiltração neutrofílica.

Dor e inflamação estão intimamente ligadas. A dor é definida como uma experiência sensorial desagradável, associada ao dano tissular real ou potencial (Teixeira, 2001). O modelo de contorções abdominais permite avaliar respostas antinociceptivas de diferentes tipos de fármacos (anticolinérgicos, antihistamínicos), pois desencadeia a ativação de vários eventos que determinam a nocicepção, com a liberação de mediadores como histamina, bradicinina, PGE₂. Este modelo é sensível a substâncias analgésicas, tanto aquelas dotadas de mecanismos de ação central ou periféricas (Koster, 1959).

Em testes preliminares com o EHAS no modelo de contorções abdominais houve boa resposta pelas duas vias de administração empregadas (30,7 % de inibição para a v.o e 88,7 % para via i.p) quando comparado com o controle negativo. Tanto a FHAS quanto a INDO apresentaram atividade significativa nesse modelo. FHAS nas doses de 5, 10 e 25 mg/ kg inibiu as contorções em 22, 54 e 48%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle negativo. Esses dados apontam para uma possível atividade antinociceptiva da FHAS e corroboram com aqueles apresentados por Choi *et al.*, (2005), onde o mesmo modelo foi utilizado para a hederagenina (30 mg/ kg), uma sapogenina triterpênica derivada da *Akebia quinata*.

De posse dos resultados positivos com a FHAS no modelo de contorções abdominais, foi realizado o modelo de placa quente, com o intuito de avaliar a ação central do fármaco sobre a dor de origem neurogênica. Nesse modelo a FHAS, nas doses de 25 e 50 mg/kg, apresentou aumento do tempo de latência.

Os dados acima corroboram com o teste de Tail flick, que não se resume apenas à atividade sobre a dor relacionada ao SNC, mas àquelas com integração medular que

envolve o reflexo da cauda do animal (Carstens & Wilson, 1993). Neste modelo as doses de 10, 25 e 50 mg/ kg da FHAS apresentaram atividade analgésica para estímulo nociceptivo térmico, com tempos máximos de $5,7 \pm 2,2$; $6,6 \pm 1,9$ e $6,3 \pm 1,7$ s, respectivamente. As doses apresentaram EMP máximo de 66,2%. Essa atividade pode estar relacionada à presença da hecogenina e tigogenina, já que existem moléculas esteróides com ação analgésica, como sitosterol, campesterol e stigmasterol. Esses resultados sugerem ação analgésica de moléculas esteróides no sistema nervoso, mas não aquela relacionada aos receptores opióides (Santos *et al.*, 1995). Hederagenina, uma sapogenina, apresentou ação semelhante em testes de nocicepção envolvendo o SNC e SNP, também sem uma correlação entre a atividade analgésica e os receptores opióides (Choi *et al.*, 2005). Embora, tenham sido descritos inúmeros trabalhos relacionando a ação analgésica dos GC e o SNC, o mecanismo nunca foi bem elucidado.

Contet *et al.*, (2006) avaliaram o potencial analgésico no modelo de placa quente em camundongos C57BL6 e camundongos nocaute para receptores opióides que sofreram estresse por natação, com o objetivo de avaliar uma possível interação entre o HPA e os receptores opióides. Os autores constataram que houve um aumento da latência induzido pela secreção de corticosterona através do eixo HPA, todavia não houve diferenças significativas entre os camundongos selvagens e os nocautes, reforçando novamente a ausência de relação entre GC e os receptores opióides.

Além disso, o potencial antinociceptivo dos GC envolve um mecanismo de ação secundário com a liberação de melatonina. A secreção de cortisol pelo córtex após estímulo mediado por ACTH promove a liberação de noradrenalina, que por sua vez atinge a glândula pineal promovendo a liberação de melatonina. Ferreira *et al.*, (2004) mostraram

que a incubação *in vitro* da glândula pineal com corticosterona e noradrenalina aumentou a secreção de melatonina.

Estudos recentes demonstraram que a melatonina apresenta um potencial promissor na dor aguda, essa atividade deve-se a localização dos seus receptores específicos MT₁ e MT₂, expressos no tálamo, hipotálamo e cordão espinhal que possibilita um papel crucial no controle da dor (Ambris – Tututi *et al.*, 2009). Além disso, a melatonina aumenta o tempo de latência nos modelos de Tail flick e placa quente, indicando que esse hormônio reduz a hiperexcitabilidade do cordão espinhal associada à transmissão nociceptiva (Lakin *et al.*, 1981).

Esse mecanismo envolvendo o HPA e a melatonina na analgesia é mediado pela presença de GC. Considerando que FHAS apresenta sapogeninas de natureza esteroideal, há indícios de que ela possa atuar na liberação de melatonina. Contudo, não foi realizada uma avaliação dos níveis de melatonina para comprovar o suposto mecanismo de ação corticóide da FHAS em analgesia no SNC.

