



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Mariana Vieira Vigliano

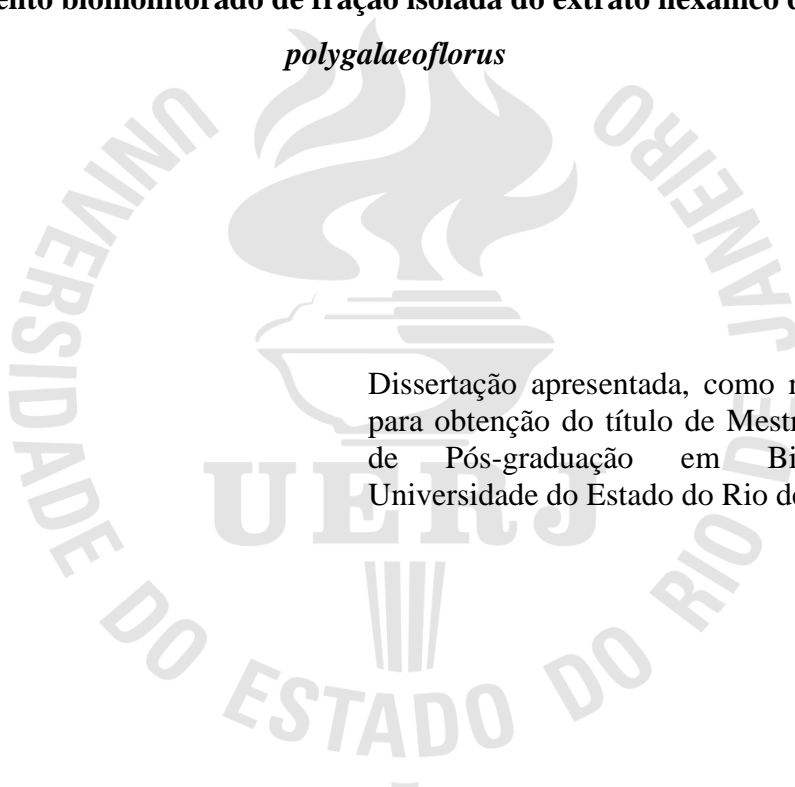
Fracionamento biomonitorado de fração isolada do extrato hexânico de
Pterodon polygalaeiflorus

Rio de Janeiro

2012

Mariana Vieira Vigliano

Fracionamento biomonitorado de fração isolada do extrato hexânico de *Pterodon polygalaeoflorus*



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

V677 Vigliano, Mariana Vieira.
Fracionamento biomonitorado de fração isolada do extrato hexânico de *Pterodon polygalaeiflorus* / Mariana Vieira Vigliano. – 2012.
104 f.

Orientadora: Marsen Garcia Pinto Coelho.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. *Pterodon polygalaeiflorus* – Teses. 2. Matéria médica vegetal – Teses. 3. Plantas medicinais – Teses. 4. Células – Motilidade - Teses. I. Coelho, Marsen Garcia Pinto. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 633.88

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Mariana Vieira Vigliano

Fracionamento biomonitorado de fração isolada do extrato hexânico de *Pterodon polygalaeoflorus*

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 14 de fevereiro de 2012.

Orientadora:

Prof.^a Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Olga Maria Martins Silva de Almeida
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Morgana Teixeira Lima Castelo Branco
Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Prof.^a Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento
Universidade Federal do Maranhão

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

À minha mãe, pela incansável missão de me ensinar a ser alguém melhor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar saúde e força para continuar esse trabalho...

À minha mãe, para a qual dedico tudo que faço. Por ser meu norte e meu porto seguro, por não medir esforços para garantir meu bem-estar e minha paz de espírito sempre....

Ao meu pai, que embora não mais nessa esfera, está sempre do meu lado, fortalecendo-me....

Ao meu irmão, pelos conselhos e pelo interesse no andamento desse trabalho....

Aos amigos de infância, Ana Lídia, Camilla e Joaquim, por fazerem parte da minha evolução e desenvolvimento, desde a primeira formação escolar...

Aos amigos, Alessandra, Aline, Guaraci, Renata e Suzane, por fazer dos momentos tensos, algo bem mais agradável...tudo seria diferente sem vocês..

À Marsen.... nossa orientadora querida, por ter o poder da palavra, por nos acalmar, nos acalentar com o olhar materno que só ela tem...

À professora Kátia, pelo incentivo ao estudo, pelo conhecimento passado durante as reuniões e durante todo o tempo, agindo sempre de forma tão solícita a qualquer pedido...

À professora Denise, pelo incentivo, e pela minha formação...

Aos queridos professores Graça e Velozo, pela entrada fundamental no nosso laboratório, por tantos ensinamentos, por completar o time que necessitava tanto de suas presenças...

Aos professores da Universidade Castelo Branco, pela minha formação acadêmica...

Aos amigos Girlaine, Gleison, Nathália, Laila, Fabiana, Thiago, Fernanda, Jéssica e Daniele, pela ajuda em experimentos, pelas palavras de incentivo e pelos momentos divertidos durante todo esse processo...

Aos queridos funcionários do LIA-BPPN, Beto, Paulinho e Shirley, por estarem sempre prontos a me ajudar, pelos puxões de orelha, pelos ensinamentos, por fazerem parte desse trabalho....

À professora Márcia e seu grupo, Cíntia, Maurício, Natália, Francis e Gustavo, pelo apoio e acessibilidade.....

A todos que trabalham no Departamento de Bioquímica que, de uma forma ou de outra contribuíram para esse trabalho....

Enfim, a todas as pessoas que conviveram comigo, durante esse período tão conturbado e intenso, mas que com certeza gerará muitos frutos e, do qual lembrarei por toda minha vida...

A árvore nascente guarda-te a bondade e a tolerância para que te possa ofertar os próprios frutos em tempo certo.

Chico xavier

RESUMO

VIGLIANO, Mariana Vieira. **Fracionamento biomonitorado de fração isolada do extrato hexânico de *Pterodon polygalaeflorus***. 2012. 104 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

O gênero *Pterodon* compreende algumas espécies largamente distribuídas sobre a região central do Brasil. Seus frutos são comercialmente disponíveis no mercado da flora medicinal sendo amplamente utilizados pelas suas propriedades farmacológicas como antirreumático, anti-inflamatório e analgésicas. O objetivo deste trabalho foi biomonitorar o fracionamento do extrato hexânico de *Pterodon polygalaeflorus* Benth. (ExPpg), utilizando modelos de inflamação aguda (edema de pata e bolha de ar). O fracionamento/sub-fracionamento foi realizado por cromatografia em coluna de sílica e as amostras analisadas por cromatografia em camada fina e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. O edema de pata foi induzido em camundongos SW por injeção (s.c.) de carragenina. Uma hora antes da inoculação de carragenina os animais foram tratados v.o. com veículo (EtOH 15%, 1,25% Tween-20), indometacina (10 mg/kg p.c.) ou ExHPpg/frações/sub-frações de Ppg. No modelo bolha de ar, a cavidade foi desenvolvida em camundongos SW através da injeção de ar estéril (s.c.) no dorso e a inflamação induzida por carragenina. Uma hora antes de inocular a carragenina os animais foram tratados (v.o) com o veículo, indometacina (10 mg/kg) ou ExHPpg/Fr2Ppg/sub-frações. Após 4 h o exsudato da bolha foi coletado para contagem total e diferencial de leucócitos (Panótico rápido) e dosagem de proteínas (biureto), e a pele referente à bolha foi removida para análises macroscópica e histológica (HE). Também foi realizado estudo de migração de neutrófilos pelo ensaio do *transwell*. Após demonstração do efeito antiedematogênico do ExHPpg, este foi fracionado em quatro frações. A fração Fr2Ppg, mais ativa no modelo de edema de pata, também inibiu os diferentes parâmetros inflamatórios avaliados no modelo de bolha de ar, com a menor dose testada, e foi sub-fracionada em cinco sub-frações. Destas, as SF2.1 e SF2.2 foram as que mostraram melhor efeito anti-inflamatório pelo modelo da bolha de ar. Em relação ao grupo controle com carragenina, o ExHPpg, Fr2Ppg, SF 2.1 e SF 2.2, na dose 0,02 mg/kg, exerceram inibições de 70,6%, 62,8%, 54,7% e 79% no número total de células no exsudato, reduções de 76,8%, 76,9%, 71,1% e 73,3% na concentração de proteína, respectivamente. Com a dose de 0,2 mg/kg, foram observadas inibições apenas para ExHPpg e SF 2.1, com intensidades menores, na leucometria total (62,9% e 48,62%, respectivamente), e na concentração de proteína para SF 2.1 e SF 2.2 (reduções de 68,2% e 30,4%, respectivamente). As análises macroscópica e histológica mostraram redução importante da vasodilatação e do infiltrado inflamatório pelo tratamento com o ExHPpg, Fr2Ppg, SF 2.1 e SF 2.2. No ensaio de *transwell* a Fr2Ppg exibiu 31,4% de inibição na migração de neutrófilos. As sub-frações SF2.1 e SF2.2 foram avaliadas por GC-MS, identificando-se de diversos compostos majoritários. Em resumo, este trabalho confirma o potencial anti-inflamatório da espécie *Pterodon polygalaeflorus* e mostra um fracionamento efetivo do ExHPpg quanto à composição e ação anti-inflamatória.

Palavras-chave: *Pterodon polygalaeflorus*. Ação anti-inflamatória. Migração celular. Modelo *air pouch*.

ABSTRACT

VIGLIANO, Mariana Vieira. **Biomonitored fractionation of isolated fraction from the hexanic extract of *Pterodon polygalaeflorus***. 2012. 104f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

The genus *Pterodon* comprises some species widely distributed over the central region of Brazil. Its fruits are commercially available on the market of the medicinal flora, being widely used by their pharmacological properties as antipyretic, anti-inflammatory and analgesic. The aim of this work was to guide the fractionation of hexanic extract of *Pterodon polygalaeflorus* Benth. fruits (ExPpg), using acute inflammation models (paw edema and air pouch). The extract fractionation was done by column chromatography on silica and the samples were analyzed by thin layer chromatography and gas chromatography coupled with mass spectrometer. Paw edema was induced in SW mice by (s.c.) injection of carrageenan in the right paw. One hour before the carrageenan inoculation, animals were orally treated with vehicle (EtOH 15, 1.25 Tween-20), indomethacin (10 mg/kg bow.) or ExHPpg/fractions/sub-fractions of Ppg. In the air pouch model, the cavity was developed in SW mice through sterile air injection (s.c.) on the back and the inflammation induced by carrageenan inoculation in this cavity. An hour before carrageenan injection the animals were orally treated with the vehicle, indomethacin (10 mg/kg) or ExHPpg/Fr2Ppg/sub-fractions. After four hours the air pouch exudate was collected for the total and differential leukocyte counts (fast Panotic) and protein determination (biuret reaction), and the skin of the air pouch was removed to macroscopic and histological analyses (HE). *In vitro* neutrophil migration was performed by transwell assay. After demonstration of the anti-edematogenic effect of ExHPpg, this extract was fractionated into four fractions. The Fr2Ppg fraction, most active in paw edema model, also inhibited, in the lowest dose tested, the different inflammatory parameters evaluated in air pouch model. Then, it was sub-fractionated in five sub-fractions. The SF 2.1 and SF 2.2 were the sub-fractions with higher anti-inflammatory effects in the air pouch model. In relation to the carrageenan control group, ExHPpg, Fr2Ppg, SF 2.1 and SF 2.2, in 0.02 mg/kg dose, showed inhibitions of 70.6%, 62.8%, 54.7% and 79% in the total leukocyte counts in the exudate and reductions of 76.8%, 76.9%, 71.1% and 73.3% in the protein concentration, respectively. With the 0.2 mg/kg dose, reductions were observed only for total leukocyte counts after treatment with ExHPpg or SF 2.1 (62.9 and 48.62, respectively), and for protein concentration in animals treated with SF 2.1 and SF 2.2 (reductions of 68.2% and 30.4%, respectively). Macroscopic and histological analyses of air pouch tissues showed important reductions of vasodilation and inflammatory infiltrate by treatment with ExHPpg, Fr2Ppg, SF 2.1 and SF 2.2. In the transwell assay the Fr2Ppg exhibited inhibition of 31.4% of neutrophil migration. The SF 2.1 and SF 2.2 sub-fractions were analyzed by GC-MS, identifying some major compounds. Concluding, this work confirms the anti-inflammatory potential of *Pterodon polygalaeflorus* species and shows an effective ExHPpg fractionation in relation to the composition and anti-inflammatory effect.

Keywords: *Pterodon polygalaeflorus*. Anti-inflammatory action. Cellular migration. Air pouch model.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	<i>Pterodon polygalaeflorus</i>	21
Figura 2 –	Estruturas químicas encontradas na espécie <i>Pterodon</i>	23
Figura 3 –	Moléculas comuns no tráfego de leucócitos nas etapas múltiplas da cascata de adesão.....	28
Figura 4 –	Pontos onde moléculas envolvidas na migração celular operam durante a resposta inflamatória.....	31
Figura 5 –	Sistema complemento.....	33
Figura 6 –	Esquema da via de eicosanóides.....	35
Figura 7 –	Etapas da cascata de interações entre leucócitos e células endoteliais.....	36
Figura 8 –	Regulação da cascata de coagulação durante o processo inflamatório...	37
Figura 9 –	Estruturas químicas de mediadores pró-resolução Lipoxina A4, resolvina E1, resolvina D1 e protectina D1.....	38
Figura 10 –	Perfil cromatográfico do ExHPpg e suas frações por TLC.....	53
Figura 11 –	Perfis cromatográficos obtidas por CG-MS das frações originadas do ExHPpg.....	54
Figura 12 –	Efeito do tratamento com diferentes doses do extrato hexânico de <i>Pterodon polygalaeflorus</i> no edema de patas induzido por carragenina.....	55
Figura 13 –	Efeito do tratamento com diferentes doses das frações Fr1Ppg, Fr2Ppg, Fr3Ppg e Fr4Ppg no edema de patas induzido por carragenina.....	56
Figura 14 –	Avaliação da atividade do ExHPpg sobre o número de leucócitos totais (A) e número absoluto de neutrófilos (B) do exsudato no modelo <i>air pouch</i>	58
Figura 15 –	Avaliação da atividade do ExHPpg sobre o nível de proteína total no exsudato da bolha.....	59
Figura 16 –	Avaliação do efeito do tratamento com o ExHPpg sobre alterações visualizadas macroscopicamente no tecido da bolha.....	60
Figura 17 –	Fotomicrografias de cortes histológicos dos tecidos da bolha de ar dos grupos controle nos aumentos de 100x e 200x.....	62

Figura 18 – Fotomicrografias de cortes histológicos dos tecidos da bolha de ar dos grupos tratados com ExHPPg, nos aumentos de 100x e 200x.....	63
Figura 19 – Avaliação da atividade da Fr2Ppg sobre o número de leucócitos totais (A) e número absoluto de neutrófilos (B) presentes no exsudato no modelo de <i>air pouch</i>	64
Figura 20 – Avaliação da atividade da Fr2Ppg sobre o nível de proteína total no exsudato da bolha.....	65
Figura 21 – Avaliação do efeito do tratamento com a Fr2Ppg sobre alterações morfológicas do tecido da bolha.....	66
Figura 22 – Fotomicrografias de cortes histológicos dos tecidos da bolha de ar dos grupos controle nos aumentos de 100x e 200x.....	68
Figura 23 – Fotomicrografias de cortes histológicos dos tecidos da bolha de ar dos grupos tratados com Fr2Ppg, nos aumentos de 100x e 200x.....	69
Figura 24 – Avaliação da atividade da Fr2Ppg sobre a migração de neutrófilos através do ensaio de <i>transwell</i>	70
Figura 25 – Cromatografia em camada delgada dos eluatos do fracionamento da FR2Ppg.....	72
Figura 26 – Perfis cromatográficos obtidos por cromatografia gasosa em CG-MS das sub-frações originadas da fração Fr2Ppg.....	73
Figura 27 – Avaliação da atividade das sub-frações originadas da fração Fr2Ppg sobre o número de leucócitos totais no exsudato no modelo <i>air pouch</i>	75
Figura 28 – Avaliação da atividade das sub-frações obtidas da Fr2Ppg sobre a concentração de proteína total do exsudato no modelo <i>air pouch</i>	77
Figura 29 – Avaliação do efeito do tratamento com as sub-frações SF 2.1 e SF 2.2 sobre alterações morfológicas do tecido da bolha.....	78
Figura 30 – Fotomicrografias de cortes histológicos dos tecidos da bolha de ar dos grupos controle nos aumentos de 100x e 200x.....	79
Figura 31 – Fotomicrografias de cortes histológicos dos tecidos da bolha de ar dos grupos tratados com a SF2.1, nos aumentos de 100x e 200x.....	82
Figura 32 – Fotomicrografias de cortes histológicos dos tecidos da bolha de ar dos grupos tratados com a SF2.2, nos aumentos de 100x e 200x.....	83

Figura 33 – Perfis cromatográficos obtidos por cromatografia gasosa em CG-MS das sub-frações originadas do Fr2Ppg.....	84
Figura 34 – Perfis cromatográficos obtidos por cromatografia gasosa em CG-MS das sub-frações originadas da Fr2Ppg.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1–	Massa e rendimento do fracionamento do ExHPpg em coluna de sílica gel.....	52
Tabela 2–	Identificação de componentes das sub-frações SF 2.1 e SF 2.2 através da biblioteca NIST do GC-MS, com seus respectivos índices de similaridade...	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	5-hidroxi-triptamina
AINES	Anti-inflamatórios não-esteroidais
APAF-1	Fator 1 de ativação de protease apoptótica
CAM	Complexo de ataque à membrana
CIA	Artrite induzida por colágeno
CMC	Chemistry Manufacturing Control
CMNSP	Células mononucleares de sangue periférico humano
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase -1
COX-2	Ciclooxigenase -2
COX-3	Ciclooxigenase -3
CYP	Citocromo P45
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos celulares
EETs	Ácidos epoxieicosatrienoicos
HETEs	Ácidos hidroxieicosatetranoicos
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular -1
IgE	Imunoglobulina E
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
IL-15	Interleucina-15
IL-18	Interleucina-18
IL-2	Interleucina-2
IL-21	Interleucina-21
IL-4	Interleucina-4

IL-6	Interleucina-6
IL-7	Interleucina-7
IL-9	Interleucina-9
LOX	Lipooxigenase
LTA ₄	Leucotrieno A ₄
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LXA ₄	Lipoxina A ₄
LXB ₄	Lipoxina B ₄
MBL	Lectina ligada a manose
MCP1	Proteína quimioatraente de monócito 1
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator de agregação plaquetária
P.c.	Peso corporal
PECAM-1	Molécula de adesão celular plaquetária/endotelial -1
PGD- ₂	Prostaglandina D ₂
PGE- ₂	Prostaglandina E ₂
PGI- ₂	Prostaglandina I ₂
PMN	Polimorfonucleares
PMNLs	Lucócitos polimorfonucleares
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
TGF-β	Fator de transformação tumoral
Th1	Linfócitos T auxiliares ou <i>helper</i> (Th)-1, que produzem IFNγ
Th2	Linfócitos T auxiliares ou <i>helper</i> (Th)-2, que produzem IL-4, IL-10 e IL-13
Th17	Linfócitos T auxiliares ou <i>helper</i> (Th)-17, que produzem IL-1β, IL-17 e TNF-α
TLRs	Receptores do tipo Tol (<i>Toll-like receptors</i>)
TNF-α	Fator de necrose tumoral – α
TXA ₂	Tromboxano A ₂
VCAM-1	Molécula de adesão vascular -1

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	19
1	REVISÃO DA LITERATURA	20
1.1	Produtos naturais	20
1.2	O gênero <i>Pterodon</i>	21
1.3	Sistema imune e inflamação	27
1.4	Processo inflamatório	29
1.4.1	<u>Células envolvidas na resposta inflamatória aguda</u>	30
1.4.2	<u>Mediadores da inflamação</u>	32
1.4.2.1	Aminas vasoativas.....	32
1.4.2.2	Sistema complemento.....	32
1.4.2.3	Via de eicosanóides.....	34
1.4.2.4	Citocinas e quimiocinas.....	34
1.4.2.5	Cascata de coagulação.....	36
1.4.3	<u>Resolução do processo inflamatório</u>	37
1.5	Fármacos anti-inflamatórios	38
1.6	Modelo <i>in vivo</i> de inflamação aguda – Edema de pata	40
1.7	Modelo de inflamação subaguda – Bolha de ar	40
2	OBJETIVOS	41
3	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	Material	42
3.1.1	<u>Animais</u>	42
3.1.2	<u>Material vegetal</u>	42
3.1.3	<u>Equipamentos</u>	42
3.1.4	<u>Reagentes e material utilizado</u>	43
3.2	Metodologia	44
3.2.1	<u>Análise Fitoquímica</u>	44
3.2.1.1	Obtenção do extrato hexânico de <i>Pterodon polygalaeflorus</i>	44
3.2.1.2	Fracionamento preparativo do ExHppg.....	45
3.2.1.3	Sub-fracionamento preparativo da fração mais ativa do ExHPpg.....	45
3.2.1.4	Cromatografia em camada delgada (TLC).....	46

3.2.1.5	Cromatografia por fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS).....	46
3.2.2	<u>Estudos <i>in vivo</i></u>	47
3.2.2.1	Modelo de edema de pata e tratamento dos animais.....	47
3.2.2.2	Modelo de bolha de ar (<i>air pouch</i>) e tratamento dos animais.....	47
3.2.2.3	Análise estatística.....	48
3.2.2.4	Análises realizadas no exsudato.....	48
3.2.2.5	Processamento histológico.....	49
3.2.3	<u>Estudo <i>in vitro</i> de migração celular</u>	49
3.2.3.1	Ensaio de migração de neutrófilos em <i>transwell</i>	49
3.2.3.2	Análise da migração de neutrófilos por Citometria de Fluxo.....	51
4	RESULTADOS	52
4.1	Preparo do Extrato Hexânico de <i>Pterodon polygalaeflorus</i> (ExHPpg)	52
4.2	Fracionamento do ExHPpg	52
4.2.1	<u>Perfil cromatográfico do ExHPpg e suas frações Fr1Ppg a Fr4Ppg por TLC..</u>	52
4.2.2	<u>Perfil cromatográfico das frações FR1 a FR4 do ExHPpg por CG-MS</u>	53
4.3	Efeito anti-inflamatório ExHPpg e suas frações	55
4.3.1	<u>Efeito anti-inflamatório agudo no modelo de edema de patas induzido por carragenina</u>	55
4.3.2	<u>Efeito anti-inflamatório agudo no modelo de bolha de ar</u>	57
4.3.2.1	Efeito anti-inflamatório agudo do ExHPpg.....	57
4.3.2.1.1	<i>Contagens total e diferencial de leucócitos no exsudato do ExHPpg</i>	57
4.3.2.1.2	<i>Dosagem do conteúdo total de proteína no exsudato da bolha do ExHPpg</i>	59
4.3.2.1.3	<i>Análise macroscópica das alterações morfológicas no tecido da bolha do ExHPpg</i>	60
4.3.2.1.4	<i>Alterações histológicas do tecido da bolha do ExHPpg</i>	61
4.3.2.2	Efeito anti-inflamatório da Fração Fr2Ppg.....	61
4.3.2.2.1	<i>Dosagem do conteúdo total de proteína no exsudato da bolha da Fr2Ppg</i>	65
4.3.2.2.2	<i>Análise macroscópica das alterações morfológicas no tecido da bolha da Fr2Ppg</i>	66
4.3.2.2.3	<i>Alterações histológicas do tecido da bolha da Fr2Ppg</i>	67
4.3.3	<u>Influência da Fr2Ppg na migração <i>in vitro</i> de neutrófilos</u>	67
4.4	Sub-fracionamento da fração Fr2Ppg isolado do ExHPpg	71

4.4.1	<u>Perfil cromatográfico das sub-frações obtidas da Fr2Ppg (TLC).....</u>	71
4.4.2	<u>Perfil cromatográfico das sub-frações SF 2.1 a SF 2.5 da Fr2Ppg por CG-MS</u>	71
4.4.3	<u>Potencial anti-inflamatório agudo das sub-frações da Fr2Ppg.....</u>	74
4.4.3.1	Dosagem do conteúdo total de proteína no exsudato da bolha das sub-frações da fração Fr2Ppg.....	76
4.4.3.2	Análise macroscópica das alterações morfológicas no tecido da bolha das sub-frações da fração Fr2Ppg.....	76
4.4.3.3	Alterações histológicas do tecido da bolha das sub-frações da fração Fr2Ppg.....	76
4.4.4	<u>Análise da SF 2.1 a SF 2.2 da Fr2Ppg por CG-MS.....</u>	80
	DISCUSSÃO.....	87
	CONCLUSÃO.....	95
	REFERÊNCIAS.....	96

INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres e mercados populares, além de serem cultivadas em quintais residenciais. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo mantêm em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (Maciel *et al.*, 2002).

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Produtos naturais

A fitoterapia e outras práticas farmacológicas tradicionais têm seu uso difundido em todo o mundo. Essa ampla utilização sugere, mas não assegura que os medicamentos tradicionais apresentam uma relação risco-benefício favorável. No entanto, os medicamentos tradicionais podem ser considerados como um potencial e atraente recurso terapêutico (Organização Mundial da Saúde (OMS), 2008).

Persiste a necessidade de avaliar os reais benefícios e os possíveis riscos apresentados, através da realização de ensaios clínicos, conduzidos em conformidade com os princípios da ciência clínica atualmente praticada. As justificativas para que sejam exigidos ensaios clínicos de um fármaco convencional envolvem, basicamente, quatro questões: o tripé da qualidade total no desenvolvimento, produção e controle de medicamentos, (do inglês Chemistry-Manufacturing Control – CMC), os aspectos pré-clínicos, os aspectos clínicos e os questionamentos éticos (OMS, 2008).

O Brasil possui enorme biodiversidade na qual podem ser encontradas espécies animais e vegetais que contém princípios ativos potencialmente úteis à humanidade. Estudos de etnobotânica evidenciam a existência de um grande acervo de plantas medicinais cujas propriedades são de conhecimento popular, o qual indiretamente tem contribuído para o avanço científico e para a valoração do saber dos povos tradicionais (EMBRAPA, 2008).

Considerando a grande utilização de plantas medicinais torna-se necessária a investigação criteriosa acerca da composição, toxicologia e substâncias ativas destas, para que seu uso seja viabilizado de forma segura pela população no geral.

1.2 O gênero *Pterodon*

O gênero *Pterodon*, pertence à família das Leguminosae Papilionáceas (Leguminosae-Papilionoidea) e compreende cinco espécies nativas do Brasil: *Pterodon abruptus* Benth., *Pterodon apparicioi* Pedersoli, *Pterodon polygalaeiflorus* Benth., *Pterodon emarginatus* Vog. e *Pterodon pubescens* Benth. (Pedersoli, 1970; Fascio *et al.*, 1976). Popularmente, são conhecidas como sucupira, sebipira, sicopira, sebupira, curubai-mirim e faveiro (Penna, 1946; Cruz, 1965; Braz Filho *et al.*, 1970).

A sucupira é uma árvore largamente dispersa nos cerrados (Figura 1A) desde o Ceará (Serra do Araripe) até São Paulo. A época de frutificação é o mês de agosto, produzindo frutos drupáceos, achatados (Figura 1B e 1C), ricos em óleo, localizado no endocarpo, o qual pode ser obtido por expressão ou extração com solventes (Mors *et al.*, 1966).

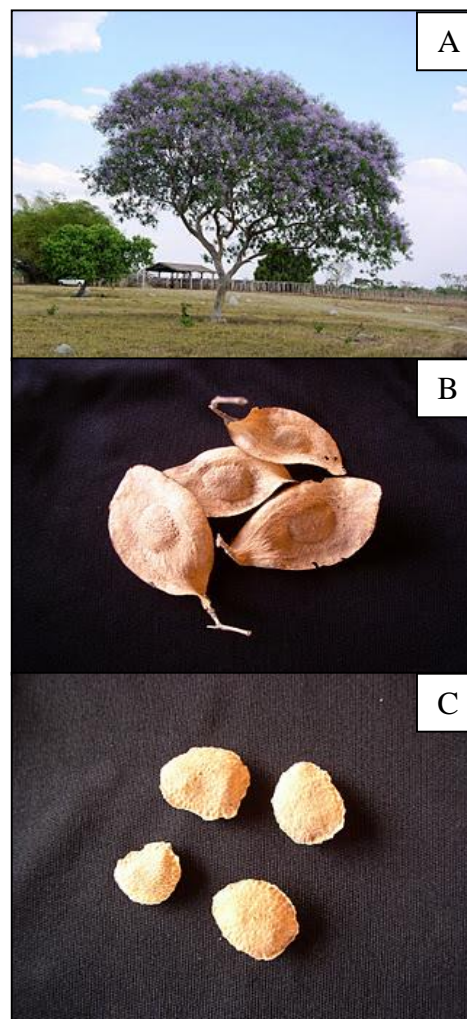


Figura 1 – *Pterodon polygalaeiflorus*

<http://jjleandro-jjleandro.blogspot.com/2007/09/flora-do-cerrado.html>

As formas farmacêuticas habituais da sucupira são: infusos, decoctos, tinturas, vinhos ou xaropes, de sementes, batatas ou casca (Coimbra, 1942). Infusões hidroalcoólicas de sua casca, raiz e frutos, geralmente ingeridas em pequenas doses e em intervalos de tempo regulares, são usadas para tratamento de doenças reumáticas e inflamatórias, tosses, afecções da boca e garganta, hemorragias, fraqueza orgânica, doenças de estômago e úlceras, e sintomas relacionados à disfunções respiratórias como bronquite e amidalite (Cruz, 1965).

A química das espécies do gênero *Pterodon* é baseada no estudo do óleo dos frutos e do extrato de seu tronco ou casca. O óleo dos frutos de espécies deste gênero tem fornecido produtos químicos das classes dos sesquiterpenos (Mors *et al.*, 1966, Neto, 1976), diterpenos

lineares (Mors, 1967), furanoditerpenos com esqueleto vouacapano (Figura 2a) e vinhaticano (Figura 2b) (Fascio *et al.*, 1970, Mahajan e Monteiro, 1973, Fascio *et al.*, 1976, Campos *et al.*, 1994, Demuner *et al.*, 1996, Arriaga *et al.*, 2000), e o flavonoide taxifolina (Figura 2c) (Arriaga *et al.*, 2000).

Os extratos provenientes do tronco ou casca de árvores do gênero *Pterodon* têm proporcionado a obtenção de algumas isoflavonas (Figura 2d) (Braz-Filho e Gottlieb, 1971, Galina e Gottlieb, 1974, Almeida e Gottlieb, 1975, Marques *et al.*, 1998). Do extrato acetônico do tronco foram identificados dois triterpenos: lupeol (Figura 2e) e betulina (Figura 2f). As substâncias protetoras, com pouquíssimas exceções, são restritas a terpenos pouco polares (Gilbert *et al.*, 1970; Dias *et al.*, 1995). Do óleo de *P. emarginatus* foi isolado o ácido 6 β ,7 α -dihidroxivouacapano-17 α -oico (Figura 2g) e a 6 β -hidroxivouacapano-7 α ,17 α -lactona (Figura 2h), que mostraram atividade anti-inflamatória e analgésica (Mahajan *et al.*, 1973).

Investigações de diterpenos em quatro espécies mostram diferentes padrões de oxidação (Fascio *et al.*, 1976). Foram isolados dois novos diterpenos de *P. pubescens* com fórmulas moleculares C₂₅H₂₂O₆ e C₂₅H₃₄O₈, e de *P. emarginatus*, com fórmulas moleculares C₂₄H₃₄O₅ e C₂₂H₃₂O₃ (Fascio *et al.*, 1970; Mahajan & Monteiro, 1970), além de isoflavonas oxigenadas a partir do extrato benzênico de tronco de *P. pubescens* (Braz Filho *et al.*, 1970). O furanoditerpeno 6 α ,7 β -dihidrovouacapan-17 β -oato de metila (Figura 2i) foi capaz de inibir o edema de pata causado por carragenina (Nunan *et al.*, 1982). Dos Santos Filho e colaboradores (1972) descreveram como responsáveis pela ação cercaricida do óleo, 2 derivados oxigenados do geranilgeraniol: 14,15-epoxigeranilgeraniol (Figura 2j) e 14,15-dihidroxigeranilgeraniol (Figura 2k).

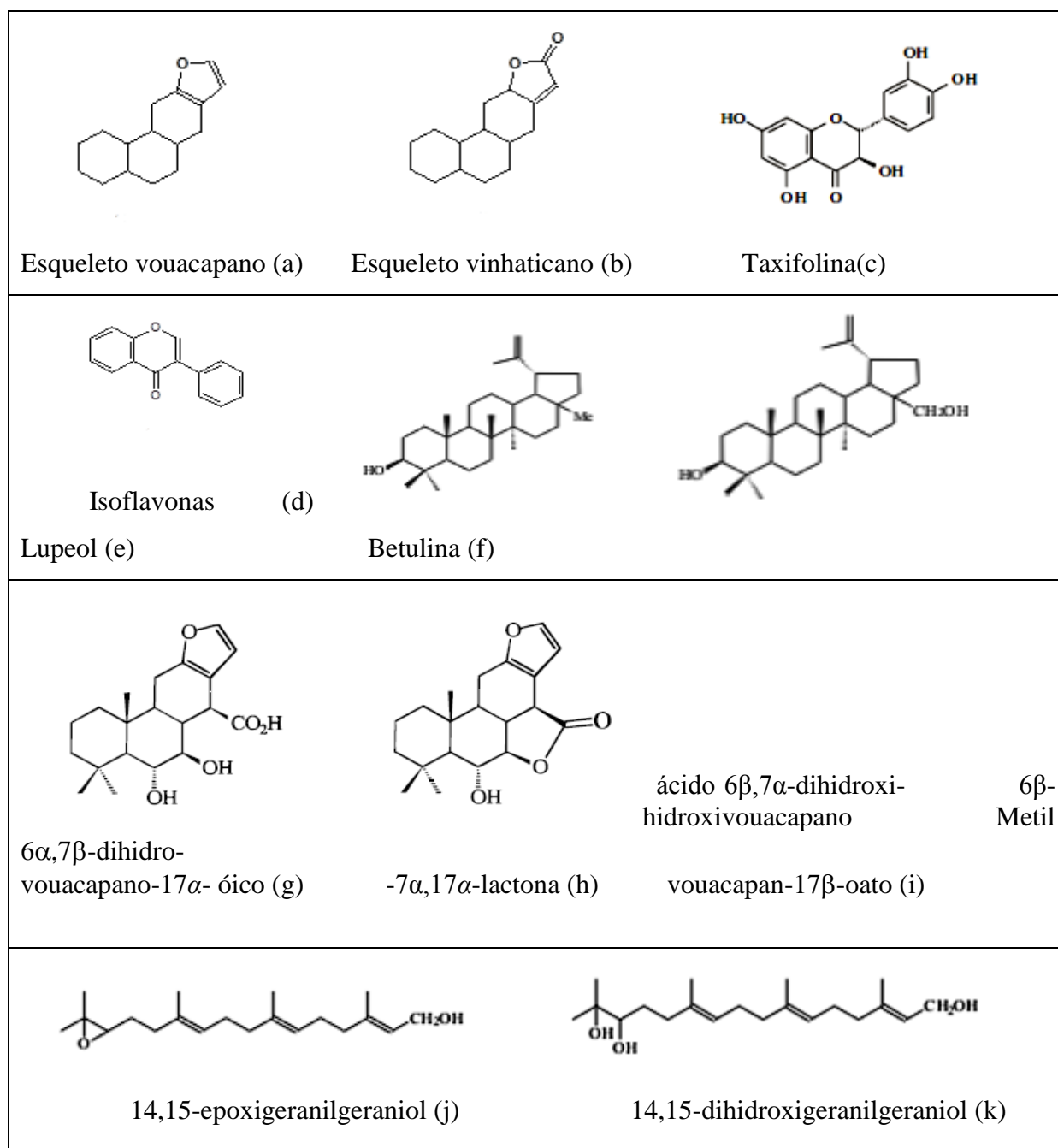


Figura 2 - Estruturas químicas encontradas no gênero Pterodon

Diterpenos e furano diterpenos foram isolados e mostraram atividade antinociceptiva em modelos experimentais em roedores (Demuner *et al.*, 1996; Duarte *et al.*, 1996). Derivados do ácido 6 α ,7 β -dihidroxiyouacapano-17- β -óico mostraram o envolvimento de peptídeos opioides (Duarte *et al.*, 1992) e catecolaminas (Duarte *et al.*, 1996) no mecanismo de ação analgésica. Estudos *in vitro* mostraram que esses derivados são capazes de inibir contrações do íleo de cobaias, induzidas por estimulação elétrica, por um mecanismo ainda não esclarecido, mas que pode estar relacionado com a ativação de receptores opioides ou 2 α -noradrenérgicos (Belinelo *et al.*, 2002), sugerindo que os compostos de *P. polygalaeflorus* podem ter uma ação direta sobre tecidos musculares lisos. O extrato etanólico dos frutos de *P. polygalaeflorus* apresentou efeito larvicida significativo sobre o mosquito *Aedes aegypti* (De Omena *et al.*, 2006). O extrato etanólico de *P. pubescens* exibiu atividade anti-proliferativa relevante *in vitro* sobre linhagem de melanoma SK MEL 37 (Vieira *et al.*, 2008).

Estudos com *P. emarginatus* tem demonstrado a presença de compostos fenólicos e a atividade antioxidante desses compostos (Dutra *et al.*, 2008) e do extrato hexânico (Paula *et al.*, 2005), além dos efeitos anti-ulcerogênico e anti-inflamatório de suas sementes (Carvalho *et al.*, 1999; Dutra *et al.*, 2009).

Mais recentemente, também foi demonstrada atividade analgésica para o geranilgeraniol e compostos derivados do youacapano (metil éster 6 α , 7 β -dihidroxiyouacapan-17 β -oato) isolados do extrato bruto de *P. pubescens* em modelos experimentais (Spindola *et al.*, 2010). Compostos isolados de *P. polygalaeflorus* e *P. pubescens* também exerceram atividade anti-proliferativa em linhagens de células tumorais (Vieira *et al.*, 2008; Euzébio *et al.*, 2009; Euzébio *et al.*, 2010).

Nosso grupo de pesquisa vem estudando espécies deste gênero, tendo demonstrado que o óleo de sementes de *P. pubescens* (EOPp) inibe a proliferação *in vitro* de células mononucleares de sangue periférico humano (CMNSP) e a produção de interleucina (IL)-6 pelas mesmas células (Sabino, 1995). Efeitos semelhantes têm sido descritos por várias drogas utilizadas no tratamento de doenças reumáticas, como a AR.

Em seguida, estudos toxicológicos (Sabino *et al.*, 1999a) mostraram baixa toxicidade aguda do EOPp administrado (v.o.) em animais saudáveis e ausência de mutagenicidade (teste de Ames), mesmo em concentrações capazes de matar *in vitro* 100% de CMNSP em doses significativamente maiores proporcionalmente às usadas para humanos.

Também foi demonstrada cientificamente a ação antiartrítica do extrato hidroalcoólico das sementes de *P. pubescens* (EHPp) em camundongos DBA/1J com artrite induzida por

colágeno do tipo II (CIA), pelo tratamento diário v.o., reduzindo significativamente a severidade da CIA (Sabino *et al.*, 1999).

Como existem relatos de que em condições de estimulação do sistema imune ocorre uma diminuição da biotransformação hepática e excreção de drogas, resultando em efeitos colaterais indesejáveis (Khatsenko *et al.*, 1993, Renton, 2000), parâmetros bioquímicos do soro, hematológicos e estudos anatômicos e histopatológicos de órgãos foram realizados em animais artríticos tratados de forma subaguda com o EHPp. O tratamento desses animais artríticos com EHPp não produziu nenhuma toxicidade subaguda nas condições utilizadas (Coelho *et al.*, 2001).

O estudo dos mecanismos de ação envolvidos no efeito antiartrítico do EHPp em camundongos com CIA (Coelho *et al.*, 2004) mostrou resultado importante como a redução na produção de anticorpos anti-CII. A análise histopatológica das patas dos animais com CIA mostrou um grande infiltrado inflamatório com predominância de neutrófilos polimorfonucleares, algumas áreas de fratura e neoformação óssea, o que não foi observado no grupo tratado com EHPp (Coelho *et al.*, 2004). Além disso, o tratamento da CIA com EHPp diminuiu seletivamente a contagem absoluta de células CD4/CD69⁺, não interferindo nas células CD8CD69⁺, indicando que o EHPp intervém preferencialmente nas células CD4 ativadas, efeito esse de grande importância, considerando-se que a CIA é mediada por células T CD4 (Coelho *et al.*, 2004b).

Efeitos imunomoduladores do EOPp em camundongos normais também foram demonstrados (Cardoso *et al.*, 2008), através da produção *in vitro* de óxido nítrico (NO) por linhagem de células macrofágicas.

A busca dos princípios ativos dos extratos de *P. pubescens* se iniciou com o extrato das sementes a 100% de etanol (EOPp). O fracionamento biomonitorado do EOPp foi iniciado, com o objetivo de identificar os princípios ativos responsáveis pela ação anti-inflamatória e antinociceptiva, utilizando respectivamente o modelo de inflamação aguda, induzida pela injeção subplantar(s.p.) de Carragenina e o de nocicepção química, induzida por ácido acético. Tais efeitos anti-inflamatórios (Silva *et al.*, 2004) e antinociceptivos (Coelho *et al.*, 2005a) do EOPp foram demonstrados, e ocorreram de forma dose-dependente. O EOPp foi então submetido à extração líquido-líquido obtendo-se quatro frações: Pp1, Pp2, Pp3 e Pp4. Após avaliação da atividade biológica, o fracionamento das frações Pp1 e Pp2 foi biomonitorado quanto às atividades anti-inflamatória aguda e antinociceptiva. A fração Pp1 e suas subfrações (Silva *et al.*, 2004) mostraram uma potente atividade anti-inflamatória aguda e tópica. A atividade anti-inflamatória pode ser atribuída, pelo menos em parte ao geraniolgeraniol (fração

Pp1.2). A fração Pp2 apresentou predominantemente efeito antinociceptivo (Coelho *et al.*, 2005a). Subfrações da Pp2, avaliadas quanto à atividade antinociceptiva, mostraram predominância de atividade em modelos diferentes, o que pode sugerir que atuam, pelo menos em parte, por mecanismos diferentes (Coelho *et al.*, 2005).

A avaliação da agregação induzida por ácido araquidônico, ADP e trombina em plaquetas humanas e de coelho mostrou o envolvimento do EOPp e Pp1.2 na cascata do ácido araquidônico, sendo também observada a supressão da formação de TXA₂ e atividade antioxidante na peroxidação de lipídios (Calixto *et al.*, 2007). Também foi demonstrada uma ação tripanocida por um dos constituintes da fração hexano do EOPp, o geranilgeraniol (Menna-Barreto *et al.*, 2008).

Mais recentemente observamos que o EOPp apresenta atividade antileucêmica, inibindo a expressão de componentes envolvidos na sinalização da proliferação de células leucêmicas K562, como as ciclinas D1 e E2, resultando em interrupção do ciclo celular e indução de apoptose destas células (Pereira *et al.*, 2010). Também demonstramos recentemente esta atividade antileucêmica em células K562 com uma subfração (SF5) rica em derivados do geranilgeraniol, farnesol e furanoditerpenos do esqueleto vouacapan, obtida da fração PP1 (Pereira *et al.*, 2011). Este trabalho mostra que a SF5 induz apoptose de células K562 e que este processo está sendo ativado pela via intrínseca ou mitocondrial, devido à demonstração do aumento na expressão da molécula APAF-1. Além disso, mostra que este aumento na expressão de APAF-1 pode estar relacionado com a expressão reduzida da DNA metil transferase, responsável, entre outros mecanismos, pela regulação epigenética da expressão gênica através da inibição da expressão de genes por metilação dos genes promotores dos mesmos (Pereira *et al.*, 2011).

Estudos iniciados com a espécie *Pterodon polygalaeflorus* demonstraram atividades antiedematogênica em modelo de inflamação aguda (Vigliano, 2010) e analgésica em modelo de contorção abdominal (Pinto, 2010), do extrato hexânico e suas frações.