Os GC atuam em diversos tecidos, como pele, músculos e tecido adiposo, além de promover a degradação de proteínas e RNA. Porém, no fígado eles promovem o aumento da síntese protéica e a produção de glicogênio (Baxter & Forsham, 1972), promovendo uma gliconeogênese e caracterizando um efeito colateral sistêmico. Objetivando avaliar esse efeito colateral foram realizados ensaios para determinar alterações nos níveis de proteínas e albumina plasmática, visto que as sapogeninas apresentam uma natureza esteroideal. Após sete dias, período da administração de FHAS e DEXA, não foram verificadas alterações estatisticamente significativas nos níveis protéicos totais e de albumina plasmática. Os GC são conhecidos por apresentarem especificidade por albumina sendo por ela transportados no sangue (Horisberger, 1992).

Na dosagem de insulina plasmática, após tratamento dos animais por uma semana, apenas a DEXA na dose de 0,5 mg/kg apresentou aumento dos níveis de insulina plasmática de 454 %.

A ação metabólica de GC sintéticos causa danos ao organismo de maneira sistêmica, aumentando a proteólise e, conseqüentemente, a destruição da musculatura esquelética e perda de peso (Schimmer & Parker, 2001). Na avaliação do peso dos animais nenhuma das doses da FHAS apresentou efeito significativo sobre a evolução ponderal de peso dos animais (Souza Brito, 1994), o que provavelmente significa ausência de efeitos colaterais relacionados a ação GC-like.

O quadro de hiperinsulinemia também é indicado como efeito mediado por GC sintéticos. Esse evento metabólico acontece porque a DEXA promove uma resistência a absorção de glicose e acaba por induzir uma hiperglicemia; com isso, as células β do pâncreas secretam mais insulina, levando a um quadro de hiperinsulinemia (Rafacho *et al.*, 2008).

A glândula adrenal é uma estrutura responsável pela secreção catecolaminas, além dos hormônios esteroidais que participam da atividade metabólica do organismo e são responsáveis pela coordenação dos diversos sistemas, contribuindo para o quadro de homeostasia (Ehrhart-Bornstein & Bornstein, 2008). Contudo, a administração de GC sintéticos acaba por causar danos a adrenal, como insuficiência adrenal aguda.

Os animais do grupo DEXA apresentaram redução significativa do peso absoluto e do peso relativo de suas glândulas adrenais, devido à conseqüente atrofia causada pelo excesso de GC no corpo do animal. Esse tipo de alteração é justificado por uma insuficiência secundária da supra-renal, decorrente de uma disfunção do eixo HPA que

induz um mecanismo de feedback negativo do ACTH e uma conseqüente atrofia da glândula adrenal (Schimmer & Parker, 2001).

Na análise qualitativa da histologia da glândula adrenal, apenas o grupo de animais tratado com DEXA apresentou redução das zonas fasciculada e reticular dentro do córtex, o que justifica a atrofia e perda de peso da glândula, além da redução do número dos depósitos de colesterol presentes nas células. A análise qualitativa da histologia da glândula adrenal dos grupos de animais tratados com o PEG e a FHAS não apresentou estas alterações. Já o grupo DEXA por ter uma alta concentração de GC cria um processo de retroalimentação negativo reduzindo a esteróidogênese no córtex da adrenal (Banjanin *et al.*, 2004).

Todas as evidências obtidas indicam que a FHAS apresentou um potencial antiinflamatório e analgésico, sem apresentar efeitos colaterais de natureza GC, o que sugere novas pesquisas envolvendo seu mecanismo de ação com relação as vias de inflamação e dor.

VII. Conclusões

- A FHAS é composta majoritariamente de sapogeninas, principalmente Hecogenina e Tigogenina.
- A FHAS mostrou menor índice de hemólise em comparação ao SB e o EHAS.
- Tanto EHAS quanto FHAS apresentaram ações significativas em modelos de inflamação agudos, onde não foram evidenciados efeitos colaterais importantes; o que indica promissora atividade antiinflamatória para FHAS.
- FHAS atuou sobre a fase proliferativa do processo inflamatório, evidenciando um potencial efeito sobre a infiltração celular.
- A ação analgésica, provavelmente independente de receptores opióides da dor, mostrou-se relacionada a efeitos farmacológicos periféricos de FHAS, ou seja, FHAS atuaria inibindo a dor de origem inflamatória, ou estimulando mecanismos de ação secundários.
- Embora FHAS apresente sapogeninas esteroidais, não foram obtidas evidências de efeitos colaterais sistêmicos como aqueles causados pelos GC sintéticos.
- O conjunto de dados sugere que FHAS apresenta atividade antiinflamatória; contudo, novos testes são necessários para identificação dos mecanismos de ação envolvidos.