1.3 Sistema imune e inflamação

A resposta imune é um dos mais importantes mecanismos adaptativos, pois permite a sobrevivência em ambientes potencialmente lesivos. A ação contra processos infecciosos ocorre através de duas frentes: a imunidade humoral, mediada por anticorpos, e a imunidade celular, mediada por células (Chaplin, 2010).

Dentre as funções do sistema imune está a proteção do hospedeiro contra agentes infecciosos.. A resposta imune utiliza um complexo conjunto de mecanismos protetores de controle os quais eliminam estes organismos. Mecanismos do hospedeiro para reconhecimento de estruturas microbianas são divididos em duas classes: a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa (Chaplin, 2010).

Os sistemas imunes: inato e adaptativo são frequentemente descritos como braços contrários da resposta do hospedeiro; entretanto, eles geralmente atuam juntos, com a resposta imune inata representando a primeira linha de defesa e a resposta adaptativa tornando-se proeminente após dias com células antígeno-específicas T e B sendo submetidas à expansão clonal (Chaplin, 2010).

Além disso, as células antígeno-específicas amplificam suas respostas pelo recrutamento de mecanismos efetores inatos, o que leva ao controle completo de organismos invasores. Então, embora as respostas imunes, inata e adaptativa, sejam fundamentalmente diferentes em seus mecanismos de ação, a sinergia entre elas é essencial para uma resposta imunológica eficaz (Chaplin, 2010).

Receptores Toll-like (TLRs) são membros da família de receptores de reconhecimento padrão (PRR) que representam a primeira linha de defesa do organismo (Lin *et al.*, 2011). Eles podem reconhecer ligantes endógenos derivados do hospedeiro ou moléculas próprias, as quais tem sido denominadas como padrões moleculares associados a danos (DAMPs), desta maneira, contribuem para o desenvolvimento de doenças inflamatórias estéreis, como artrite reumatoide, diabetes, encefalomielite autoimune experimental e uveites (Liew *et al.*, 2005), injúria de isquemia/reperfusão (I/R) assim como outras injúrias teciduais e subsequente reparo e regeneração (Yu, 2010).

Leucócitos polimorfonucleares (PMNLs) são células imunes inatas essenciais que determinam a resistência do hospedeiro contra várias infecções bacterianas e fúngicas (Segal, 2005; Vento e Cainelli, 2003). Portanto, neutrófilos são células imunes inatas importantes, as quais protegem o hospedeiro da invasão de patógenos, usando diferentes estratégias de defesa (Kumar e Sharma, 2010).

Os granulócitos, os quais incluem, neutrófilos, eosinófilos e basófilos, são células imunes inatas que contém grânulos especializados em providenciar a primeira linha de defesa imune. Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes circulantes no sangue em humanos saudáveis. Estas células de vida curta expressam uma ampla variedade de moléculas de adesão e receptores quimiotáticos (Figura 3); diferentes subgrupos podem ser distinguidos em camundongos com base em suas moléculas envolvidas no tráfego de leucócitos e no precursor diferencial potencial de leucócitos residentes no tecido (Luster *et al.*, 2005).

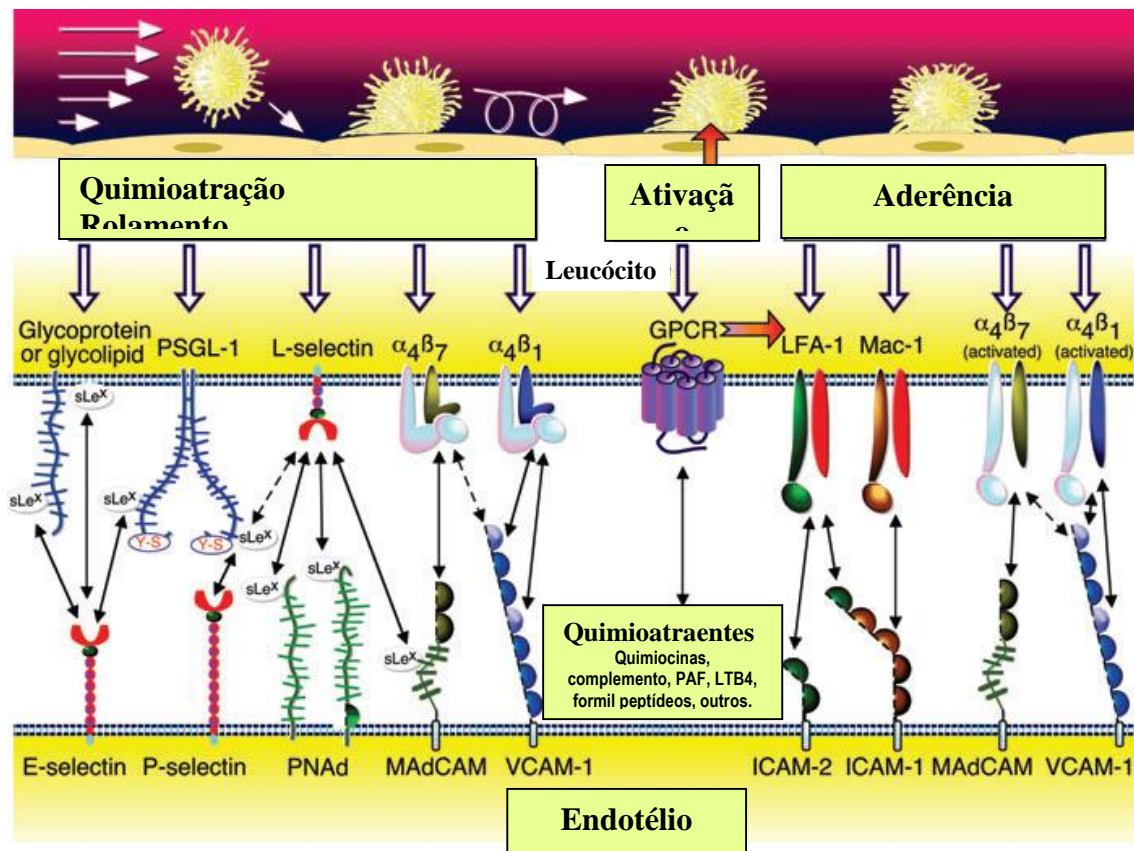


Figura 3 - Moléculas comuns no tráfego de leucócitos nas etapas múltiplas da cascata de adesão (Luster *et al.*, 2005).

1.4 Processo inflamatório

A resposta inflamatória pode ser dividida em duas categorias – aguda e crônica – baseando-se na duração e características patológicas. A inflamação aguda é relativamente de curta duração (horas ou dias) e é caracterizada por vasodilatação, exsudação de líquido rico em proteínas e migração de células para o sítio da injúria, e em alguns casos ativação da cascata de coagulação. Se a resposta aguda não puder ser resolvida, esta se torna crônica. A inflamação crônica é caracterizada por duração prolongada (semanas, meses ou anos), na qual a inflamação ativa, a destruição tecidual e a tentativa de reparo do tecido ocorrem simultaneamente (Liew, 2003). A infiltração de células mononucleares e fibrose são características típicas da inflamação crônica (Davies *et al.*, 2003).

A inflamação é a resposta primária à infecção ou injúria que age ao remover o material ou agente de injúria e promovendo o reparo tecidual. A inflamação resulta da liberação sequencial de uma bateria de mediadores incluindo aminas bioativas, eicosanoides, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, que regulam o aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de leucócitos. O aumento da permeabilidade vascular também resulta em extravasamento de proteínas plasmáticas que amplificam a reação inflamatória. A inflamação é essencialmente uma resposta saudável, que normalmente se resolve com a recuperação da estrutura e função normais do tecido. Entretanto, quando a inflamação persiste (inflamação crônica) isto pode causar dano ao tecido e perda de função. A inflamação crônica pode ocorrer devido à persistência da infecção ou antígeno, recorrente dano tecidual, ou falha de mecanismos endógenos anti-inflamatórios que direcionam a resolução da inflamação (Rodriguez-Vita *et al.*, 2010).

As vias da inflamação sistêmica têm sido reconhecidas como componentes essenciais na patogênese de diferentes doenças multifatoriais abrangendo desordens reumáticas inflamatórias crônicas, assim como uma grande variedade de condições patológicas incluindo diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, câncer, obesidade, asma, e envelhecimento (Scriver *et al.*, 2011).

1.4.1 Células envolvidas na resposta inflamatória aguda

A resposta imune inclui as contribuições de muitas subpopulações de leucócitos. Estes diferentes subtipos de leucócitos podem ser discriminados, morfológicamente, por meio de análise histológica e de espectro de antígenos de diferenciação que são exibidos em suas membranas celulares (Chaplin, 2010).

A migração de neutrófilos durante uma resposta inflamatória resulta principalmente da liberação de fatores quimiotáticos por células residentes, os quais induzem o rolamento e adesão de neutrófilos em células endoteliais, seguido de sua transmigração para o espaço extra vascular (Burke-Gaffney e Hellewell, 1996; Zhang *et al.*, 2001).

O extravasamento de leucócitos ocorre geralmente através de um processo de várias etapas, envolvendo primariamente as selectinas, a sinalização de receptor quimiotático, seguida de firme aderência às paredes dos vasos através da ação de integrinas (Figura 4). A sinalização quimioatraente é geralmente um evento essencial durante o processo de várias etapas de rolamento de leucócitos e migração transendotelial. Conseqüentemente, os inibidores de muitos quimioatraentes ou de seus receptores têm se mostrado altamente eficazes como agentes anti-inflamatórios em uma gama de modelos animais de inflamação (Viola e Luster, 2008; Luster *et al.*, 2005; Mackay *et al.*, 2001; Proudfoot, 2002). Entretanto, inibidores de integrinas e selectinas tem também provado ser altamente eficientes em modelos animais de inflamação e em doenças humanas (Mackay, 2008).

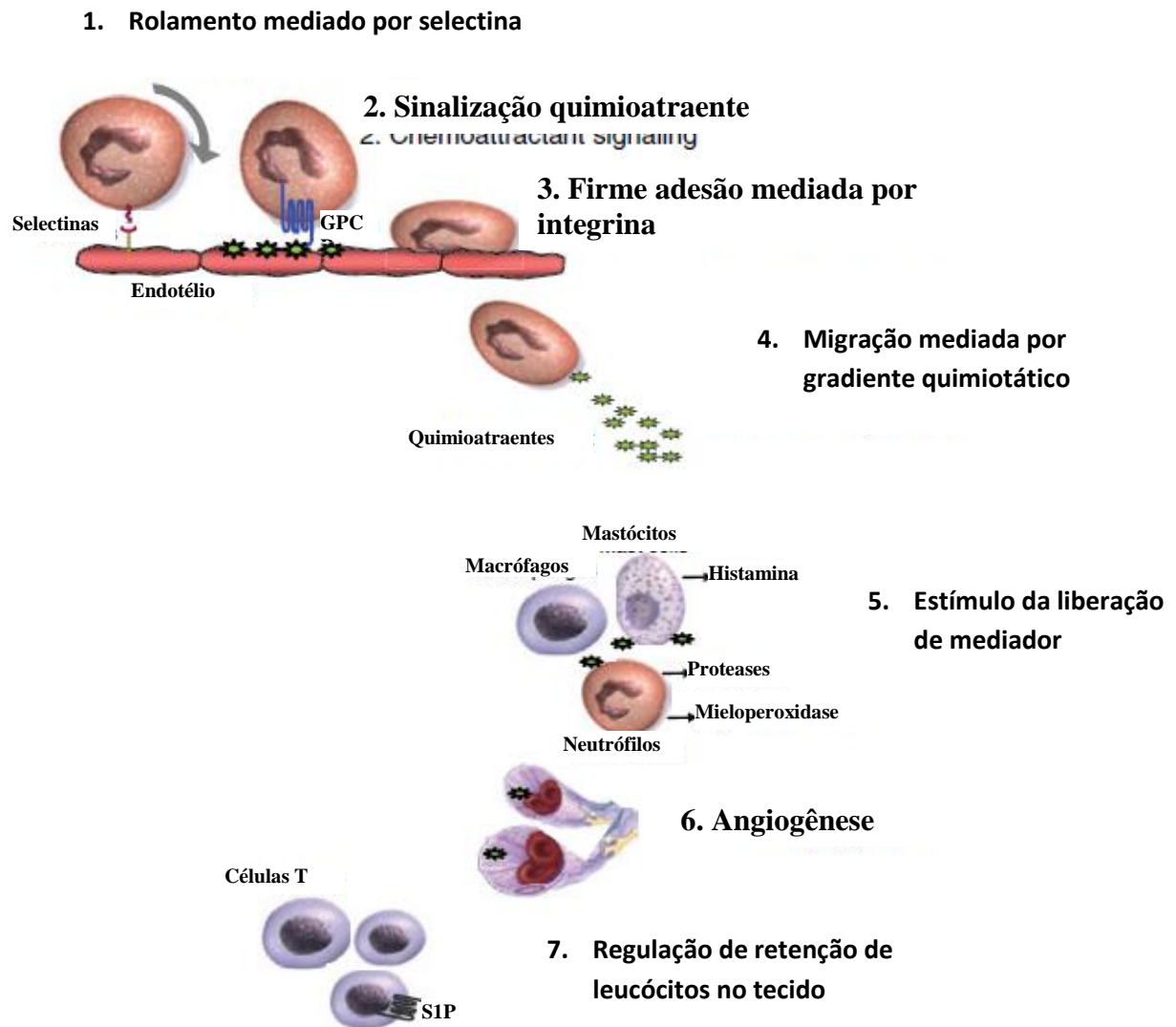


Figura 4: Pontos onde moléculas envolvidas na migração celular operam durante a resposta inflamatória. Modificada de Mackay, 2008.

1.4.2 Mediadores da inflamação

1.4.2.1 Aminas vasoativas

Várias substâncias do tipo aminas possuem ação nos vasos sanguíneos, como serotonina, histamina e bradicinina. A serotonina (5-hidroxi-triptamina ou 5-HT), uma amina vasoativa oriunda da descarboxilação do triptofano, seguida de hidroxilação do anel indólico, é encontrada na parede intestinal, no sangue e no sistema nervoso central, atuando principalmente como neurotransmissor e como potente vasodilatador. Em resposta ao estímulo inflamatório, a serotonina é liberada na circulação, e, juntamente com outros mediadores, irá estimular a vasodilatação (Malinin *et al.*, 2004).

A serotonina, uma amina vasoativa oriunda da descarboxilação do triptofano, seguida de hidroxilação do anel indólico, é encontrada na parede intestinal, no sangue e no sistema nervoso central, atuando principalmente como neurotransmissor e como potente vasodilatador. Em resposta ao estímulo inflamatório, a serotonina é liberada na circulação, e, juntamente com outros mediadores, irá estimular a vasodilatação (Malinin *et al.*, 2004).

A histamina é uma amina vasoativa armazenada em mastócitos e é liberada quando o antígeno se liga a moléculas de IgE na superfície de mastócitos. Histamina causa vasodilatação, constrição e relaxamento do músculo liso bronquial, secreção de ácido gástrico e interage com nociceptores (Ammon, 2010).

Invariavelmente, esta resposta é desencadeada por mastócitos e macrófagos residentes, dos quais a desgranulação e ativação sequencialmente libera uma bateria de mediadores inflamatórios, incluindo aminas bioativas (Histamina e Serotonina (5- hidroxi-triptamina ou 5-HT), citocinas, quimiocinas assim como mediadores lipídicos que coletivamente recrutam e ativam células inflamatórias levando à formação do edema (Lawrance *et al.*, 2007).

1.4.2.2 Sistema complemento

O sistema complemento é constituído de mais de 30 proteínas plasmáticas e cofatores de membrana os quais atuam em uma sequência de cascatas multi-proteicas, em conjunto com outros sistemas imunológicos do organismo e é importante na rápida defesa contra agentes invasores e infecções (Shagdarsuren *et al.*, 2008) A ativação do complemento é iniciada por três vias principais: a via alternativa, espontânea e continuamente ativa; a via clássica, induzida quando anticorpos se ligam a seu antígeno correspondente; e a via da lectina, que é

desencadeada pela ligação da lectina ligada a manose (MBL) a resíduos de manose na superfície de microorganismos. Esta ligação ativa 33 proteases associadas à MBL (MASP1 e MASP2), que então clivam C4 e C2 (Zipfel e Sherka, 2009).

De uma forma geral, a ativação do complemento ocorre de forma sequencial e pode ser dividida em quatro principais etapas: a iniciação da ativação do complemento; ativação da C3 convertase e amplificação; ativação da C5 convertase; e ativação da via terminal ou a montagem do complexo de ataque à membrana (CAM) (Figura 5). Este, por sua vez causa o rompimento da membrana da célula microbiana e subsequente morte do microorganismo (Zipfel e Sherka, 2009).

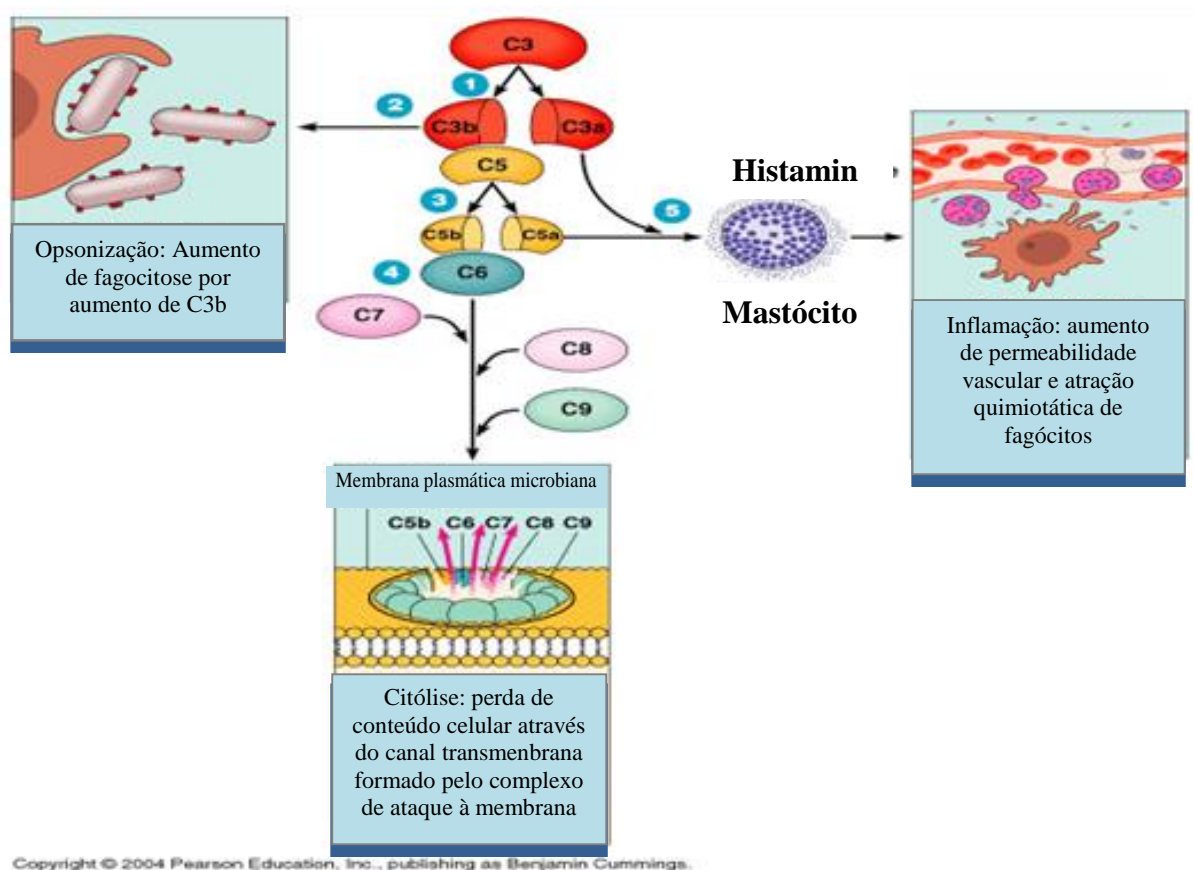


Figura 5 - Sistema complemento, Modificado de: <http://diverge.hunter.cuny.edu/~weigang/Lecture-syllabus.html>

1.4.2.3 Via de eicosanoides

Os eicosanoides, incluindo prostaglandinas e leucotrienos (Figura 6), são produtos de tipos celulares específicos do metabolismo do ácido araquidônico e podem ser potentes mediadores da inflamação (Zeldin, 2001; Imig e Hammock, 2009). Estes mediadores lipídicos desempenham papéis críticos em diversos processos fisiológicos e patológicos, como fibrose pulmonar e câncer. As famílias das enzimas ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase (LOX) são responsáveis ao metabolismo do ácido araquidônico; este metabolismo leva a produção de prostaglandinas e leucotrienos, respectivamente (Greene *et al.*, 2011).

Estas enzimas (Figura 6) são o alvo de drogas aprovadas para o tratamento de dor, inflamação, asma e alergias (Imig e Hammock, 2009).

Há porém, outra via enzimática proeminente para a qual o ácido araquidônico é também substrato, o sistema do citocromo P450 (CYP). Esta via de eicosanoide consiste de dois principais ramos: hidrolases, as quais convertem ácido araquidônico em ácidos hidroxi-eicosatetranoicos (HETEs) e epoxigenases, as quais o convertem a ácidos epoxi-eicosatrienoicos (EETs). A via CYP é particularmente relevante em tecidos que expressam baixas atividades de COX e LOX. A via CYP, originalmente estudada em conjunto com doenças inflamatórias e cardiovasculares, parece também ter função no crescimento de tumores (Panigrahy *et al.*, 2010).

1.4.2.4 Citocinas e quimiocinas

A resposta inflamatória é minuciosamente controlada por citocinas, as quais podem ter caráter pró ou anti-inflamatório. As principais citocinas pró-inflamatórias são TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18, enquanto que as anti-inflamatórias são IL-4, IL-10, IL-13 e TGF β e o controle da resposta inflamatória é realizado através de um balanço entre estas citocinas (Sherwood e Kinsky, 2004).

As principais funções dos neutrófilos incluem fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio, e produção de quimioatraentes como, os quais recrutam mais células competentes (Figura 6) (Witko-Sarsat *et al.*, 2000) A resposta de neutrófilos geralmente termina quando os neutrófilos sofrem apoptose e são fagocitados por macrófagos residentes (Savill *et al.*, 1989). Entretanto, em certas doenças inflamatórias, como a artrite reumatoide ou doenças inflamatórias intestinais, os neutrófilos persistem no sítio inflamatório, perpetuando a inflamação (Haydek e Keshavarzian, 1995).

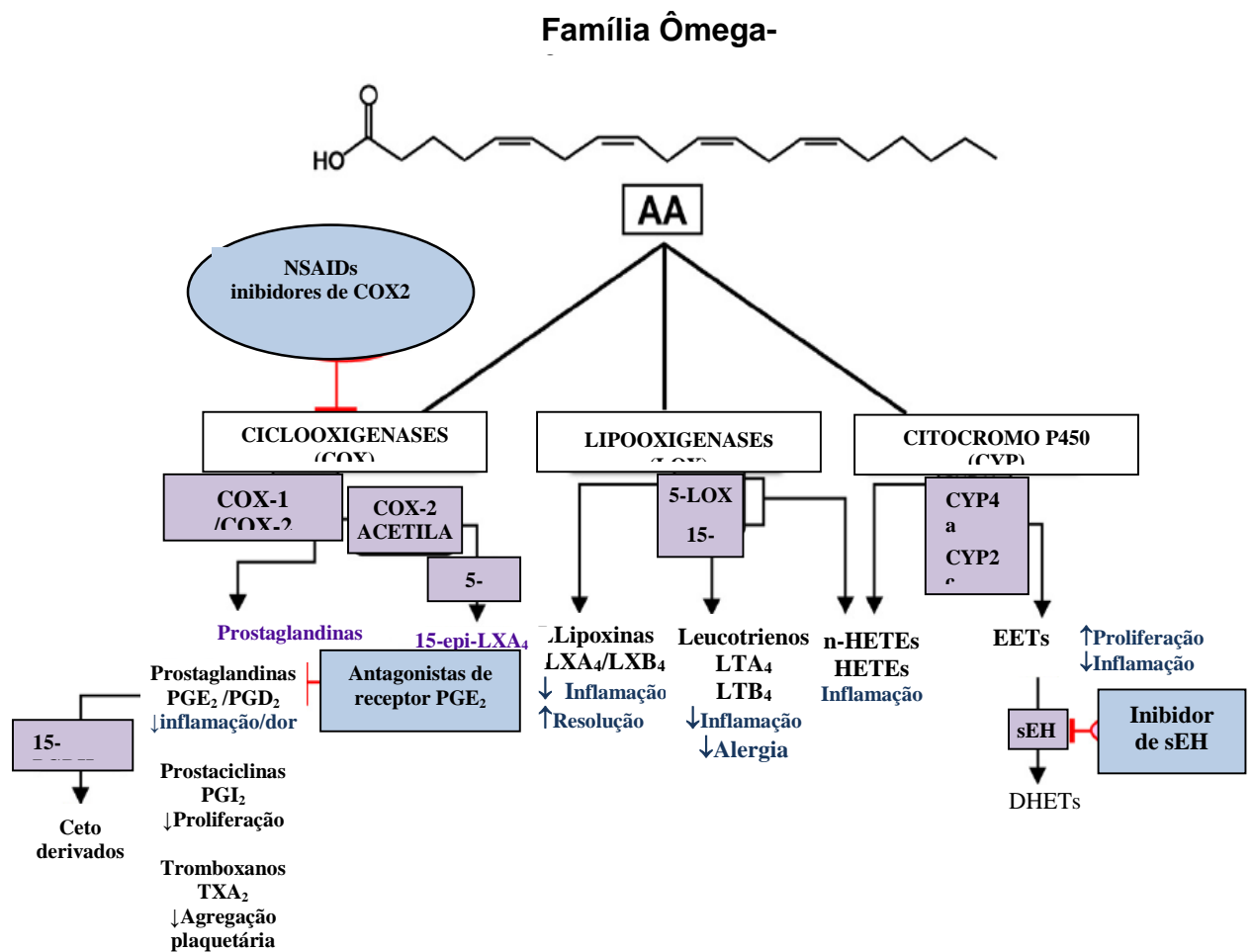


Figura 6 - Esquema da via de eicosanoides. Modificado de Grenee, 2011.

A Interleucina-4 (IL-4) é um membro do grupo das citocinas dependentes de CD132 o qual também compreende IL-2, -7, -9, -15 e -21 (Kovanen e Leonard, 2004). A IL-4 tem sido amplamente associada com funções anti-inflamatórias (Hart *et al.*, 1989; HART *et al.*, 1991) visto que reduz funções de monócito e macrófago e induz uma resposta tipo Th2. Entretanto, a IL-4 pode também ser considerada como pró-inflamatória, visto que a expressão e a resposta do tipo Th2 são associadas com alergias e asma (De Vries *et al.*, 1999) porém ainda é considerada principalmente como uma citocina anti-inflamatória (Ratthé *et al.*, 2009).

As Quimiocinas tem sido relacionadas à diversas funções, incluindo angiogênese, organogênese e metástase de tumores assim como quimiotaxia (Moser *et al.*, 2004).

Enquanto células Th1 e Th2 protegem o hospedeiro contra patógenos intracelulares e extracelulares, respectivamente, foi recentemente sugerido que as células Th17 constituem um subconjunto específico de células que contribuem significativamente para o desenvolvimento de doenças inflamatórias autoimunes (Korn *et al.*, 2007; Stockinger *et al.*, 2007). As células Th17 foram nomeadas em função da citocina que produzem, IL-17, cujas atividades pleiotrópicas incluem a indução de citocinas pró-inflamatórias TNF α , IL-1, e IL-6, assim como quimiocinas como IL-8 e proteína quimioatraente de monócito 1 (MCP1) em vários tipos celulares (Figura 7) (Ouyang *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2010).

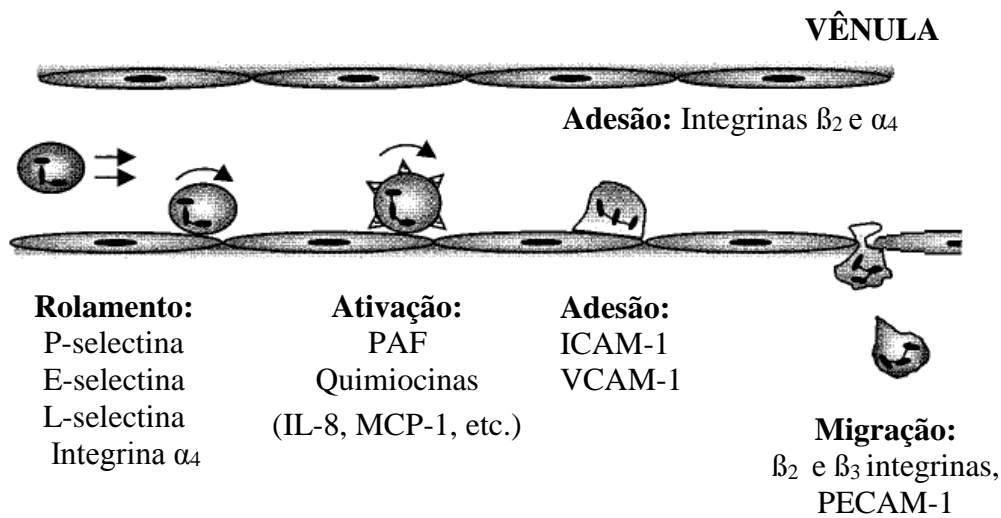


Figura 7: Etapas da cascata de interações entre leucócitos e células endoteliais. Modificado de Hickey, 2001.

1.4.2.5 Cascata de coagulação

A cascata de coagulação é ativada durante a injúria de um tecido e na infecção, processos estes que incluem uma resposta inflamatória local. Durante essa resposta, monócitos liberam citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1, os quais ativam células endoteliais a liberarem fator tecidual. É dividida em duas vias (intrínseca e extrínseca) que convergem resultando em ativação de trombina com a subsequente clivagem de fibrinogênio em fibrina (Figura 8). A ativação da cascata de coagulação é importante não apenas para a formação do coágulo, mas tem relevantes efeitos na resposta pró-inflamatória. A trombina e o

complexo fator tecidual – VIIa também podem induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α por células endoteliais e mononucleares. Portanto, a inflamação aguda causa ativação da cascata de coagulação, a qual pode potencializar a resposta inflamatória (Sherwood e Kinsky, 2004).

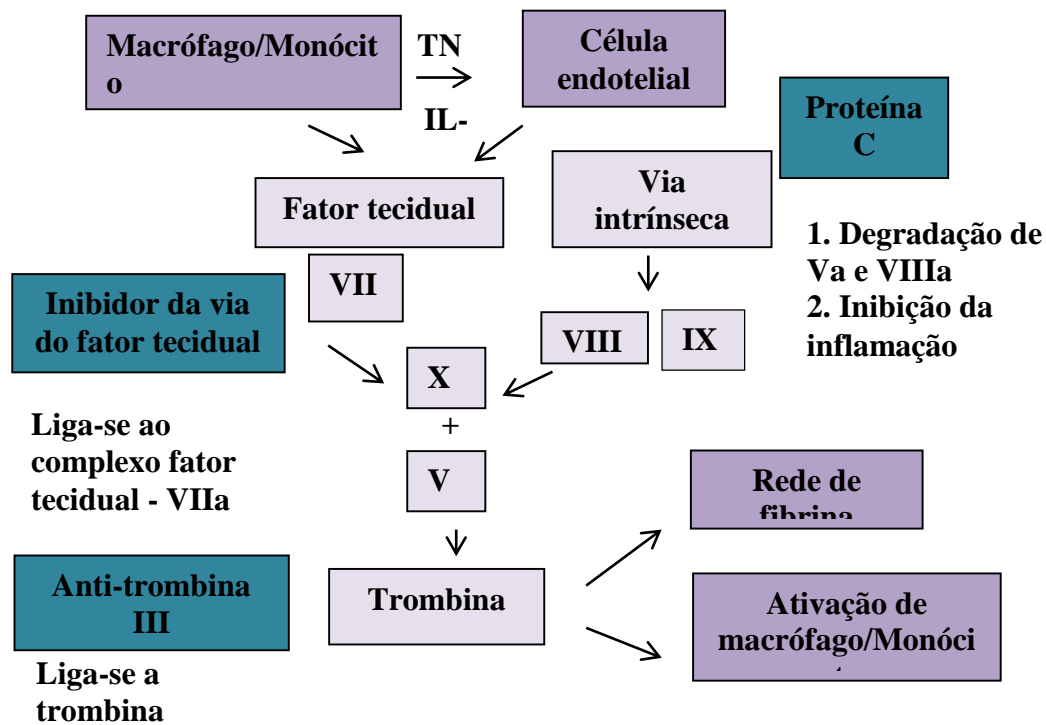


Figura 8 – Regulação da cascata de coagulação durante o processo inflamatório. Modificada de Sherwood e Kinsky, 2004.

1.4.3 Resolução do processo inflamatório

A inflamação crônica pode ocorrer pela persistência de infecção ou antígeno, recorrente injúria do tecido, ou falha de mecanismos endógenos anti-inflamatórios que direcionam a resolução da inflamação. Essencialmente, a inflamação é uma parte crítica da imunidade inata e tem função no sistema imune adaptativo, porém a inflamação crônica pode ser associada com imunossupressão (Rodríguez-Vita *et al.*, 2010).

Uma vez que os materiais iniciais nocivos são removidos via fagocitose, a reação inflamatória deve ser resolvida a fim de prevenir que a inflamação se espalhe, tornando-a crônica ou causando doenças. A resolução da inflamação é a redução ou remoção de

leucócitos e debris de sítios inflamatórios, permitindo o retorno à homeostase. A resolução de infiltrados leucocitários foi previamente considerada como um processo passivo (Serhan *et al.*, 2008).

O processo resolutivo é rapidamente iniciado após alterações agudas que biossintetizam ativamente mediadores lipídicos anti-inflamatórios e pró-resolutivos como as lipoxinas, resolvinas e protectinas, cujas estruturas encontram-se presentes na Figura 9 (Serhan *et al.*, 2008).

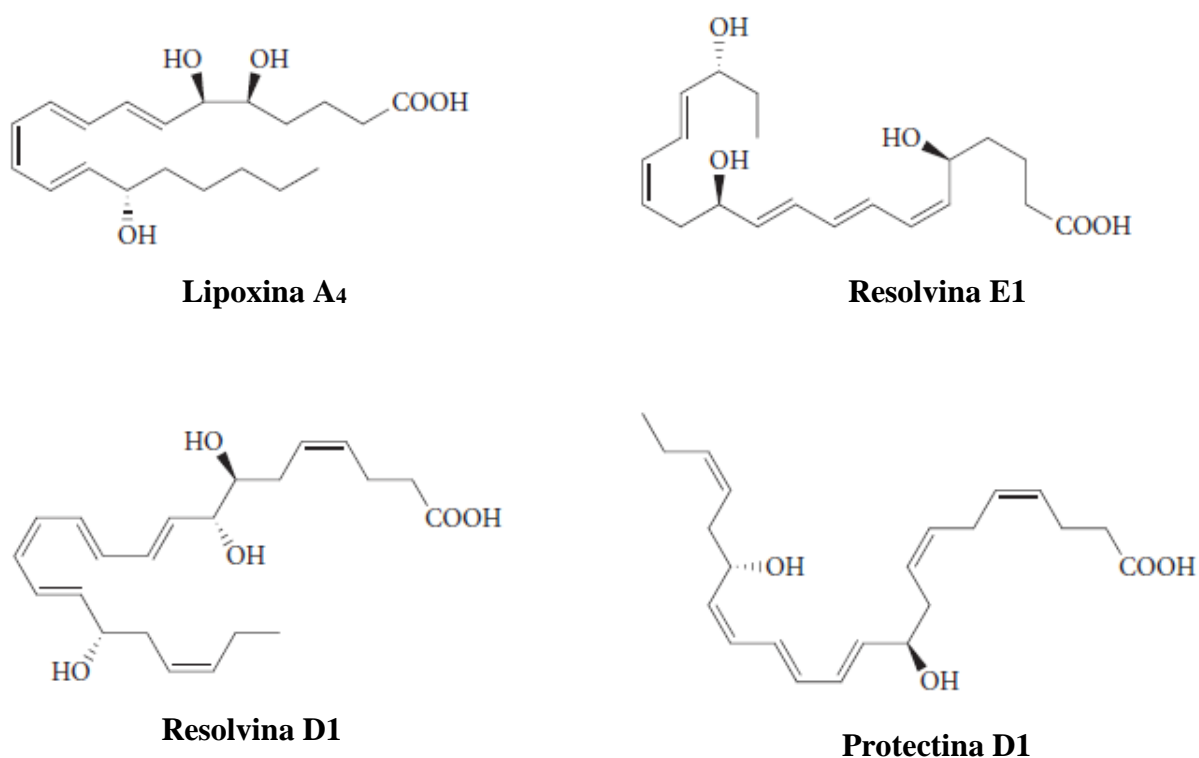


Figura 9 - Estruturas químicas de mediadores pró-resolução Lipoxina A4, resolvina E1, resolvina D1 e protectina D1 (Serhan *et al.*, 2008).

1.5 Fármacos anti-inflamatórios

Conhecidos pela humanidade há cerca de 100 anos, os compostos anti-inflamatórios não esteroides (AINES) estão entre os agentes farmacológicos mais utilizados na prática médica. Apresentam um amplo espectro de indicações terapêuticas, como: analgésico, anti-inflamatório, antipirético, e profilático contra doenças cardiovasculares (Kummer e Coelho, 2002).

AINES podem ser agrupados como salicilatos (aspirina), ácidos alcaloides (indometacina, nabumetona, sulindaco), ácidos 2-arilpropriônicos ou profenos (ibuprofeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, naproxeno), ácidos *N*-antranílicos ou ácidos fenâmicos (ácido mefenâmico, ácido meclofenâmico), derivados de pirazolidina (fenilbutazona), oxicamas (piroxicama, meloxicama), sulfonanilidas (nimesulida), e outros. Dentro do grupo, AINES são estruturalmente diversos e diferem no que se refere às suas propriedades farmacocinética e farmacodinâmica, compartilhando do mesmo modo de ação. AINES inibem a produção de prostaglandinas pelo bloqueio da enzima COX, gerando benefícios analgésicos, antipiréticos, e anti-inflamatórios, porém trazem riscos pela indução de injúria à mucosa e aumento da ferida gástrica (Flower *et al.*, 1972).

Prostaglandinas são produzidas pelo ácido araquidônico (constituente de fosfolipídios de membrana celular ou pela ativação das enzimas ciclooxigenase 1 constitutiva (COX-1) ou a induzida ciclooxigenase 2 (COX-2). A produção de prostaglandinas parece depender exclusivamente de produtos da COX-2, os quais são responsáveis pelos sintomas inflamatórios, incluindo vasodilatação, permeabilidade e sensibilização de nociceptores. Dois tipos de drogas são utilizadas para o tratamento de dores e inflamações (Ammon, 2010). AINES inibem COX, enzima chave na biossíntese de prostaglandinas. AINES seletivos (COXIBs) poupam COX-1 e inibem primariamente COX-2 (Sostres *et al.*, 2010).

Mais recentemente foi proposto que uma terceira isoforma, COX-3 poderia contribuir para a resolução do processo inflamatório (Willoughby *et al.*, 2000), tendo sido clonada e caracterizada como uma variante da COX-1 (Simmons, 2003). Entretanto, a real existência da COX-3 tem sido discutida e sua existência em humanos necessita de maior comprovação (Berenbaum, 2004).

A desvantagem do uso dos AINES é que eles apresentam importantes efeitos colaterais, por exemplo, a formação de úlceras na mucosa gástrica devido ao bloqueio da síntese de diversas prostaglandinas. Com isso, a produção de AINES seletivos para COX-2 tornou-se a solução para a obtenção de uma droga ideal, que apresente atividade antitérmica, analgésica e anti-inflamatória, sem efeitos sobre a mucosa gástrica (Vonkeman e Van de Laar, 2010).

1.6 Modelo *in vivo* de inflamação aguda – Edema de pata

O edema de pata induzido por carragenina é um modelo de inflamação aguda bem conhecido que é amplamente usado para avaliação de atividade anti-inflamatória de diferentes compostos. O modelo é dividido em duas fases: a fase inicial observada em torno de 1 h é relacionada à liberação de histamina, serotonina, bradicinina, e em menor extensão prostaglandinas; em contrapartida, a fase tardia (após 1 h) é atribuída à infiltração de leucócitos polimorfonucleares (PMN), e à contínua geração de prostaglandinas (Gilligan *et al.*, 1994)

1.7 Modelo de inflamação subaguda – Bolha de ar

O modelo de bolha de ar, ou *air pouch*, consiste na formação de uma cavidade, através da injeção de ar estéril no dorso do animal, de modo a formar uma bolha (Sedgwick *et al.*, 1985). A cavidade não inflamada é limitada por uma fina camada de fibroblastos e células do tipo macrófagos, similar a membrana sinovial normal (Edwards *et al.*, 1981; Sedgwick *et al.*, 1983). A introdução de um irritante nesta cavidade induz uma resposta inflamatória com características semelhantes à inflamação crônica observada na articulação reumatoide (Ellis *et al.*, 2000). Em curto prazo, o modelo de *air pouch* também mimetiza a resposta aguda da inflamação, caracterizada pela infiltração celular (principalmente neutrófilos) com deposição de fibrina, proliferação de tecido de granulação e de vasos sanguíneos (De Brito *et al.*, 1988).

O modelo tem vantagens consideráveis em relação a outros modelos de inflamação como promover rapidamente um exsudato inflamatório o qual permite a investigação dos efeitos da droga sobre vários aspectos do processo inflamatório. É possível mensurar alterações nos níveis do influxo de células, volume, proteína e diferentes mediadores em presença ou ausência de drogas anti-inflamatórias (Martin *et al.*, 1994).

Como existem poucos relatos quanto à espécie *Pterodon polygalaeflorus*, este trabalho procura elucidar um pouco mais sobre os aspectos fitoquímicos e farmacológicos desta espécie.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi avaliar o potencial anti-inflamatório dos frutos da espécie *Pterodon polygalaeflorus* e desenvolver estudos fitoquímicos visando identificar os componentes responsáveis por este efeito biológico.

Os objetivos específicos do estudo foram:

1. Tendo em vista resultados anteriores mostraram atividade farmacológica preponderante no ExHPp, é nosso objetivo realizar o fracionamento biomonitorado deste extrato de *Pterodon polygalaeflorus*
2. Avaliar o efeito do tratamento com o extrato e/ou fração(ões) e/ou sub-fração(ões) ativas na:
 - inflamação aguda induzida por carragenina no modelo de edema de patas em camundongos.
 - inflamação induzida por carragenina no modelo de bolha de ar, avaliando alterações bioquímicas e morfológicas.
 - migração celular de neutrófilos através de ensaios *in vivo* e *in vitro*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss Webster (SW), machos, pesando de 25 a 35 g, criados no Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro ou doados pelo Instituto Vital Brazil. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética para uso de Animais (CEA) do IBRAG, segundo protocolo 05/2009.

3.1.2 Material vegetal

Foram utilizados frutos de *Pterodon polygalaeiflorus* (sucupira branca), da família das leguminosas (Leguminosae/Fabaceae), subfamília Papilionácea (Papilionoideae/Faboideae). A identificação botânica da espécie foi confirmada por Haroldo Cavalcanti Lima, do Departamento de Botânica Sistemática do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, onde uma amostra encontra-se depositada (RB350278).