VIII. Referências Bibliográficas

Adachi, J.D., Bensen, W.G., Hodsman, A.B. Corticosteroid- induced osteoporosis. *Semin Arthritis Rheum.* V. 22, p. 375-384, 1993.

Akiko, T., Araki. H., Komoike, Y., Hase, S., Takeuchi, K. Inhibition of both COX-1 and COX-2 is required for development of gastric damage in response to nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J. of Physiology Paris.* V. 95, p. 21-27, 2001.

Amann R, Peskar, B.A. Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate. *Eur J Pharmacol.* V. 447, p 1-9, 2002.

Ambriz-Tututi, M., Rocha-González H.I., Cruz S.L., Granados-Soto, V. Melatonin: A hormone that modulates pain. *Life Sci,* 2009. (article in press).

Balsinde, J., Balboa, M.A., Dennis, E.A. Functional coupling between secretory phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 and its regulation by cytosolic group IV phospholipase A2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* V.95, p. 7951-7956, 1998.

Banjanin, S., Kapoor, A., Matthews, S.G. Prenatal glucocorticoid exposure alters hypothalamic-pituitary-adrenal function and blood pressure in mature male guinea pigs. *J Physiol,* V.558, p. 305-318, 2004.

Barnes, P.J., Karin, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med.* V. 336, p. 1066-1071, 1997.

Barnes, P.J. Future therapies for chronic obstructive pulmonary disease. *British Journal of pharmaco.* V. 148, p. 245-254. 2006.

Barros, M.A.L, Carvalho, O.S, Ferreira da Silva, O.R.R. Importância econômica e situação da cultura do sisal. **O agronegócio do sisal no Brasil,** 1999 Embrapa.

Baxter JD, Forsham PH. Tissue effects of glucocorticoids. *Am J Med.* V.53, p.573-589.1972

Bighetti E.J., Hiruma-Lima, C.A., Gracioso J.S., Brito, A.R. Anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents of the essential oil of *Croton cajucara* Benth. *J Pharm Pharmacol.* V.51, p. 1447-1453, 1999.

Bjorkman, D. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated toxicity of the liver, lower gastrointestinal tract, and esophagus. *Am J Med.* V. 105, p. 17-21, 1998.

Boyanovsky, B.B., Webb, N.R. Biology of secretory phospholipase A2. *Cardiovasc Drugs Ther.* V.23, p. 61-72, 2009.

Brandão, M.I. Dores Crônicas. **In Neurobiologia das Doenças Mentais,** Graef, F.G., 2º ed, Lemos, p. 145-159, 1993.

Bray, M.A., Cunningham, F.M., Ford-Hutchinson, A.W., and Smith, M.J.H. Leukotriene B4: a mediator of vascular permeability. *Br. J. Pharmacol.* V. 72, p. 483-486, 1981.

Calixto, J.B. Efficacy, safety quality control, marketing and regulatory guide lines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Bras J. Med Biol Res.* V. 33, p. 179-189. 2000.

Calixto, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Ciência e Cultura.* V. 55, p. 37-38, 2003.

Carstens, E., Wilson, C. rat tail flick reflex: magnitude measurement of stimulus response function, supression by morphine and habtuation. *Journal Neuropharmacol.* V. 70, p. 630-639, 1993.

Choi, J., Jung, H.J., Lee, K.T., Park, H.J. Antinoceptive and anti-inflammatory effects of teh saponin and sapogenins obtained from the stem of *Akebia quinata*. *Journall of Medicinal Food.* V. 8, p. 78-85, 2005.

Clarkson, M.R, McGinty, A., Godson, C., Brady, H.R. Leukotrienes and lipoxins: lipoxygenase-derived modulators of leukocyte recruitment and vascular tone in glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* V. 13, p. 3043-3051, 1998.

Coltren, H.R. Tissue-specific regulation of inflammation. *J. Appl Physiology.* V. 72, p. 1-7, 1999.

Contet, C., Gavériaux-Ruff, C., Matifas, A., Caradec, C., Champy, M.F., Kieffer, B.L. Dissociation of analgesic and hormonal responses to forced swim stress using opioid receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology.* V.31, p. 1733-1744, 2006.

Corrêa, M.P., *Dicionário das Plantas Uteis do Brasil e das Exóticas cultivadas.* Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. V. 5, p. 556, 1984.

Cowley, B.D. Jr, Muessel, M.J., Douglass, D., Wilkins, W. In vivo and in vitro osmotic regulation of HSP-70 and prostaglandin synthase gene expression in kidney cells. *J Am Soc Nephrol.* V.6, p. 1679-1681, 1995.

Crofford, L.J., Wilder, R.L., Ristimäki, A.P., Sano, H., Remmers E.F., Epps, H.R., H.L.A. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *J Clin Invest.* V.93, p. 1095-101, 1994.

Cunha, T.M., Verri, W.A. Jr., Schivo, I.R, Napimoga, M.H., Parada, C.A., Poole S, Teixeira M.M., Ferreira S.H., Cunha, F.Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *J Leukoc Biol.* V.83, p.824-832. 2008.

Cuzzocrea, S., Bruscoli, S., Crisafulli, C., Mazzon, E., Agostini, M., Muia, C., Esposito, E., Di Virgilio, R., Meli, R., Vegeto, E., Maggi, A., Riccardi, C. Estrogen receptor antagonist fulvestrant (ICI 182,780) inhibits the anti-inflammatory effect of glucocorticoids. *Mol Pharmacol.* V. 71, p. 132-44, 2007.

Da Silva, B.P., De Sousa, A.C., Silva, G.M., Mendes, T.P, Parente, J.P. A new bioactive steroidal saponin from *Agave attenuata*. *Z Naturforsch.* V.57, p. 423-428, 2002.

Dale, M.M. & Foreman, J.C. **Introduction of Immunology and pathology of host defense mechanisms.** In: *Textbook of Immunopharmacology*, Dale, M.M. and Foreman, J.C. (Eds.). Blacwell Scientific Publications, 1-16, 1989.

Damiani, D., Setian, N., Dichtchekian, V. M. Corticosteróides- Conceitos básicos e aplicações clínicas. *Pediatr (São Paulo)*. V.6, p.160-166, 1984.

Di- Stasi, L.C. **Plantas Medicinais verdades e mentiras**. Plantas medicinais e seus distintos contextos de uso. Ed UNESP p. 48, 2007.

Dias, B.F.S. **A Implementação da convensão sobre diversidade biológica no Brasil: Desafios e oportunidades**. Campinas: André Tosello p. 10, 1996.

Ding, Y., Chen, Y. Y., Wang, D.Z., Yang Y.A.N.G. Steroidal saponins from cultivated form of *Agave sisalana*. *Phytochemistry*. V. 28, p. 2787-2791, 1989.

Dostert A, Heinzl T. Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *V.10*, p. 2807-2816, 2004.

Eddy, N.B., Leimbark, D. Synthetic analgesics II. Dithienylbutenil and dithienilbutylamines. *K. Pharmacology. Exp. Ther*, V. 107. p. 385-393, 1953.

Edelman, A.M., Blumenthal, D.K. & Krebs, E.G. Protein serine threonine kinases. *Ann. Rev. Biochem.* V 56 p. 567-613, 1987.

Ehrhart-Bornstein, M., Bornstein, S.R. Cross-talk between adrenal medulla and adrenal cortex in stress. *Ann N Y Acad Sci*. V.1148, p. 112-117, 2008.

Exton, J.H. Mechanisms involved in effects of catecholamines on liver carbohydrate metabolism. *Biochem Pharmacol*. V.28, p.2237-2240, 1979.

Façal, S., Uehara, M.H. Efeitos Sistêmicos e síndrome de retirada em tomadores crônicos de corticosteróides. *Rev Ass Méd Brasil*. V.44, p. 69-74, 1998.

Farnsworth, N.R., Morris, R.W. Higher plants--the sleeping giant of drug development. *Am J Pharm Sci Support Public Health*. V. 148, p.46-52, 1976.

Fenwick, G. R., Price, K. R., Tsukamoto, C., and Okubo, K. Saponins. In: J.P.F. D'Mello, C.M. Duffus, and J.H. Duffus, Eds. **Toxic Substances in Crop Plants**. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 285-327, 1991.

Ferreira da Silva, O.R.R. Macedo Beltrão, N.E. **O Agronegócio de sisal no Brasil**, Embrapa, 1999.

Ferreira, Z.S., Fernandes, P.A., Duma, D., Assreuy, J., Avellar, M.C., Markus, R.P. Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. *J Pineal Res*. V. 38, p. 182-188, 2005.

Flower, R.J. Prostaglandins, bioassay and inflammation. *British Journal of Pharmacology*. V.147, p. 182-192, 2006.

Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H.P., Becker, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br J Nutr*. V.88, p. 587-605, Review 2002.

Fröde-Saleh, T.S, Calixto, J.B. Synergistic antiinflammatory effect of NF-kappaB inhibitors and steroidal or non steroidal antiinflammatory drugs in the pleural inflammation induced by carrageenan in mice. *Inflamm Res.* V. 49, p.330-337, 2000.

Gali, J.C., Caetano, E.B., Santoro, A.G. As Infiltrações são mesmo prejudiciais?. *Rev. Bras Ortop.* V. 35, p. 173-178, 2000.

Garcia, E.S., Silva, A.C.P., Gilbert, B., Corrêa, C.B.V., Cavalheiro, M.V.S., Santos, R.R., Tomasini, T. **Fitoterápicos**, Campinas André Tosello, p. 17 1996.