3.1.3 Equipamentos

- ✓ Agitador Magnético, modelo 257, FANEM, Brasil;
- ✓ Balança Analítica modelo AB204-5, Micronal, Brasil;
- ✓ Balança Analítica, modelo B200, Micronal, Brasil;
- ✓ Balança analítica, modelo PB 3002, Mettler Toledo, Suíça;
- ✓ Banho Histológico modelo BH05 e Dispensador de Parafina modelo Dp-01, Lupe Indústria e Comércio, Brasil;
- ✓ Banho Maria, modelo 100, FANEM Ltda., SP, Brasil;
- ✓ Banho-maria, modelo 796, De Leo & Cia Ltda., Brasil;
- ✓ Câmaras de fluxo laminar, modelo FLV, série 301, Trox do Brasil, Ltda., modelo VLFS, série FL4761, Veco, Brasil;
- ✓ Capela de exaustão, modelo 134263, Ecológica, Brasil;

- ✓ Centrifuga clínica, modelo Universal II, Hettich, Brasil;
- ✓ Centrífuga citológica microprocessada modelo 2000D, Revan Cientec, Brasil;
- ✓ Citômetros de fluxo Becton, modelo Facscalibur Dickinson & Company, e Beckman Counter, modelo Gallios, E.U.A;
- ✓ Cromatógrafo a gás, modelo Shimadzu 17A acoplado ao espectrômetro de massas, modelo Shimadzu QP 2010plus com uma energia de ionização de 70 eV, Shimadzu, Japão;
- ✓ Espectrofotômetro de Microplacas, modelo μ Quant, dotado de *software* KC4 versão 3.0 com *Power Reports*, Bio-Tek Instruments Inc., EUA;
- ✓ Espectrofotômetro UV-visível, modelo 160A, Shimadzu, Japão;
- ✓ Estufa com controle de temperatura digital, modelo 294, de Leo & Cia. Ltda., Brasil;
- ✓ Estufa de CO₂, COM-17AC, Sanyo Electric Co. LTDA, Brasil;
- ✓ Evaporador rotatório modelo 802D, Fisatom, Brasil;
- ✓ Gabinete para visualização de fluorescência (U.V. 365 nm e 254 nm) modelo BOIT-GAB01, Boitton, Pró Análise, Brasil;
- ✓ Máquina fotográfica digital, modelo DSC-H50, Sony, Brasil;
- ✓ Microcentrífuga modelo 5415C, Eppendorf, Alemanha;
- ✓ Microcentrífuga modelo Centrifuge 5418, Eppendorf, Brasil;
- ✓ Microscópio ótico com contraste de fase modelo 582.009, Leitz Wetzlar, Alemanha;
- ✓ Microscópio de campo claro, modelo CBA, Olympus, Japão;
- ✓ Microscópio invertido com contraste de fase, modelo CK2, Olympus, Japão;
- ✓ Micrótomo rotativo modelo RM2125RT, Leica Microsystems, Alemanha;
- ✓ Pletismômetro modelo 7140, Ugo-Basile, Itália;
- ✓ Potenciômetro Analyser, serie 1106/93, Brasil;
- ✓ Ultrapurificador de água, modelo Milli-Q plus, Millipore Corporation, EUA;
- ✓ Ultrassom, modelo T7, Thornton Inpec Eletrônica Ltda., Brasil;

3.1.4 Reagentes e material utilizado

- ✓ Câmara de Neubauer, Boeco, Alemanha;
- ✓ Cassetes 210 x 297 mm (Kajocopy);

- ✓ Insetos (*transwell*) para placas de cultura de 24 poços, de 3 micrômetros, placas de cultura de 24 poços e de 96 poços, estéreis, Falcon, Becton Dickinson Labware, EUA;
- ✓ Kit Panótico rápido LB, Laborclin Ltda., Brasil;
- ✓ DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco), Soro fetal bovino, Gibco.
- ✓ laca de cromatografia de sílica gel 60 20x20 cm, Macherey-Nagel, Alemanha;
- ✓ Seringas de insulina BD Ultra Fine U-100 de 0,5 mL, seringas de plástico de 1 mL e agulhas estéreis 0,3 x 30 mm, B-D Plastipak, Becton Dickinson & Company, EUA;
- ✓ N-hexano 95%, Acetato de etila, Etanol 100%, Diclorometano, grau HPLC, Tedia, Brasil;
- ✓ Parafina purificada (P.F. 56°C – 58°C), Proquímios, Brasil;
- ✓ Sonda orogástrica de aço inoxidável, para camundongos IC800, Insight, Brasil;
- ✓ Sílica gel 60 para cromatografia em coluna (0,2 a 0,5 mm e 0,063 a 0,200 mm), Hexano, qualidade Omnisolv, Placa para TLC (20x20 cm) de sílica Art 7733 Kieselgel 60 Korngrö Be 0,2-0,5 mm (35-70 mesh ASTM), Merck S.A., Brasil;
- ✓ Tween 20 (monolaurato de polioxietileno 20 sorbitano), Indometacina, Carragenina lambda tipo IV, Soro albumina bovina, Sigma Chemical Company, EUA;
- ✓ Outros reagentes foram utilizados, sendo a qualidade também de grau analítico.

3.2 Metodologia

3.2.1 Análise Fitoquímica

3.2.1.1 Obtenção do extrato hexânico de *Pterodon polygalaeiflorus*

Os frutos de *Pterodon polygalaeiflorus* foram lavados em água destilada corrente e secos a temperatura ambiente. Em seguida, 900 g dos frutos foram pulverizados em nitrogênio líquido em um graal de metal, sendo o produto transferido, com auxílio de uma espátula, para um cartucho de papel de filtro previamente pesado, determinando assim a massa do material pulverizado. O material vegetal foi submetido à maceração em hexano 100% (10 vol/g semente) por 15 dias, à temperatura ambiente, em vidro de cor âmbar protegido da luz.

Após este período, o cartucho foi retirado do vidro, deixando-se a solução resultante da maceração escoar completamente através de papel filtro. O cartucho foi descartado e a

solução extraída foi transferida para um balão de fundo redondo, previamente pesado (P1), e o solvente foi evaporado em evaporador rotativo. Após a completa evaporação do solvente, o balão foi novamente pesado (P2). O peso do material extraído dos frutos pelo hexano correspondeu à diferença entre P2 e P1. Este extrato bruto foi denominado de extrato hexânico de *Pterodon polygalaeflorus* (ExHPpg). Obteve-se um rendimento de 35,15% ou 316,35 g.

3.2.1.2 Fracionamento preparativo do ExHPpg

O ExHPpg foi fracionado por cromatografia de adsorção em sílica gel 60 (0,2-0,5 mm) equilibrada em hexano 95% em uma coluna de vidro com 2,5 cm de diâmetro, até uma altura de 42 cm (206 mL de sílica). A coluna permaneceu em n-hexano por pelo menos 24 h antes do início do fracionamento. Foram aplicados 60 g de ExHPpg no topo da coluna de sílica. O processo de eluição foi isocrático, utilizando sequencialmente: 2 L hexano (95%); 1 L hexano/acetato de etila (8:2 v/v); 1,5 L hexano/acetato de etila (7:3 v/v); 1 L etanol 100%, obtendo-se assim quatro frações. Cada fração foi transferida para um balão de fundo redondo, previamente pesado e o solvente foi evaporado utilizando o evaporador rotativo. Após a completa evaporação do solvente, o balão foi pesado novamente para o cálculo do rendimento. As frações assim obtidas foram denominadas Fr1Ppg, Fr2Ppg, Fr3Ppg e Fr4Ppg. O procedimento foi repetido quatro vezes a fim de se obter massa suficiente para as etapas posteriores.

3.2.1.3 Sub-fracionamento preparativo da fração mais ativa do ExHPpg

A fração mais ativa (Fr2Ppg) foi sub-fracionada por cromatografia de adsorção, utilizando-se uma coluna de vidro de 51 cm de altura por 3,5 cm de diâmetro. Foram aplicados 10 g da fração na proporção de 1:20 (v/v) de sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm). As proporções (v/v) de solventes e volumes utilizados no sistema sequencial de eluição foram: 1,5 L hexano 100%; 1 L acetato de etila /hexano 1:99; 1 L acetato de etila /hexano 2:98; 1 L acetato de etila /hexano 5:95; 1 L acetato de etila /hexano 10:90; 1 L acetato de etila /hexano 20:80; 1 L acetato de etila /hexano 30:70; 1 L etanol 100%. O material eluído foi coletado separadamente a cada 500 mL. Cada eluato foi transferido para um balão de fundo redondo, previamente pesado e o solvente foi evaporado utilizando o evaporador rotativo. As amostras eluídas foram reunidas em função da semelhança do perfil das bandas visualizadas na

cromatografia de camada delgada, fornecendo um total de cinco sub-frações. Após a completa evaporação do solvente, o balão foi pesado novamente para o cálculo do rendimento. As frações assim obtidas foram denominadas SF2.1, SF2.2, SF2.3, SF2.3 e SF2.5. O procedimento foi repetido duas vezes a fim de se obter massa suficiente para as etapas posteriores.

3.2.1.4 Cromatografia em camada delgada (TLC)

A TLC foi utilizada para análise dos perfis das amostras coletadas durante o fracionamento e sub-fracionamento, para posterior reunião e formação das respectivas frações e sub-frações. As amostras (10 mg/mL, em etanol 100%) foram aplicadas a 1 cm da origem, com auxílio de um aplicador, em placa de sílica gel 60. Após a aplicação, as amostras foram colocadas em uma cuba vertical, contendo 10 mL da fase móvel: diclorometano (DCM) e acetato de etila (AcOEt) na proporção de 9:1 (v/v), para o desenvolvimento da corrida cromatográfica. Posteriormente, a placa foi retirada da cuba e deixada à temperatura ambiente para secar. A revelação para terpenoides foi realizada como descrito por Wagner e Bladt, (1995). O ácido sulfúrico (1% em etanol) foi borrifado na placa por inteiro, e após secagem a temperatura ambiente, a placa foi aspergida com vanilina (1% em etanol). Após secar a placa foi levada à estufa a 100°C, onde permaneceu por no máximo 3 minutos para revelação do teste. Os resultados foram mostrados através de fotografias das respectivas placas.

3.2.1.5 Cromatografia por fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS)

As amostras foram solubilizadas em metanol. Foi injetado 1 µL/g de amostra em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS) utilizando uma coluna RTX-SMS (30 m x 0,25 mm) e nitrogênio como gás carreador. As temperaturas do injetor e detector foram 200 e 290°C, respectivamente. A programação gradiente de temperatura utilizada foi de 100°C até 300°C com incremento de 7°C/min.

3.2.2 Estudos *in vivo*

3.2.2.1 Modelo de edema de pata e tratamento dos animais

Este modelo foi desenvolvido baseado no método descrito por Winter e colaboradores (1962). Camundongos SW, com peso entre 30-35 g (n=5/grupo), foram tratados i.p. com as doses das quatro frações isoladas do extrato hexânico de *Pterodon polygalaeiflorus* (EHxPpg), indometacina (10 mg/kg). O grupo controle (grupo Carragenina) recebeu por via intraperitoneal (i.p.) o veículo de diluição das frações (etanol 15% contendo 1,25% Tween 20). Os volumes das patas foram medidos no pletismômetro e uma hora após o tratamento, os animais receberam na pata traseira direita injeção subplantar de 50 µL de carragenina (6 mg/mL). Os volumes das patas foram também determinados em 1 h, 2 h, 3 h e até 4 h horas após a indução do edema. Após este procedimento os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Para cálculo do índice de edema foi utilizada fórmula a seguir, onde t₀ = volume de pata antes da injeção de carragenina e t_x = volume da pata nos diferentes tempos avaliados.

$$\text{Índice de edema (\%)} = (\text{valor edema } t_x \times 100 / \text{valor edema } t_0) - 100$$

3.2.2.2 Modelo de bolha de ar (*air pouch*) e tratamento dos animais

Este modelo de inflamação aguda foi desenvolvido segundo o método descrito por Selye (1953). Este consistiu na indução da formação de uma cavidade (bolha de ar) na região dorsal do camundongo no dia zero do experimento, através da injeção subcutânea de 5 mL de ar estéril nesta região. No terceiro dia do experimento, a cavidade formada recebeu mais 3 mL de ar estéril para manutenção da bolha. No sexto dia do experimento, diferentes grupos de animais (n = 5/grupo) foram tratados por via oral (v.o.), com o veículo de preparação das amostras (etanol 15% com 1,25%, Tween-20), considerado o controle positivo de inflamação; ou com indometacina 10 mg/kg (droga anti-inflamatória controle, v.o.); ou com as diferentes doses dos extratos/frações (0,02 mg/kg e 0,2 mg/kg, v.o.). Após 1 h deste tratamento, a resposta inflamatória foi induzida por injeção de 1 mL de carragenina (1%) na cavidade formada (bolha de ar), e em um grupo controle (grupo salina) foi injetado apenas 1 mL salina fisiológica (NaCl 0,9%). Decorridas quatro horas para o desenvolvimento do processo inflamatório (correspondentes a cinco horas após os tratamentos), os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, a cavidade da bolha foi lavada com NaCl 0,9% (1 mL)

contendo EDTA 2 mM, o exsudato inflamatório foi coletado para análise de parâmetros como volume, contagens total e diferencial de células e teor proteico. Uma região do tecido do dorso com tamanho padronizado foi removida para análise macroscópica e histológica, quanto à vasodilatação e infiltrado inflamatório

3.2.2.3 Análise estatística

Os resultados ($n = 5/\text{grupo}$) representaram a média \pm DP de dois e três experimentos independentes (Modelos edema de pata e bolha de ar, respectivamente) e foram expressos através do índice de edema. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA seguido do pós-teste de Dunnett's ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$), em relação ao grupo controle com carragenina.

3.2.2.4 Análises realizadas no exsudato

O volume do exsudato foi mensurado para determinação da concentração de proteínas e contagem total e diferencial de leucócitos. O volume foi mensurado usando-se um tubo graduado. Alíquotas de exsudato foram diluídas (1:20 ou 1:40 v/v) com solução de violeta genciana 0,01% em NaCl 0,9% e colocadas em câmara de Neubauer para contagem dos leucócitos totais em microscopia de luz, levando-se em conta o volume de exsudato colhido. Uma alíquota de cada exsudato (200 μL) contendo 1×10^6 células diluída em PBS (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, pH 7,4), foi citocentrifugada (28 x g) por 5 min em lâminas de microscópio e a contagem diferencial dos leucócitos foi realizada com Panótico rápido, conforme descrito pelo fabricante.

A dosagem do conteúdo total de proteínas do exsudato foi realizada pelo método do Biureto (Gornall *et al.*, 1949), onde 50 μL de cada amostra de exsudato foram adicionadas a 700 μL de biureto, sendo então homogeneizadas em agitador do tipo Vortex. Após 30 minutos a temperatura ambiente, as amostras foram então plaqueadas (350 $\mu\text{L}/\text{poço}$, placa de 96 poços, em duplicatas) e levadas ao leitor de microplacas para leitura da absorvância a 570 nm. A curva padrão foi construída utilizando-se albumina bovina (BSA) em concentrações compreendidas entre 0,5 e 16 mg/mL. Para obtenção do conteúdo total de proteínas no exsudato, os valores de concentração obtidos nas dosagens foram corrigidos para o volume total de exsudato coletado.

3.2.2.5 Processamento histológico

Após a eutanásia, as regiões da bolha de ar foram colocadas e seccionadas na região central (cerca de 1 x 1 cm), colocadas em cassete histológico e fixados em 15 mL de formol tamponado 10% (tampão fosfato de Na 10 mM pH 7,4) por sete dias. Após esse tempo, as peças foram lavadas em água corrente por pelo menos 30 min. Iniciou-se, então, o processo de desidratação sequencial em banhos contendo 70%, 90% e 100% de etanol, durante uma hora cada, sendo finalmente repetido o banho em 100% de etanol durante 1 h.

A seguir, foi realizado o processo de diafanização, que consiste na clarificação das peças em xilol. O material foi mergulhado sequencialmente em dois banhos contendo xilol (10 mL), permanecendo neles em torno de 40 min cada. Para a inclusão as peças foram deixadas em banho de parafina durante 1 h a 56°C e depois transferidas para outro banho de parafina por mais 1 h a 56°C. O material foi então emblocado e resfriado para manter os blocos firmes. Posteriormente, os blocos foram cortados em micrótomo rotativo, com 5 µm de espessura. As lâminas contendo o material foram coradas por Hematoxilina-Eosina (HE) e analisadas em microscopia de luz, sendo fotografadas posteriormente. Os procedimentos para análise histológica foram realizados segundo Gartner e Hiatt (1999).

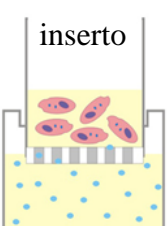
3.2.3 Estudo *in vitro* de migração celular

3.2.3.1 Ensaio de migração de neutrófilos em *transwell*

Os neutrófilos utilizados neste ensaio foram obtidos a partir de exsudato de bolha induzida com 1 mL de carragenina 1% em camundongos não tratados, conforme descrito no item 3.2.5. Para estimular a migração *in vitro* dos neutrófilos utilizou-se o exsudato obtido a partir do modelo da bolha de ar, descrito anteriormente (item 3.2.2.2), proveniente de animais submetidos apenas à injeção de carragenina 1% na cavidade dorsal. Os exsudatos foram coletados no dia do ensaio em tubos do tipo Falcon, centrifugados (1000 x g) e os sobrenadantes foram recolhidos e reunidos para a utilização no experimento como quimioatraente. As células sedimentadas foram suspensas em meio completo, contadas em câmara de Neubauer e diluídas a $2,5 \times 10^6$ células/mL. O ensaio de migração *in vitro* foi realizado em placa de 24 poços montada da seguinte forma: na parte inferior da placa foram colocados 600 µL de meio completo (DMEM com 10% soro fetal bovino (SFB)) com ou sem quimioatraente (sobrenadante de exsudato coletado 4 h após injeção de carragenina estéril na

cavidade da bolha) diluído 10 vezes (diluição final) com meio completo. A condição de cultura que não usou o exsudato como quimioatraente foi considerada como controle negativo de migração. Todas as outras condições de cultura estudadas receberam exsudato com quimioatraente. O inserto de *transwell* foi colocado na placa ao qual foram adicionados 200 μL de meio completo contendo 5×10^5 células e meio, ou etanol ou a fração de interesse (30, 80, 100 ou 120 $\mu\text{g/mL}$) ou a droga padrão (indometacina 3 mg/mL). Todas as doses da Fr2Ppg foram solubilizadas em etanol 15% e diluídas em meio completo (concentração final de 0,9% de etanol). Desta forma, foi feito um controle do efeito do etanol, contendo meio completo com esta concentração final de etanol (0,9%), com ou sem quimioatraente, para avaliar sua influência no ensaio. Depois de montada a placa, esta foi levada à estufa (37°C e 5% de CO_2) e submetida à incubação por 1 h. Transcorrido o tempo de incubação, as suspensões celulares da parte superior e inferior do *transwell* foram respectivamente recolhidas, lavadas com 200 μL de PBS contendo 5% SFB, centrifugadas e suspensas em 400 μL de PBS. A avaliação da migração foi feita por análise em citômetro de fluxo. A seguir está representado o ensaio utilizando o sistema de *transwell*.

Esquema representativo do ensaio em placa com insertos de *transwell*



	Ctr neg	Ctr EtOH	Ctr pos	Ctr pos c/EtOH	Indo	Fr2 Ppg
neutrófilos	+	+	+	+	+	+
EtOH	-	+	-	+	+	+
Amostras	-	-	-	-	+	+
Sobrenadante exsudato	-	-	+	+	+	+

3.2.3.2 Análise da migração de neutrófilos por Citometria de Fluxo

O citômetro de fluxo apresenta como indicadores os desvios frontal (*Forward scatter* ou FSC) e lateral (*Side scatter* ou SSC), além de sinais de fluorescência. Os resultados foram obtidos a partir da determinação do número de eventos detectados pelo citômetro na passagem das suspensões celulares durante um período de 60 segundos. O número de eventos foi determinado nas suspensões celulares coletadas tanto da parte inferior quanto superior do *transwell* de cada condição de cultura. Os dados foram analisados usando o software “Summit versão 4.3”. O cálculo de percentual de migração foi obtido a partir da fórmula:

$$\% \text{ Migração} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de eventos na parte inferior do } \textit{transwell}}{\Sigma \text{ dos eventos das partes inferior e superior do } \textit{transwell}} \times 100$$

4. RESULTADOS

4.1 Preparo do Extrato Hexânico de *Pterodon polygalaeflorus* (ExHPpg)

A extração com hexano 100% a partir de 900 g dos frutos de *Pterodon polygalaeflorus* (ExHPPg) apresentou rendimento de 316,35 g de óleo ou 35,15% (p/p).

4.2 Fracionamento do ExHPpg

O fracionamento de 60 g de ExHPpg em coluna aberta de sílica gel com eluição por gradiente descontínuo (hexano 95% - 2 L; hexano/acetato de etila (8:2 v/v) -1 L; hexano/acetato de etila (7:3 v/v) -1,5 L; etanol 100% (1 L) forneceu uma recuperação total de 48,88 g ou 83,5%. Foram obtidas quatro frações, cujos rendimentos estão apresentados na Tabela 1. As frações Fr2Ppg e Fr4Ppg foram as que apresentaram maior rendimento.

Tabela 1 – Massa e rendimento do fracionamento do ExHPpg em coluna de sílica gel.

Fração \ Dados	Fr1Ppg	Fr2Ppg	Fr3Ppg	Fr4Ppg
Massa	3,12 g	14,15 g	9,18 g	22,43 g
Rendimento	5,2%	25,6%	15,3%	37,4%

4.2.1 Perfil cromatográfico do ExHPpg e suas frações Fr1Ppg a Fr4Ppg por TLC

O perfil cromatográfico do extrato hexânico de *Pterodon polygalaeflorus* e suas frações, obtido pela revelação da placa de cromatografia em camada delgada (TLC) para terpenoides, está representado na Figura 10. O ExHPpg apresentou distribuição das bandas em toda a extensão da corrida cromatográfica, assim como a fração Fr3Ppg, que foi a de maior diversidade. As frações Fr1Ppg e Fr2Ppg exibiram pouca quantidade de compostos revelados para terpenoides e com características mais apolares. Em contrapartida, pode-se observar uma maior quantidade de bandas reveladas na fração Fr4Ppg em relação às frações Fr1Ppg e Fr2Ppg, com predominância de bandas majoritárias na região mais polar (mais próximas ao ponto de aplicação da amostra).