Garcia, M.D., Quilez, A.M., Saenz, M.T., Martinez – Dominguez, M.E. Anti- inflammatory activity of *Agave intermixta Trel* and *Cissus sicyoides L.*, Species used in the Caribbean traditional medicine. *J. of ethnopharmacology.* V. 71, p. 395 – 400, 1999.

Garcia-Leme, J.M.D. **Hormones and Inflammation.** Ed. J. Garcia-Leme (CRC Press Inc.; Flórida) 1989.

García Rodríguez, L A. Variability in risk of gastrointestinal complications with different nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med.* V. 24, p. 30-42, 1998.

Gillin, J.C., Jacobs L.S., Fram, D.H., Snyder, F. Acute effect of a glucocorticoid on normal human sleep. *Nature.* V. 237, p. 398-399, 1972.

Gilroy, D.W., Newson, J., Sawmynaden, P., Willoughby, D.A., Croxtall, J.D. A novel role for phospholipase A2 isoforms in the checkpoint control of acute inflammation. *FASEB J.* V. 18, p. 489-498, 2004.

Gracioso, J.S. Atividade antiulcerogênica e analgésica do extrato Hidroalcolico e frações da *Neurolaena lobata*. **Tese de Doutorado pela Unicamp, 1999.**

Grönroos, J.O., Salonen, J.H., Viander, M., Nevalainen, T.J., Laine, V.J. Roles of group IIA phospholipase A2 and complement in killing of bacteria by acute phase serum. *Scand J Immunol.* V. 62, p. 413-419, 2005

Güçlü-Ustündağ, O., Mazza, G. Saponins: properties, applications and processing. *Crit Rev Food Sci Nutr.* V.47, p.231-58, 2007.

Henderson, W.R. Jr. The role of leukotrienes in inflammation. *Ann Intern Med.* V. 121, p. 684-697, 1994.

Henriques, M.G.M.O., Silva, P.M.R., Martins, M.A., Flores, C.A., Cunha, F.Q., Assreuy- Filho, J., Cordeiro, R.S.B. PAF – induced oedema in mice. *Brazilian J. of Med, bIol. Res.* V. 20, p. 243-249, 1987.

Hiruma-Lima, C.A., Gracioso, J.S., Bighetti, E.J., Germónsén Robineou, L., Brito, A.R.M.S. The juice of fresh leaves of *Boerhaavia diffusa L.* (Nyctaginaceae) markedly reduces pain in mice. *J Ethnopharmacol.* V.71, p.267-274,2000.

Horisberger, J.D., and Rossier, B.C. Aldosterone regulation of transcription leading to control of ion transport. *Hypertensio.* V. 19, p. 221-227 1992.

Hosseinzadeh H, Haddadkhodaparast M.H., Arash, A.R. Antinociceptive, antiinflammatory and acute toxicity effects of *Salvia leriifolia* Benth seed extract in mice and rats. *Phytother Res.* V.17, p.422-425, 2003.

Hostettmann, K., Marstom, A.. *Saponins* Cambridge University press, 1995, Cambridge New York.

Hurley, J.V. **The sequence of early events.** In: Vane, J.R. and Ferreira, S.H. (Eds.). *Handbook of Experimental Pharmacology*, Sprienger-Verlag, 50, 26, 1978.

Ihme, N., Kiesewetter, H., Hoffman, K.H., Birk, A., Muller, A. Leg edema protection from buckwheat herb tea patients with chronic venous insufficiency. *Eur J. Clin. Pharmacology.* V.50, p. 443-447, 1996.

Jessel, T.M & Kelly D.D. **Pain and Analgesy in: Principles of Neural Science** 3 ed. Kandell E.R Schwarts, J. H Jessel, T.M Elsevier 1991, p. 385-399.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução a taxonomia vegetal** . 7º ed., editora nacional São Paulo 1985.

Julius D, Basbaum, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v. 413, p. 203-210, 2001.

Kerwin, S. M. Soy saponins and the anticancer effects of soybeans and soy-based foods. *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents.*V.4, p.263–272, 2004.

Khanna, D., Sethi, G., Ahn, K.S., Pandey, M.K., Kunnumakkara, A.B., Sung, B., Aggarwal, A., Aggarwal, B.B. Natural products as a gold mine for arthritis treatment. *Curr Opin Pharmacol.* V.7, p. 344-351, 2007.

Kim, J.Y., Kim, D.H., Kim, H.G., Song, G.Y., Chung, Y.C., Roh, S.H., Jeong, H.G. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha-induced expression of adhesion molecules in human endothelial cells by the saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum*. *Toxicol Appl Pharmacol.* V.210, p.150-156, 2005.

Koster, R., Anderson, M. & De Beer, E.J. Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.* V. 18, p. 412 - 421, 1959.

Kummer, C.L., Coelho, T.C. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da Ciclooxygenase-2 (COX-2): Aspectos atuais. *Revista Brás Anestesiol.* V. 52, p. 498-512, 2002.