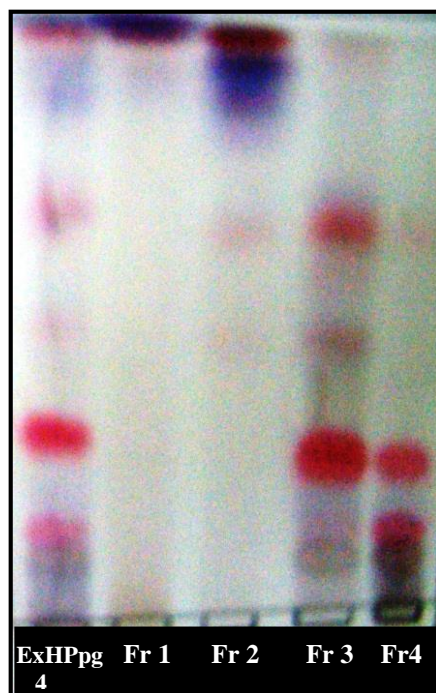


Figura 10 – Perfil cromatográfico do ExHPpg e suas frações por TLC. Foi utilizada placa de TLC de Sílica gel 60 de 10 x 20 cm. A cromatografia foi desenvolvida em DCM:AcOEt (9:1 v/v) e revelada para terpenoides com ácido sulfúrico 1% e vanilina 1%.

4.2.2 Perfil cromatográfico das frações FR1 a FR4 do ExHPpg por CG-MS

Os cromatogramas das frações do ExHPpg, obtidos por cromatografia de fase gasosa acoplado a espectrômetro de massas, estão representados na Figura 11. A Fr1Ppg apresentou predominância de picos em uma região inicial do cromatograma, com tempos de retenção entre 6,5 e 11 min, indicando maior apolaridade das substâncias ali presentes. Esta fração apresentou dois picos majoritários (maior intensidade) com tempos de retenção de 7,113 e 10,365 minutos. A Fr2Ppg apresentou picos de menor intensidade em relação à Fr1Ppg na região com TR entre 7,5 a 11,0 minutos, com um pico majoritário com tempo de retenção de 10,355 minutos, apresentando os demais picos, distribuídos ao longo do cromatogramas, média intensidade. Em contrapartida as frações Fr3Ppg e Fr4Ppg exibiram predominância de picos numa região mais polar do cromatograma, com tempos de retenção (TR) entre 20 e 28 min. A Fr3Ppg apresentou três picos majoritários com TR = 20,613, TR = 27,35 e TR = 27,707, enquanto a Fr4Ppg, cinco picos principais de TR = 21,305, TR = 26,505, TR = 26,819, TR = 27,331 e TR = 27,677.

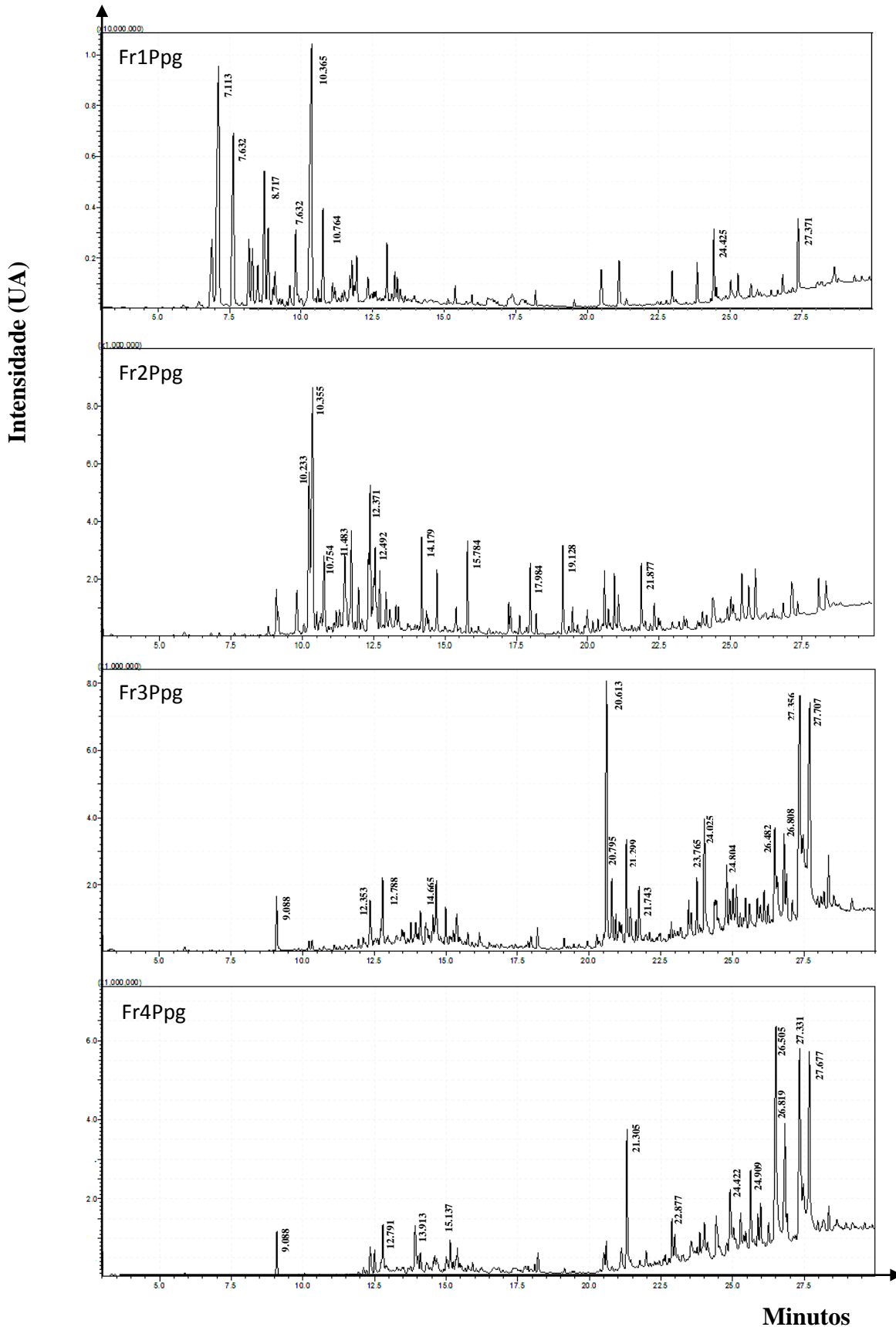


Figura 11 - Perfis cromatográficos obtidas por CG-MS das frações originadas do ExHPpg. As temperaturas do injetor e detector foram 220 e 290°C, respectivamente. A programação de temperatura utilizada foi de 100°C até 300°C com gradiente de 7°C/minuto. Foi aplicado 1 µL de cada amostra solubilizada em metanol.

4.3 Efeito anti-inflamatório do ExPpg e suas frações

4.3.1 Efeito anti-inflamatório agudo no modelo de edema de patas induzido por carragenina

Estudos anteriores demonstraram (Vigliano, 2010) que o tratamento de camundongos com ExHPpg nas doses 0,02 e 0,2 mg/kg foi capaz de inibir em 81,3% e 64,1%, respectivamente, o edema de patas induzido pela carragenina no pico de três horas (Figura 12). Desta forma, as quatro frações obtidas no fracionamento do ExHPpg foram inicialmente testadas neste modelo, utilizando estas mesmas doses, para fins de comparação (Figura 13). A Fr1Ppg produziu uma redução significativa ($p < 0,001$) do edema a partir de 2 h da indução, com inibição de 81% no pico de edema em 3 h na dose 0,02 mg/kg e de 91% na dose 0,2 mg/kg quando comparado ao controle com carragenina tratado apenas com o veículo. O tratamento com a Fr2Ppg reduziu o índice de edema em 83,5% e 74,4%, para as doses 0,02 e 0,2 mg/kg (3 h), sendo a menor dose já ativa a partir da primeira hora de medição do edema. A fração Fr3Ppg não exibiu efeito anti-inflamatório significativo no pico de edema do experimento em 2 h, apresentando, entretanto, redução de 81,3% (0,02 mg/kg) e 64,1% (0,2 mg/kg) no tempo de 3 h após indução do edema. A fração Fr4Ppg não exibiu efeito anti-inflamatório significativo.

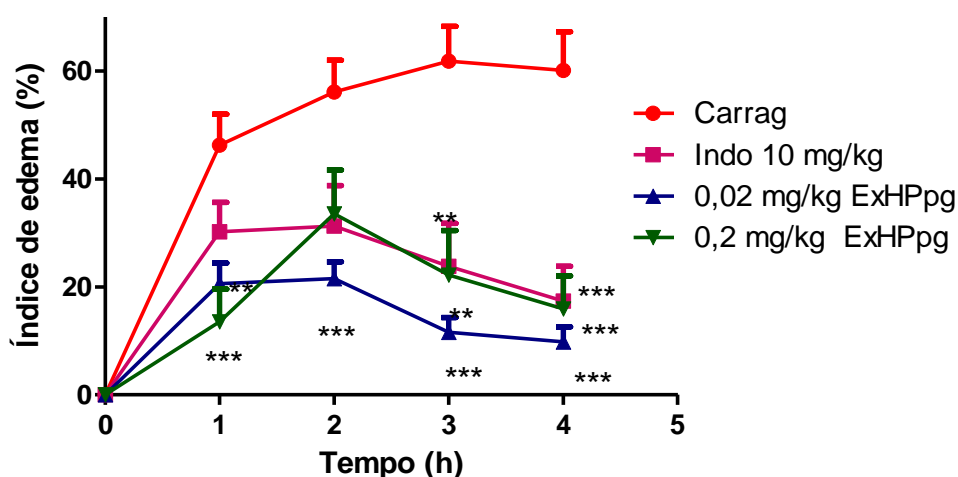


Figura 12 - Efeito do tratamento com diferentes doses do extrato hexânico de *Pterodon polygalaeiflorus* no edema de patas induzido por carragenina. Todos os grupos receberam 50 μ L carragenina (6 mg/mL) na pata. O grupo carragenina foi tratado i.p. com o veículo de diluição das amostras. Os resultados ($n = 5$ camundongos SW/grupo) representam a média \pm DP de três experimentos independentes e estão expressos através do índice de edema. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA seguido do pós-teste de Dunnett's (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) em relação ao grupo controle com carragenina (Vigliano, 2010).

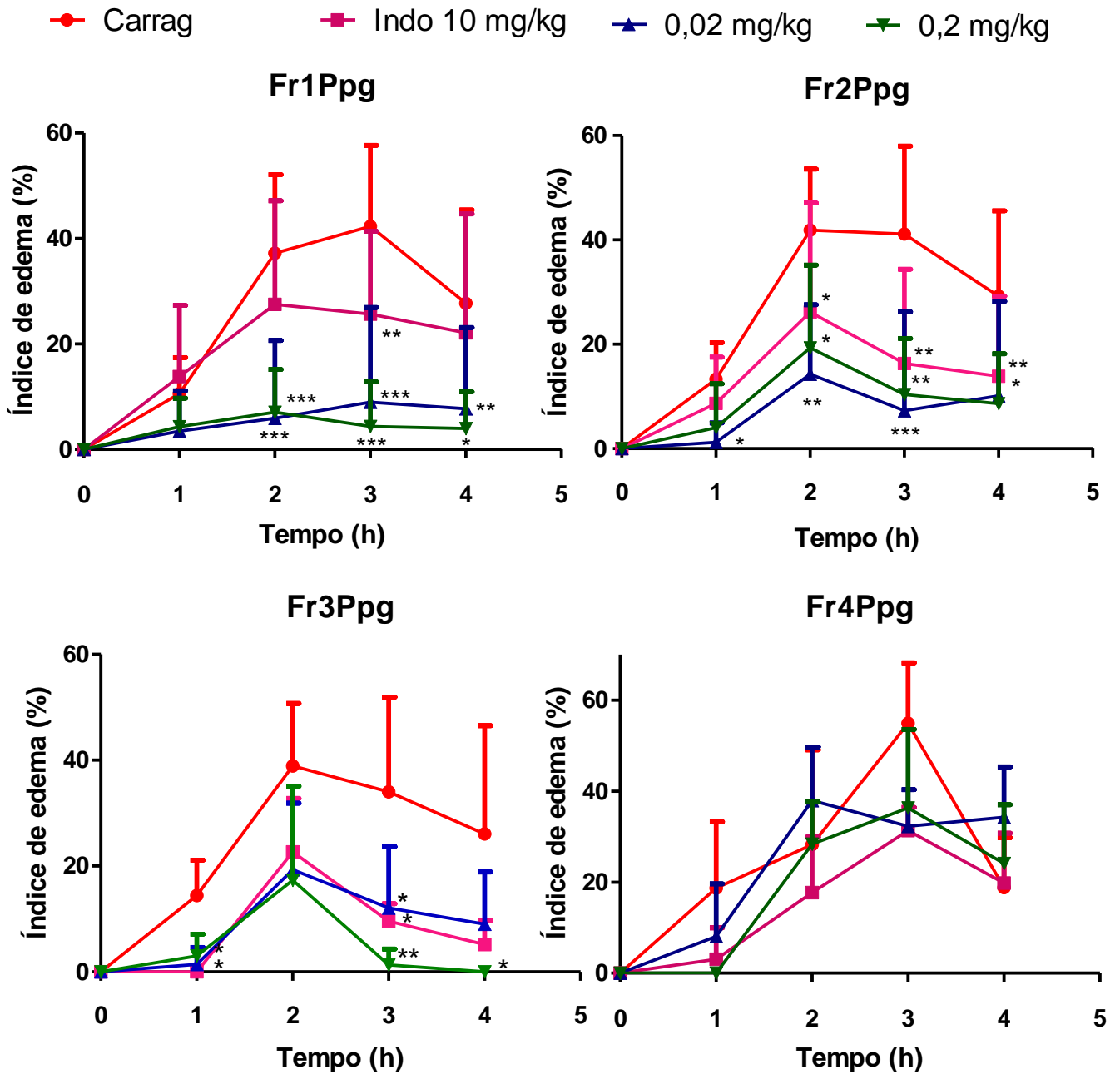


Figura 13 - Efeito do tratamento com diferentes doses das frações Fr1Ppg, Fr2Ppg, Fr3Ppg e Fr4Ppg no edema de patas induzido por carragenina. Todos os grupos receberam 50 μ L carragenina (6 mg/mL) na pata. O grupo carragenina foi tratado i.p. com o veículo de diluição das amostras. Os resultados ($n = 5$ /grupo) representam a média \pm DP de dois experimentos independentes e estão expressos através do índice de edema. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA seguido do pós-teste de Dunnett's (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$), em relação ao grupo controle com carragenina

4.3.2. Efeito anti-inflamatório agudo no modelo de bolha de ar

A partir do *screening* biológico apresentado no item 4.3.1, e dando seguimento aos objetivos desse trabalho, priorizou-se prosseguir o estudo com a fração Fr2Ppg, que teve bom rendimento no fracionamento e foi ativa no modelo de edema de pata induzido pela carragenina, comparando-a com a atividade do extrato bruto ExHPpg.

4.3.2.1 Efeito anti-inflamatório agudo do ExHPpg

4.3.2.1.1 *Contagens total e diferencial de leucócitos no exsudato do ExHPpg*

A injeção de carragenina 1% na cavidade dorsal formada previamente (bolha), leva ao acúmulo de células inflamatórias. O processo inflamatório foi desencadeado satisfatoriamente, visto que a contagem total de células do grupo que foi injetado apenas com carragenina 1% (carrag) e tratado (v.o.) com o veículo de diluição do extrato (etanol 15% 1,25% Tween-20) apresentou um total de células de 30 milhões no exsudato (Figura 14A). Em contrapartida, o grupo que recebeu apenas injeção de NaCl 0,9% estéril na cavidade da bolha (salina) apresentou baixo número de células no exsudato, com média de 0,64 milhões. Como esperado, o tratamento oral com a indometacina, droga padrão utilizada, inibiu a inflamação em 76,7%, em relação ao grupo carragenina, apresentando um número total de 7,5 milhões de células no exsudato. O tratamento com as doses de ExHPpg 0,02 e 0,2 mg/kg foi capaz de inibir significativamente o número total de leucócitos, apresentando 8,82 e 11,12 milhões de células no exsudato, com inibição de 70,6% e 62,94%, respectivamente (Figura 14A). A contagem diferencial de células foi realizada para identificar possíveis alterações do nível dos diferentes tipos celulares presentes no exsudato inflamatório. Ao analisar os resultados dos grupos tratados com indometacina ou com ExHPpg, observou-se que o número de macrófagos, linfócitos e eosinófilos não se alteraram em relação ao grupo controle com carragenina (dados não mostrados). Desta forma, optamos por apresentar apenas os resultados das contagem de neutrófilos (Figura 14B). O número absoluto de neutrófilos do exsudato do grupo controle, que recebeu carragenina na cavidade e tratamento com o veículo, foi de 20,37 milhões, o que correspondeu a um aumento de 96,52% em relação ao grupo que recebeu injeção de salina na cavidade (0,71 milhões de células). O tratamento com indometacina também foi eficiente reduzindo a inflamação em 58,7% (8,4 milhões de células), em relação ao grupo que recebeu o veículo. O tratamento com o ExHPpg resultou em inibição de 76,8% (4,7 milhões de células) e 49,8% (10,2 milhões de células), para 0,02 e 0,2 mg/kg, respectivamente (Figura 14B).

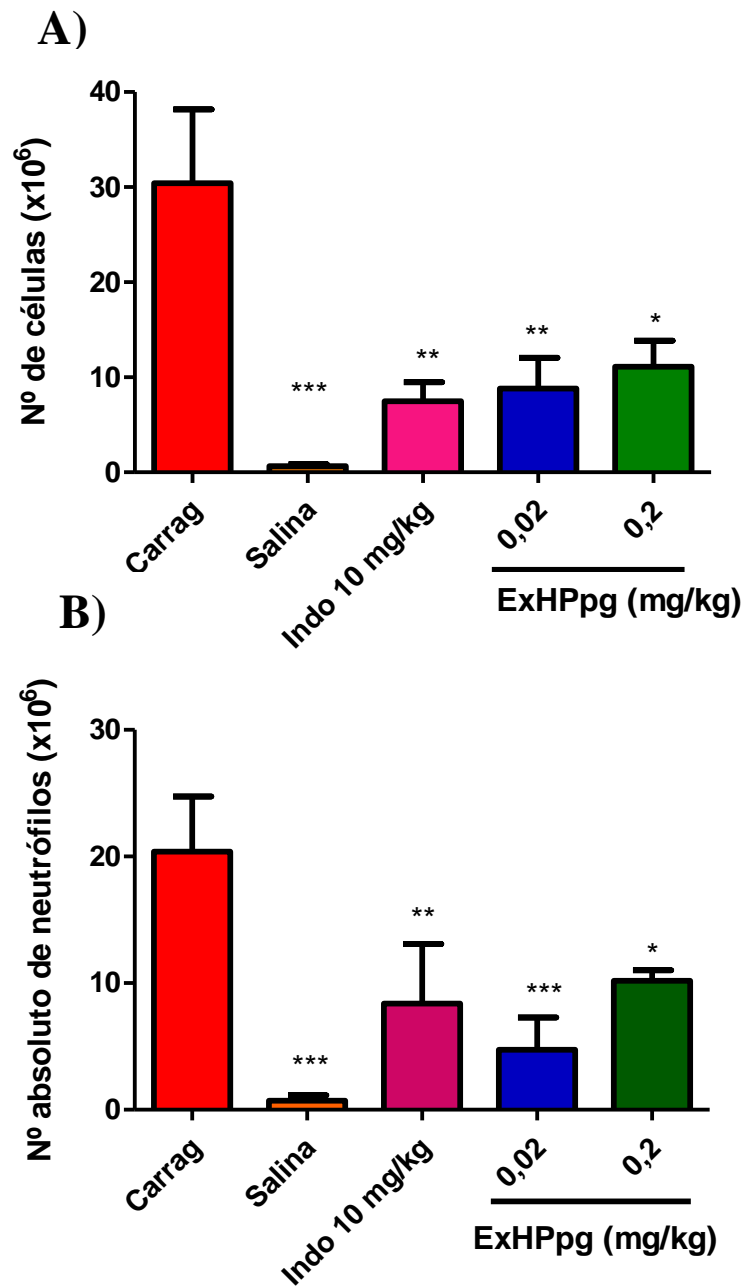


Figura 14 - Avaliação da atividade do ExHPpg sobre o número de leucócitos totais (A) e número absoluto de neutrófilos (B) do exsudato no modelo *air pouch*. A inflamação foi induzida por injeção de carragenina 1% na bolha. Camundongos SW ($n = 5/\text{grupo}$). Os animais foram tratados (v.o.) com o veículo (Carrag), Indometacina (Indo) ou com as doses do extrato 1 h antes da injeção de carragenina. Um grupo controle recebeu apenas salina na cavidade da bolha (salina). Os resultados expressam média \pm DP de três experimentos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle com carragenina tratado com o veículo (teste ANOVA seguido de Dunnett).

4.3.2.1.2 Dosagem do conteúdo total de proteína no exsudato da bolha do ExHPpg

A injeção de carragenina neste modelo é capaz de induzir inflamação local com extravasamento de líquido do plasma, rico em proteínas. Realizou-se assim a dosagem de proteínas através do método do biureto, a fim de observar possíveis alterações dos níveis proteicos, no exsudato de animais tratados com o ExHPpg (Figura 15).

Pode-se observar que houve aumento significativo do nível de proteínas do exsudato nos animais inoculados com carragenina e tratados com o veículo (6,91 mg de proteína/mL) se comparado com animais normais inoculados apenas com salina (0,6 mg de proteína/mL). Em animais tratados com indometacina ou com a dose 0,02 mg/kg de ExHPpg (0,02 e 0,2 mg/kg), observou-se inibições de 76,9% e 61,5%, respectivamente. O nível de proteína observado no grupo tratado com a maior dose de ExHPpg (0,2 mg/kg) foi 31,3% maior ($p < 0,01$) do que a encontrada no grupo tratado com o veículo (Figura 15).