Lacaille-Dubois, M.A., Wagner, H. A. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine.* V. 2, p. 363-386, 1996.

Lapa, A.J., Souccar, C., Lima-Landman, M.T.R., Castro, M.S.A., De Lima, T.C.M. **Plantas Mediciniais: Métodos de avaliação da atividade farmacológica.** SBPC Campinas 2008.

Lawrence, T., Willoughby, D.A., Gilroy, D.W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature Reviews.* V. 2, p. 787 – 795, 2006.

Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol.* V. 2, p. 612-619, 2001.

Lid, W., Hyun, J.E., Jeong, C.S., Kim, Y.S., Lee, E.B. Antiinflammatory activity of alpha-hederin methyl ester from the alkaline hydrolysate of the butanol fraction of *Kalopanax pictus* bark extract. *Biol Pharm Bull.* V. 26, p. 429-433, 2003.

Little, R.J, Bodor, N., Loftsson, T. Soft drugs based on hydrocortisone: the inactive metabolite approach and its application to steroidal antiinflammatory agents. *Pharm Res.* V. 16, p. 961-967, 1999.

Longui, C.A., Santos, M.C., Formiga, C.B., Oliveira, D.V.A., Rocha, M.N., Faria, C.D.C., Kochi, C., Monte, O. Antiproliferative and Apoptotic potencies of glucocorticoids: Nonconcordance with their antiinflammatory and immunosuppressive properties. *Arq Bras Endocrinol Metab.* V. 49, p. 378-383. 2005.

Malle, E., Furtmüller, P.G., Sattler, W., Obinger, C. Myeloperoxidase: a target for new drug development?. *Br J. Pharmacol.* V. 152, p.838-854, 2007.

Mikami, T., Miyasaka, K. Effects of several anti-inflammatory drugs on the various parameters involved in the inflammatory response in rat carrageenin-induced pleurisy. *Eur J Pharmacol.* V.95, p. 1-12, 1983.

Millan, M.J. The induction of pain: ab interactive review. *Prog Neurobiol.* V.57, p. 160-164, 1999.

Mortaz, E., Redegeld, F.A., Nijkamp, F.P., Engiels, F. Dual effects of acetylsalicylic acid on mast cell degranulation, expression of cyclooxygenase-2 and release of pro-inflammatory cytokines. *Biochem Pharmacol.* V.69, p. 1049–1057, 2005.

Motola, D., Vaccheri, A., Silvani, M.C., Poluzzi, E., Bottoni, A., De Ponti, F., Montanaro, N. Pattern of NSAID use in the Italian general population: a questionnaire-based survey. *Eur J Clin Pharmacol.* V. 60, p. 731-738, 2004.

Ness, T.J, Gebhart, G.F. Centrifugal modulation of the rat tail flick reflex evoked by graded noxious heating of the tail. *Brain Res.* V. 386, p. 41-52, 1986.

Newman, D.J., Cragg, G.M., Natural products as sources of New Drugs over the 25 years. *J.Nat prod.* V.70, p. 461-477, 2007.

Nunes Moreira, J.A., Macedo Beltrão, N.E., Ferreira da Silva, O.R.R. Botânica e morfologia do Sisal. **O Agronegócio do Sisal no Brasil**, cap. 2

Oashi, M.C. Estudo da cadeia produtiva como subsídio para pesquisa e desenvolvimento do agronegócio do sisal na paraíba. **Tese de Doutorado pela UFSC, 1999.**

Oda, K., Matsuda, H., Murakami, T., Katayama, S., Ohgitani, T., and Yoshikawa, M. Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. *Biol. Chem.* V.381, p.67–74, 2000.

Oakenfull, D., and Sidhu, G.S. Could saponins be a useful treatment for hypercholesterolaemia? *Eur. J. Clin. Nutr.* V. 44 p.79–88, 1990.

Peana, A.T., Moretti, M.D., Manconi, V., Desole, G., Pippia, P. Anti-inflammatory activity of aqueous extracts and steroidal saponins of *Agave americana*. *Planta Medica*, V.63 p. 199 –202, 1997.

Penido, C., Conte, F.P., Chagas, M.S., Rodrigues, C.A., Pereira, J.F, Henriques, M.G. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. *Inflamm Res*.V.55, p.457-64, 2006.

Perazzo, F.F., Lima, L.M., Padilha, M.M., Rocha, L.M., Souza, P.J.C., Carvalho, J.C.T. Antiinflammatory and analgesic activities of *Hypericum Brasiliensis* (Willd) standardized extract. *Brazilian J. Pharmacognosy*. V. 18, p. 320-325, 2008.

Perianayagam, J.B, Sharma, S.K, Pillai, K.K. Anti-inflammatory activity of *Trichodesma indicum* root extract in experimental animals. *J Ethnopharmacol*.V.104, p. 410-414, 2006.