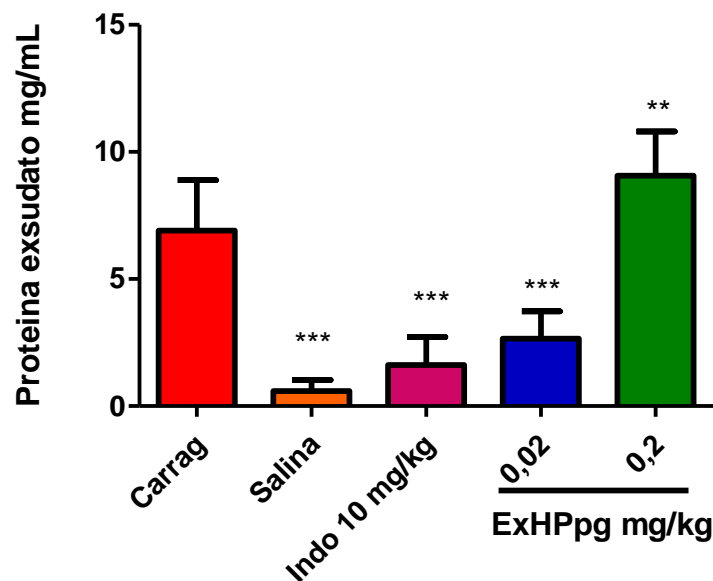


Figura 15 - Avaliação da atividade do ExHPpg sobre o nível de proteína total no exsudato da bolha. A inflamação foi induzida por injeção de carragenina 1% na bolha. Camundongos SW ($n = 5$ /grupo). Os animais foram tratados (v.o.) com o veículo (Carrag), Indometacina (Indo) ou com as doses do extrato. Um grupo controle recebeu apenas salina na cavidade da bolha (salina). Os resultados expressam média \pm DP de dois experimentos. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle com carragenina tratado com o veículo (teste ANOVA seguido de Dunnett).

4.3.2.1.3 Análise macroscópica das alterações morfológicas no tecido da bolha do ExHPpg

Os tecidos das bolhas foram removidos e possíveis alterações vasculares e teciduais induzidas pelos tratamentos foram avaliadas através da análise das imagens fotográficas (Figura 16). É possível visualizar sinais como vermelhidão, vasodilatação e possivelmente formação de novos vasos nos tecidos das bolhas de animais inoculados com carragenina e tratados v.o. com o veículo (Figura 16A), o que não foi visualizado em animais do grupo salina (Figura 16C) ou naqueles inoculados com carragenina e tratados com a droga padrão indometacina (Figura 16B). Os animais tratados com as doses do ExHPpg (0,02 e 0,2 mg/kg) (Figuras 16D e 16E) mostram redução visível da vasodilatação e a menor dose também reduz a vermelhidão.

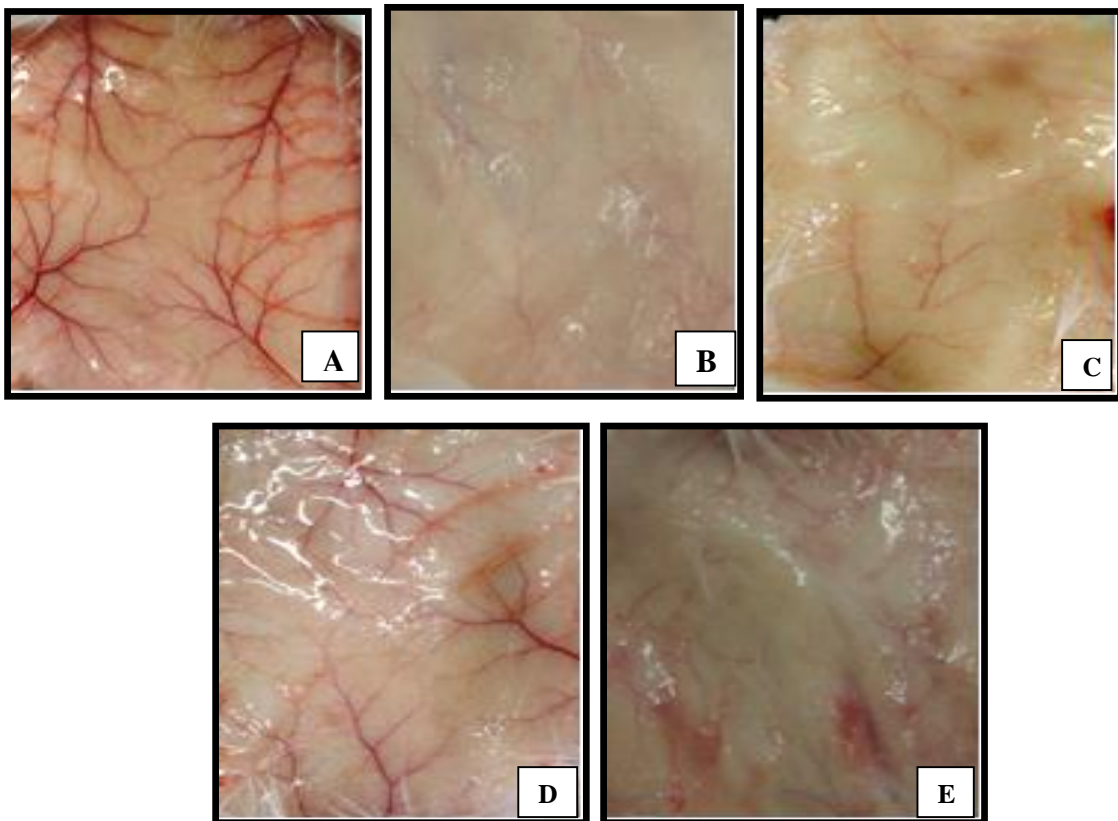


Figura 16 - Avaliação do efeito do tratamento com o ExHPpg sobre alterações visualizadas macroscopicamente no tecido da bolha. Animais do grupo controle com carragenina (A); grupo inoculado com salina (B); grupo tratado com indometacina (C); e grupos tratados com doses 0,02 mg/kg (D) e 0,2 mg/kg (E). Imagens fotográficas representativas de cada grupo (três experimentos).

4.3.2.1.4 Alterações histológicas do tecido da bolha do ExHPpg

O processamento histológico da pele do dorso dos animais foi realizado para avaliar alterações histológicas como espessamento e infiltração de polimorfonucleares na pele. As Figuras 17A e 17B mostram as fotomicrografias de um animal que recebeu apenas injeção de salina estéril e fotomicrografias do tecido de um animal inoculado com carragenina e tratado com o veículo (etanol 15%; 1,25% Tween-20) que estão representadas nas Figuras 17C e 17D. Pode-se observar neste grupo um acúmulo de leucócitos na camada mais interna da bolha em relação ao grupo salina (Figura 17A e 17B). A droga padrão, indometacina foi capaz de reduzir o infiltrado de leucócitos na camada mais interna do tecido e o espessamento tecidual (Figuras 17E e 17F).

Em relação ao tecido de animais que receberam tratamento com as doses de ExHPpg 0,02 mg/kg (Figura 18A e 18B) e 0,2 mg/kg (Figura 18C e 18D), houve redução de infiltrado inflamatório na derme para ambas as doses, quando comparado com o tecido de animais do grupo tratado com veículo e inoculado com carragenina (Figuras 17C e 17D). É possível verificar também diminuição do espessamento da pele na dose de 0,2 mg/kg em relação ao tecido de animais do grupo carragenina. A abundância de tecido adiposo no animal tratado com a dose de 0,02 mg/kg (Figuras 18A e 18B) não permitiu ver redução no espessamento da pele, em relação ao grupo controle com carragenina (Figuras 17C e 17D).

4.3.2.2 Efeito anti-inflamatório da Fração Fr2Ppg

A atividade anti-inflamatória da Fr2Ppg no modelo de bolha de ar está representada na Figura 19. O processo inflamatório foi desencadeado satisfatoriamente, visto que a contagem total de células (Figura 19A) no exsudato do grupo controle com carragenina (tratado v.o. com etanol 15% 1,25% Tween-20) foi de 18,8 milhões. Em contrapartida, o grupo que recebeu apenas injeção de salina estéril 0,9% no interior da bolha apresentou baixo número de células, com média de 0,92 milhões. A indometacina, droga padrão utilizada, inibiu em 68,7% a inflamação em relação ao grupo tratado com o veículo, com número total de 5,9 milhões de células. A dose 0,02 mg/kg, foi capaz de inibir significativamente em 62,8% o número de leucócitos (7 milhões de células). Entretanto, o tratamento com a maior dose do ExPpg (0,2 mg/kg) não se mostrou efetivo na inibição da inflamação, encontrando-se um número total de células no exsudato semelhante ao encontrado no grupo controle com carragenina tratado com o veículo (18,4 milhões de células).

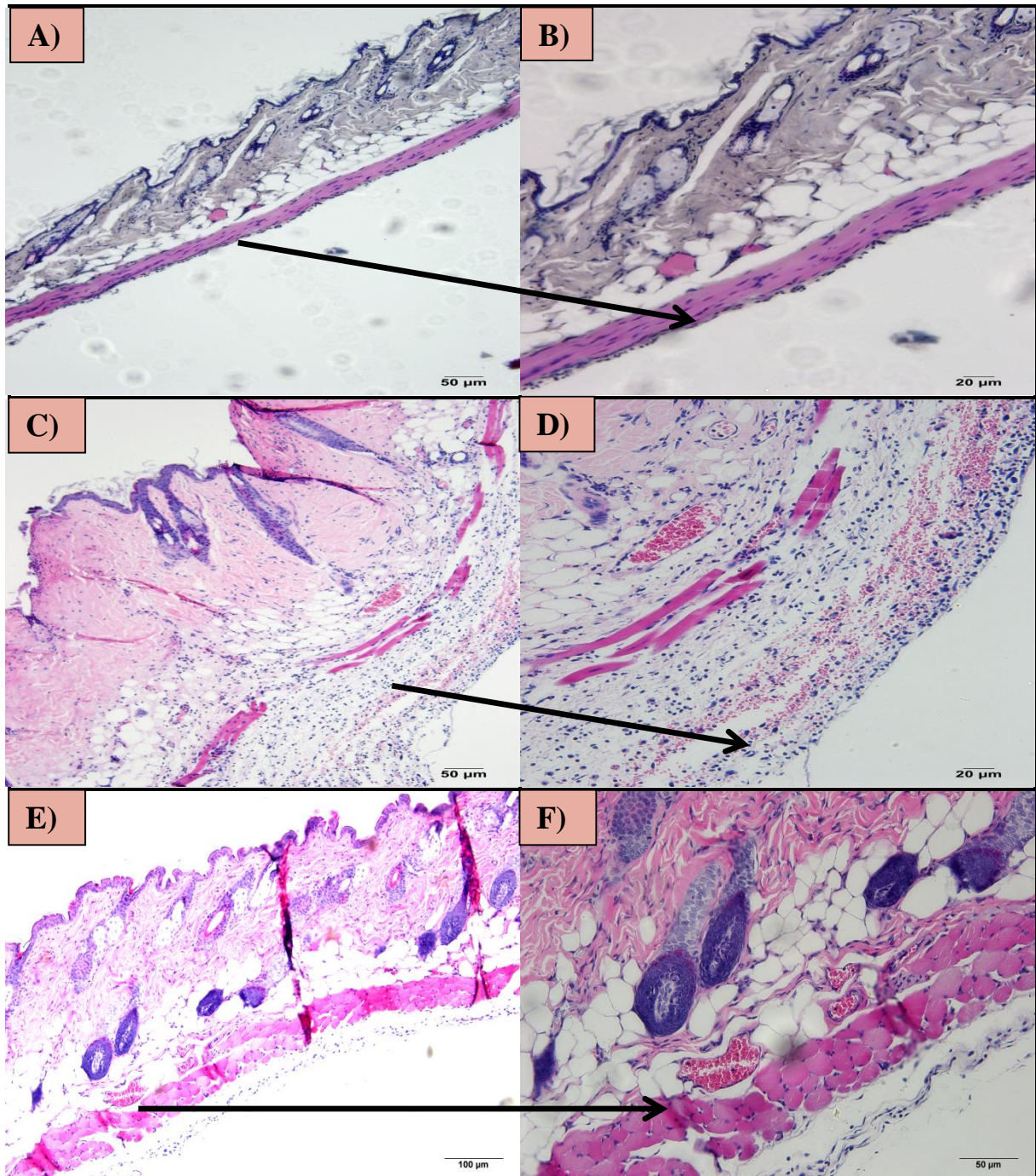


Figura 17 - Fotomicrografias de cortes histológicos dos tecidos da bolha de ar dos grupos controle nos aumentos de 100x e 200x. A) Grupo controle salina, aumento de 100x; ; B) Grupo controle salina, aumento de 200x; C) Grupo controle carragenina, aumento de 100x; ; D) Grupo controle carragenina, aumento de 200x; ; E) Grupo indometacina, aumento de 100x; ; F) Grupo indometacina, aumento de 200x; Os grupos C/D e E/F receberam injeção de carragenina 1% na cavidade da bolha no sexto dia do experimento. Coloração por HE. Figura representativa de três experimentos independentes.

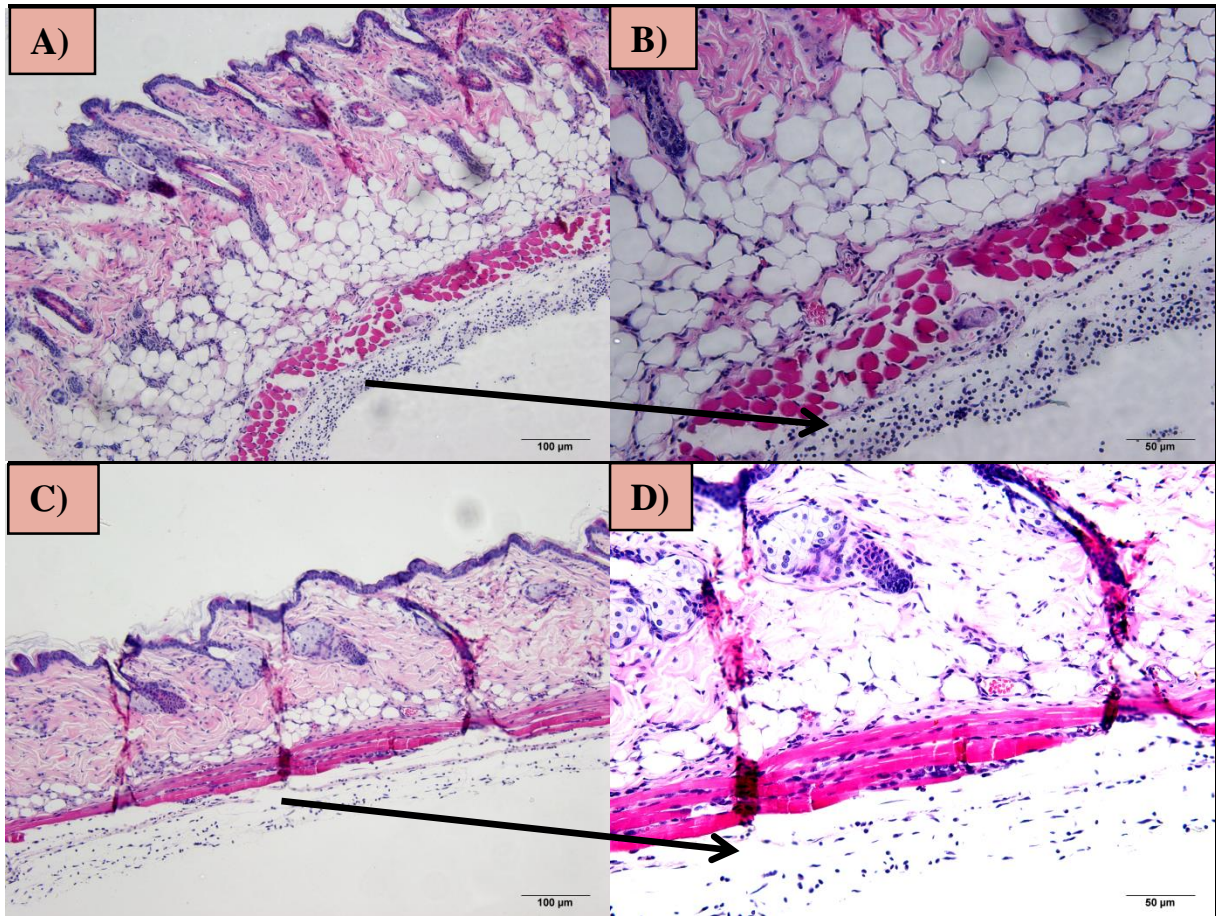


Figura 18 - Fotomicrografias de cortes histológicos dos tecidos da bolha de ar dos grupos tratados com ExHPpg, nos aumentos de 100x e 200x. A) Grupo ExHPpg 0,02 mg/kg, aumento de 100x; B) Grupo ExHPpg 0,02 mg/kg, aumento de 200x; C) Grupo ExHPpg 0,2 mg/kg, aumento de 100x; D) Grupo ExHPpg 0,2 mg/kg, aumento de 200x. Os grupos A/B e C/D receberam injeção de carragenina 1% na cavidade da bolha no sexto dia do experimento e tratamento v.o. com ExHPpg nas doses de 0,02 e 0,2 mg/kg. Coloração por HE. Figura representativa de três experimentos independentes.

A contagem diferencial de células foi realizada a fim de identificar possíveis alterações nos níveis dos diferentes tipos celulares presentes no exsudato inflamatório. Ao analisar os resultados, observou-se que apenas os níveis de neutrófilos alteravam-se significativamente em grupos tratados (Indometacina; doses 0,02 e 0,2 mg/kg) com relação a grupo controle com carragenina.

Optou-se assim por apresentar apenas os resultados relativos ao neutrófilos (Figura 19B). O número absoluto de neutrófilos presentes no exsudato do grupo veículo foi de 26,2 milhões e o do grupo salina 0,7 milhões de células. A indometacina foi eficiente reduzindo a inflamação em 78,7% em relação ao veículo (5,6 milhões de células). O tratamento com a Fr2Ppg nas doses 0,02 e 0,2 mg/kg produziram inibição de 78,3% (5,7 milhões de células) e 64,5% (9,3 milhões de células), respectivamente.

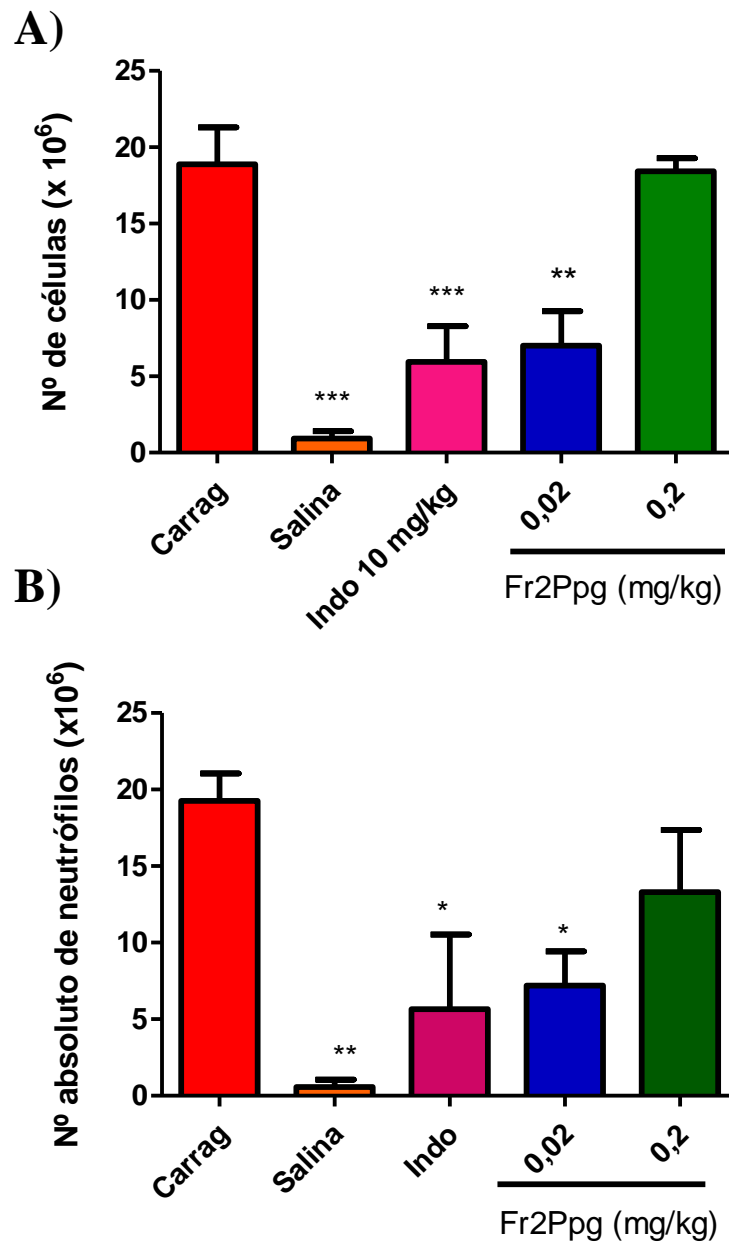


Figura 19 - Avaliação da atividade da Fr2Ppg sobre o número de leucócitos totais (A) e número absoluto de neutrófilos (B) presentes no exsudato no modelo de *air pouch*. Foram administradas as doses de 0,02 e 0,2 mg/kg em camundongos SW (n = 5/grupo). Os resultados expressam média \pm DP de três experimentos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$, em relação ao grupo controle com carragenina tratado com o veículo (teste ANOVA seguido de Dunnett).

4.3.2.2.1 Dosagem do conteúdo total de proteína no exsudato da bolha da Fr2Ppg

A injeção de carragenina neste modelo é capaz de induzir inflamação local com extravasamento de líquido do plasma, rico em proteínas. Realizou-se assim, a dosagem de proteínas através do método do biureto a fim de observar possíveis alterações dos níveis proteicos no exsudato de animais tratados com a Fr2Ppg.

Os resultados mostrados na Figura 20 revelam que houve aumento significativo do nível de proteínas no exsudato de animais do grupo controle inoculados com carragenina e tratados com o veículo, o qual continha 6,9 mg/mL de proteína se comparado ao teor de proteína de 0,6 mg/mL, presente no exsudato de animais normais inoculados apenas com salina. Nos animais tratados com indometacina ou com a Fr2Ppg na dose de 0,02 mg/kg, observou-se inibições de 76,9% e 50,8%, respectivamente. O tratamento com a dose de 0,2 mg/kg não foi eficiente em reduzir o nível de proteína no exsudato em relação ao grupo carragenina, apresentando níveis semelhantes ao este controle tratado com o veículo.

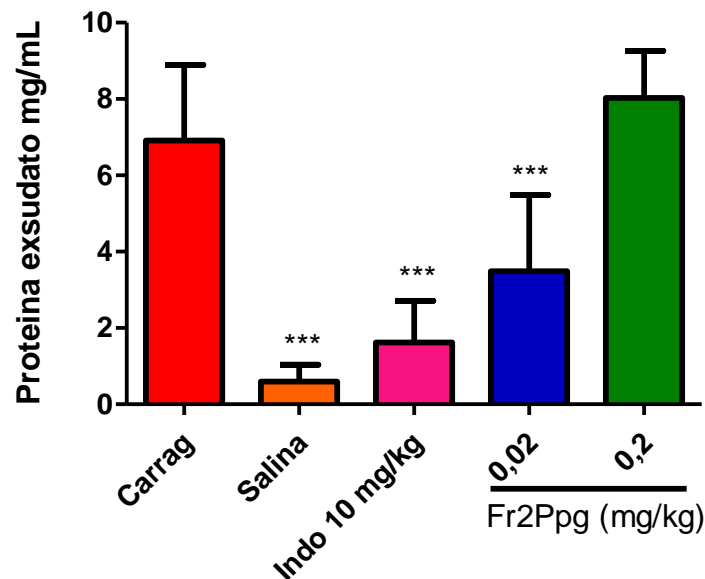


Figura 20 - Avaliação da atividade da Fr2Ppg sobre o nível de proteína total no exsudato da bolha. A inflamação foi induzida por injeção de carragenina 1% na bolha. Os animais foram tratados (v.o.) com o veículo (Carrag), Indometacina (Indo) ou com as doses da Fr2Ppg. Um grupo controle recebeu apenas salina na cavidade da bolha (n = 5/grupo). Os resultados expressam média \pm DP de dois experimentos. *** $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle com carragenina tratado com o veículo (teste ANOVA seguido de Dunnett).

4.3.2.2 Análise macroscópica das alterações morfológicas no tecido da bolha da Fr2Ppg

Os tecidos das bolhas foram removidos para avaliação das possíveis alterações vasculares e teciduais através de uma análise macroscópica do material. É possível visualizar sinais como vermelhidão, vasodilatação e possivelmente formação de novos vasos nos tecidos das bolhas de animais que receberam carragenina na cavidade e tratamento com o veículo (Figura 21A), os quais se mostram significativamente reduzidos nos animais tratados com droga padrão Indometacina (Figura 21B) e a dose 0,02 mg/kg da Fr2Ppg (Figura 21D). É possível observar grande vasodilatação dos vasos e vermelhidão no tecido de animais tratados com a dose de 0,2 mg/kg da Fr2Ppg (Figura 21E), quando comparada com a menor dose (Figura 21D). Animais do grupo que recebeu apenas salina na cavidade (Figura 21C) também não apresentam sinais inflamatórios como mostrado na Figura 21A.

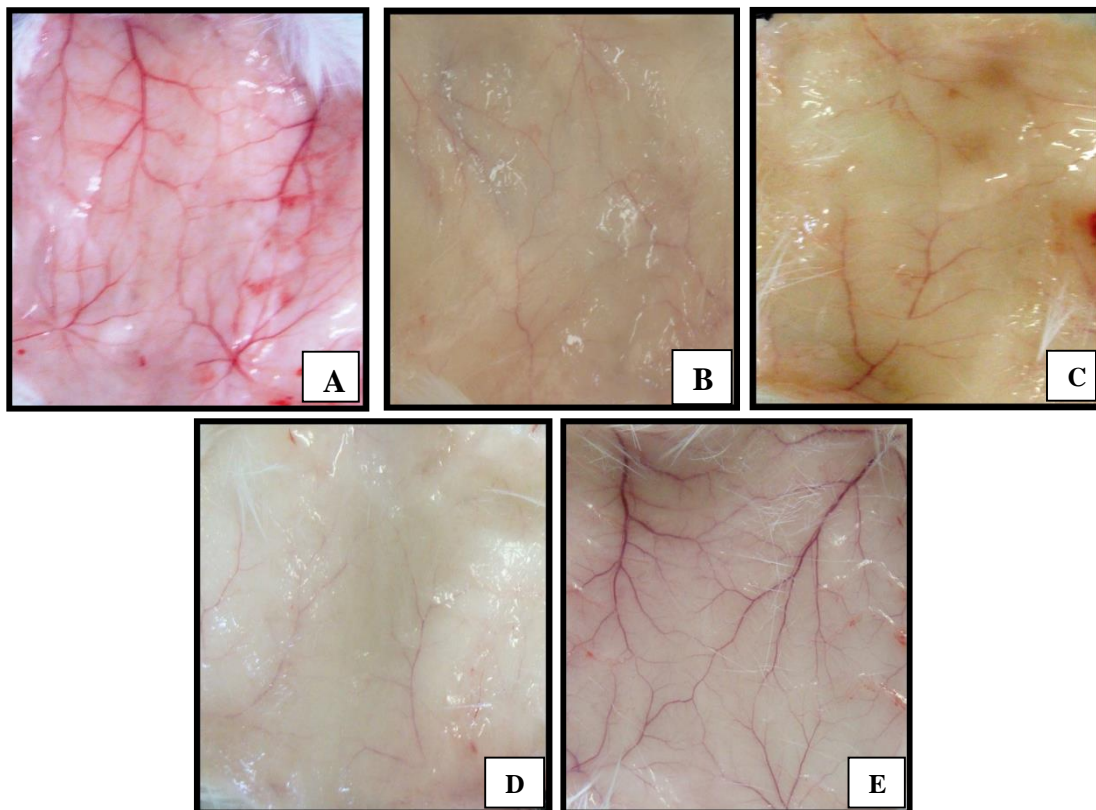


Figura 21 - Avaliação do efeito do tratamento com a Fr2Ppg sobre alterações morfológicas do tecido da bolha. Animais do grupo controle com carragenina tratado com o veículo (A); grupo inoculado com salina (B); grupo tratado com indometacina (C); e grupos tratados com doses 0,02 e 0,2 mg Fr2Ppg/kg (D e E). Imagens fotográficas representativas de cada grupo (três experimentos).

4.3.2.2.3 Alterações histológicas do tecido da bolha da Fr2Ppg

O processamento histológico da pele do dorso dos animais foi realizado para avaliar alterações histológicas como espessamento da pele e infiltrado de polimorfonucleares (Figura 22). Em A e B, observa-se o tecido da bolha de um animal do grupo salina, mostrando a pele delgada e sem infiltrado inflamatório. As Figuras 22C e 22D mostram o tecido de um animal controle com carragenina tratado com etanol 15% 1,25% Tween-20. Pode-se observar o espessamento da pele e acúmulo de leucócitos em relação a tecido de um animal do grupo salina, que recebeu apenas injeção de salina estéril (Figuras C e D). A droga padrão, indometacina foi capaz de reduzir o infiltrado de leucócitos no tecido (Figuras E e F) os efeitos observados na Figura 22 também foram observados e descritos anteriormente na Figura 17.

Em relação à dose 0,02 mg/kg da Fr2Ppg (Figura 23 A e B), o tecido da região da mais interna da bolha de ar dos animais se apresenta com redução no espessamento da pele e no infiltrado inflamatório na região mais interna da bolha em relação ao tecido de animais do grupo controle com carragenina (Figura 22 A e B). Entretanto, o tratamento com a maior dose, 0,2 mg/kg Fr2Ppg, não foi capaz de reduzir com a mesma eficiência os sinais inflamatórios, corroborando o resultado já obtido no (item 4.3.4.1).

4.3.3 Influência da Fr2Ppg na migração *in vitro* de neutrófilos

Considerando a predominância de neutrófilos no exsudato inflamatório através da indução de inflamação no modelo de bolha de ar (dados não mostrados), foi investigado o efeito da Fr2Ppg na migração de neutrófilos utilizando o sistema de *transwell* (Figura 24), conforme descrito em métodos. Visto que a injeção da carragenina 1% induz o processo inflamatório, com intensa migração celular para o local inflamado, utilizou-se como fonte de quimioatraente o sobrenadante do exsudato recolhido do grupo controle, o qual apenas recebeu carragenina 1% na bolha. Utilizou-se então um controle negativo, sem sobrenadante de exsudato como fonte de quimioatraente (Ctr neg) na parte inferior, e um controle com EtOH na mesma concentração final de EtOH das amostras de Fr2Ppg, na parte superior, junto com a suspensão celular (Ctr EtOH).

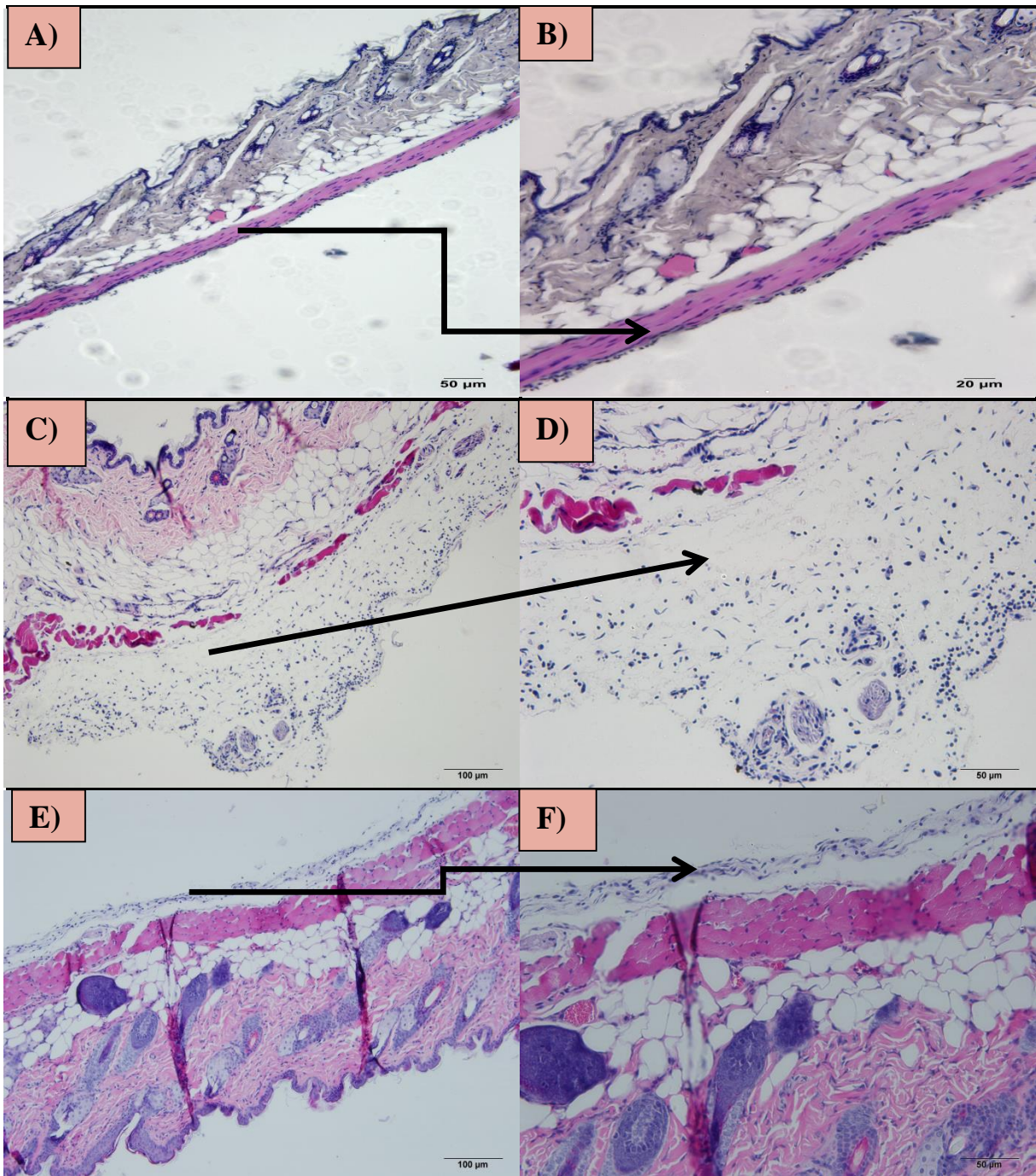


Figura 22 - Fotomicrografias de cortes histológicos dos tecidos da bolha de ar dos grupos controle nos aumentos de 100x e 200x. A) Grupo controle carragenina, aumento de 200x; B) Grupo controle carragenina, aumento de 200x; C) Grupo controle salina, aumento de 100x; D) grupo controle salina, aumento de 200x; E) Grupo indometacina, aumento de 100x; F) Grupo indometacina, aumento de 200x. Coloração por HE. Figura representativa de três experimentos independentes.

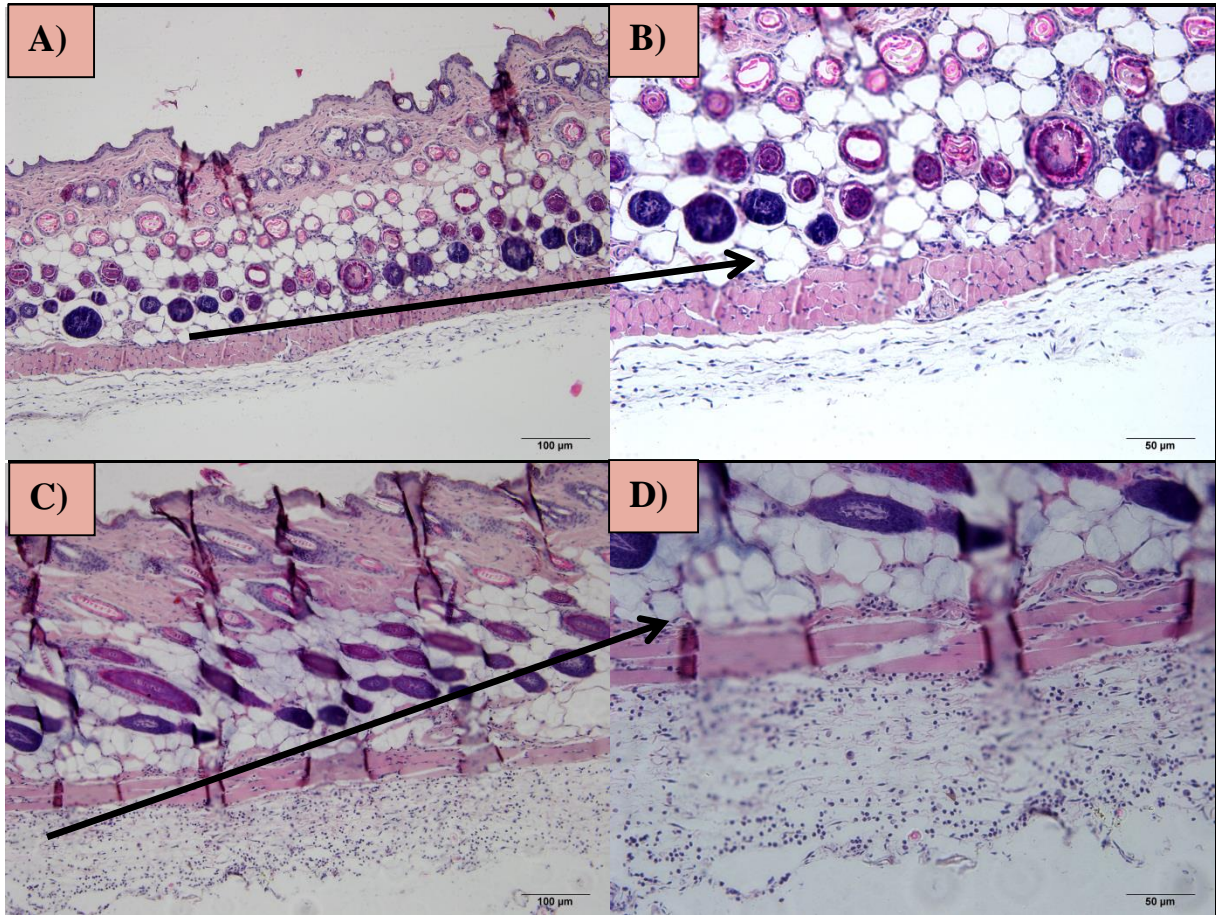


Figura 23 - Fotomicrografias de cortes histológicos dos tecidos da bolha de ar dos grupos tratados com Fr2Ppg, nos aumentos de 100x e 200x. A) Grupo Fr2Ppg 0,02 mg/kg, aumento de 100x; B) Grupo Fr2Ppg 0,02 mg/kg, aumento de 200x; C) Grupo Fr2Ppg 0,2 mg/kg, aumento de 100x; D) Grupo Fr2Ppg 0,2 mg/kg, aumento de 200x. Os grupos A/B e C/D receberam injeção de carragenina 1% na cavidade da bolha no sexto dia do experimento e tratamento v.o. com Fr2Ppg nas doses de 0,02 e 0,2 mg/kg. Coloração por HE. Figura representativa de três experimentos independentes.

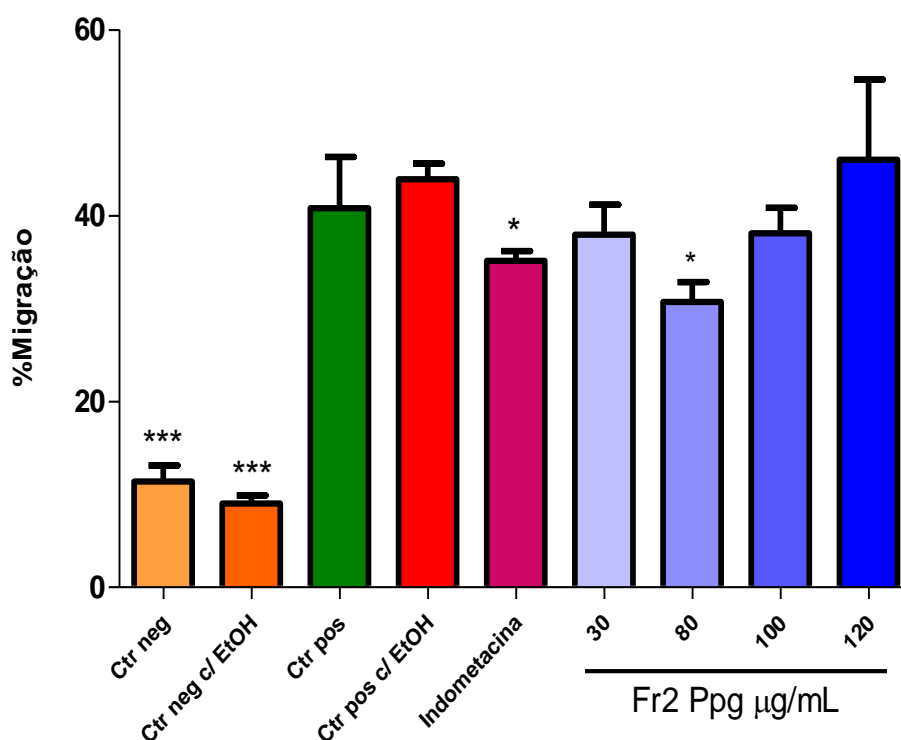


Figura 24 – Avaliação da atividade da Fr2Ppg sobre a migração de neutrófilos através do ensaio de *transwell*. Percentual de migração de neutrófilos. Os resultados expressam a média \pm DP de dois experimentos feitos em triplicata, sendo as diferenças estatisticamente significativas avaliadas pelo teste ANOVA seguido de Dunnett em relação ao controle positivo com etanol (Ctr pos c/ EtOH). * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$.

Houve um estímulo (3,9x) da migração de neutrófilos no controle com quimioatraentes (Ctr pos c/ EtOH) em relação ao controle negativo (Ctr neg) sem quimioatraente ($p < 0,001$), o que validou a utilização do sobrenadante do exsudato do grupo controle com carragenina neste ensaio de migração. Para a quantificação do número de neutrófilos do controle positivo, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo e a região de predominância destas células (considerando tamanho e granulosidade) foi delimitada por *dotplot*, consistindo em 90% do número total de células presentes no sedimento do exsudato. Não houve interferência do diluente das amostras (Ctr EtOH) no ensaio de migração. Houve redução de 31,4% e 21,5% na migração de neutrófilos com a Fr2Ppg a 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e a indometacina (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectivamente (Figura 24).

4.4 Sub-fracionamento da fração Fr2Ppg isolado do ExHPpg

Foram aplicados 10 g da fração Fr2Ppg em coluna de sílica gel 60 coletando-se após o fracionamento 54 eluatos, recuperando-se uma massa total de 8 g (80%).

4.4.1 Perfil cromatográfico das sub-frações obtidas da Fr2Ppg (TLC)

Visando reunir em sub-frações os eluatos obtidos durante o fracionamento da fração Fr2Ppg em coluna de sílica, foi realizado uma *screening* inicial do perfil cromatográfico em placas de TLC (Figura 25). O grupo de eluatos de 1 a 17 mostrou menor complexidade de bandas, com evidência de banda única em 3, 4 e 5, ao final da corrida, indicando substâncias mais apolares (placa A). Os eluatos 18 a 23 apresentaram semelhanças nas características das bandas, com bandas majoritárias na parte superior da corrida, portanto, mais apolares (placa B). Entre os do eluato 24 a 26 observou-se maior complexidade de bandas, com diferentes colorações, distribuídas por toda a placa (diferentes polaridades), havendo mudança de perfil a partir do eluato 27, com predominância de substâncias mais polares.

Desta forma, foi modificada a composição da fase móvel para melhorar a resolução (placas C e D). Em função da semelhança dos perfis cromatográficos e baseando-se em características como polaridade, coloração, complexidade e localização das bandas, os eluatos foram reunidos nas sub-frações, SF2.1, SF2.2, SF2.3, SF2.4 e SF2.5, como detalhado na Figura 25.

4.4.2 Perfil cromatográfico das sub-frações SF 2.1 a SF 2.5 da Fr2Ppg por CG-MS

As sub-frações da Fr2Ppg obtidas foram analisadas por cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas e seus cromatogramas estão representados na Figura 26. A SF 2.1 apresentou predominância de picos entre 10 e 17,5 minutos de corrida, com intensidade de até 8 UA, em uma região indicadora de maior apolaridade dos compostos presentes. Nessa região pode-se observar quatro picos majoritários com tempos de retenção de 10,162; 10,315; 13,357 e 16,311 minutos. A SF 2.2 apresentou picos de menor intensidade (até 3 UA), com maior incidência de picos em uma região mediana do cromatograma, entre 10 e 21 minutos de corrida com um pico majoritário com tempo de retenção de 10,755 minutos.