Pharmaloialty:<http://files.pharmaloyalty.webnode.com/200000027-31de232d7c/hecogenina.pdf> acesso em 02/12/2008.

Pleuvry, B.J., Lauretti, G.R. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. *Pharmacol Ther*. V.71, p. 313-24, 1996.

Pokharel, Y. R., Yang, J. W., Kim, J. Y. , Oh, H. W, H.G., Jeong, E.R. Woo, E.R., Kang, K. W. Potent inhibition of the inductions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by taiwaniaflavone. *Nitric Oxide Bio and Chem*. V. 15, p. 217-225, 2006.

Polito, A., Aboab, J., Annane, D. Adrenal Insufficiency in Sepsis. *Rev Bras Ter Int*. V. 18, p. 86-94, 2006.

Porteous, T., Bond, C., Hannaford, P., Sinclair, H. How and why are non-prescription analgesics used in Scotland?. *Fam Pract*. V. 22, p. 78-85, 2005.

Rabb, H.A. Cell adhesion molecules and the kidney. *Am J Kidney Dis*. v. 23, p 155-66, 1994.

Rafacho, A., Giozzet, V.A., Boschero, A.C., Bosqueiro, J.R. Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. *Pancreas*. V. 36, p. 284-93, 2008.

Reisine, T., Pasternark, G. **Opioid antagonists analgesics. Godman & Gilman. The pharmacological basis of Therapeutics.** p. 521- 555, 2001.

Rhind, S.G., Gannon, G.A., Shephard, R.J., Shek, P.N. Indomethacin modulates circulating cytokine responses to strenuous exercise in humans *Cytokine*. V.19, p.153-158, 2002.

Ripamonti, C., Bandieri, E. Pain therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009 (**article in press**).

Santos, A.R., Niero, R., Filho, V.C., Yunes, R.A., Pizzolatti, M.G., Delle Monache, F., Calixto, J.B. Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in mice. *Planta Med*.V. 61, p. 329-332, 1995.

Santos, W.R., Bernardo, R.R., Peçanha, L.M.T., Palatnik, M., Parente, J.P., Sousa, C.B.P. Haemolytic activities of plant saponins and adjuvants. Effect of *Periandra mediterranea* saponin

on the humoral response to the FML antigen of *Leishmania donovanni*. *Vaccine*. V. 15, p. 1024-1029, 1997.

Sarnthein-Graf, C., and La Mesa, C. Association of saponins in water and water-gelatine mixtures. *Thermochim Acta*. V.418 p. 79-84, 2004.

Schenkel, E.P, Gosmann, G, Athaide, M.L. Saponinas. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. V. 1, p. 711- 740, 6 ed 2007.

Schiantarelli, P., Cadel, S., Acerbi, D. & Pavesa. Antiinflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. *Arzneim. Forsch/ Drug Research*. V. 32, p. 230-235, 1982.

Scott, A.M., Atwater, I., Rojas, E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia*. V.21, p. 470-475. 1981.

Schimmer, B.P, Parker, K.L., Genetics of the development and function of the adrenal cortex. *Rev Endocr Metab Disord*. V.3, p. 245-252, 2001.

Serhan, C.N, Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol*. V.6, p. 1191-1197, 2005.

Silverstein, F.E., Graham, D.Y., Senior, J.R., Davies, H.W., Struthers, B.J., Bittman, R.M., Geis, G.S. Misoprostol reduces serious gastrointestinal complications in patients with rheumatoid arthritis receiving nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med*. V. 123, p. 241-249, 1995.

Souza – Brito, A.R.M. & Souza – Brito, A. A Forty years of Brazilian medicinal plant Research. *J. of Ethnopharmacology*. V.39, p. 53-67, 1993.

Souza Brito, A.R.M. **Manual de Ensaios Toxicológicos In Vivo**. Ed. da UNICAMP 1995

Sparg, S.G., Light, M.E., van Staden, J. Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol*. V.94, p. 219-243, 2004.

Sun, H.X. Hemolytic activities and adjuvants effect of *Bupleurum chinese* saponins on the immune responses to ovalbumin in mice. *Vaccine*. V 24, p.1324 - 1331. 2006.

Swingle, K.F. & Shideman, F.E. Phases of the inflammatory response to subcutaneous implantation of cotton pellet and their modification by certain antiinflammatory drugs. *J. Pharmacology. Exp. Ther*. V.183, p. 226-234, 1972.

Teixeira, M.J, O. **Anatomia e Fisiologia das vias nociceptivas da dor**. Dor epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento. Ed Moreira Jr. 1 ed. 2001

Tjolsen, A., e Hole, K. Animal Models of analgesia. In Dickenson, A. Besson, J. **The pharmacology of pain**, v. 130/ I., Springer: Verlag, Berlin. P. 1-20, 1997

Toma, W., Gracioso, J.S., Hiruma-Lima, C.A., Andrade, F.D., Vilegas, W., Souza Brito A.R. Evaluation of the analgesic and antiedematogenic activities of *Quassia amara* bark extract. *J Ethnopharmacol*. V. 85, p. 19-23, 2003.

Torres, S.R., Fröde, T.S., Nardi, G.M., Vita, N., Reeb, R., Ferrara, P., Ribeiro-do-Valle, R.M., Farges, R.C. Anti-inflammatory effects of peripheral benzodiazepine receptor ligands in two mouse models of inflammation. *Eur J Pharmacol.* V. 408 p.199-211, 2000.

Trease, G.E., Evans, W.C. **Pharmacognosy**, 14^o Edition, Ed. Saunders, 1996.

Vonkerman, H.E, Van de Laar, M.A.F.J. NSAIDs: Adverse effects and their prevention. *Semin Arthritis Rheum* (**article in press**), 2008.

Vonkerman, H.E, Fernandes, R.W., Van de Laar, M.A.F.J. Under utilization of gastroprotective drugs in patients with NSAIDs – related ulcers. *Int. Journal Clinic pharmacol Ther.* V.45, p. 281-288, 2007.

Vonkerman, H.E, Brouwers, J.R.B.J, Van de Laar, M.A.F.J. Understanding the NSAID related risk of vascular events. *Boletim Medical Journal.* V.332, p. 895-898, 2006.

Wallace, J.L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself?. *Physiol Rev.* V. 88, p.1547-1565. 2008.

Wang, Z.W., Gu, M.Y., and Li, G.Z. Surface properties of gleditsia saponin and synergisms of its binary system. *J. Disper. Sci. Technol.*, V.26, p.341– 347, 2005.

Wei F., Ma, L.Y., Jin, W.T., Ma, S.C., Han, G.Z., Khan, I.A., Lin, R.C. Antiinflammatory triterpenoid saponins from the seeds of *Aesculus chinensis*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).*V.52, p. 1246-1248, 2004.

Whelton, A. Renal aspects of treatment with conventional nonsteroidal anti-inflammatory drugs versus cyclooxygenase-2-specific inhibitors. *Am J Med.* V.110, p. 33S-42S, 2001.

Williams, T. J. Prostaglandin E2, prostaglandin I2 and the vascular changes in inflammation. *Br. J. Pharmacol.* V.65, p. 517-524, 1979.

Williams, T.J. **Mechanisms of inflammatory oedema formation.** In: Dale, M.M. and Foreman, J.C. (Eds.). *Textbook of an Immunopharmacology*, Blackwell Scientific Publications, p. 210-216, 1984.

Winter, C.A, Risley, E.A, Nuss, G.W. Carrageenan- induced oedema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc soc exp biol med.* V. 111, p. 544-547. 1962.

Wissink, S., van Heerde, E.C., vand der Burg, B., van der Saag, P.T. A dual mechanism mediates repression of NF-kappaB activity by glucocorticoids. *Mol Endocrinol.* V. 12, p. 355-363, 1998.

Wu, B., Li, P., Liu, Y., Lou, Z., Ding, Y., Shu, C., Ye, S., Bartlam, M., Shen, B., Rao, Z. 3D structure of human FK506-binding protein 52: implications for the assembly of the glucocorticoid receptor/Hsp90/immunophilin heterocomplex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* V. 101, p. 8348-8353, 2004.

Wu, Y., Zhou, C., Li, X., Song, L., Wu, X., Lin, W., Chen, H., Bai, H., Zhao, J., Zhang, R., Sun, H., Zhao, Y. Evaluation of antiinflammatory activity of the total flavonoids of *Laggera pterodonta* on acute and chronic inflammation models. *Phytother Res.*V.20, p. 585-590, 2006.

Yedgar, S., Cohen, Y., Shoseyov, D. Control of phospholipase A2 activities for the treatment of inflammatory conditions. *Biochem Biophys Acta*. V.1761, p. 1373-1382, 2006.

Young, J.M, De Young L.M. Cutaneous models of inflammation for the evaluation of topical and systemic pharmacological agents. **Pharmacological methods in the control of inflammation**, Spector J, Back N (eds). Liss: New York p. 215-231, 1989.

Yuan, Y, Padol, I.T., Hunt, R.H. Peptic ulcer disease today. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*.V. 3, p. 80-89, 2006.

Anexos

Protocolo da Comissão de Ética na Experimentação Animal

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1281-1, sobre "Atividade antiinflamatória da fração butanólica de saponinas esteroidais da espécie *Agave sisalana*", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito / Ricardo José Dunder, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 28 de maio de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1281-1, entitled "Antiinflammatory activity of Butanolic fraction in steroidal saponins of *Agave sisalana* species", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on May 28, 2007.

Campinas, 28 de maio de 2007.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraklo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva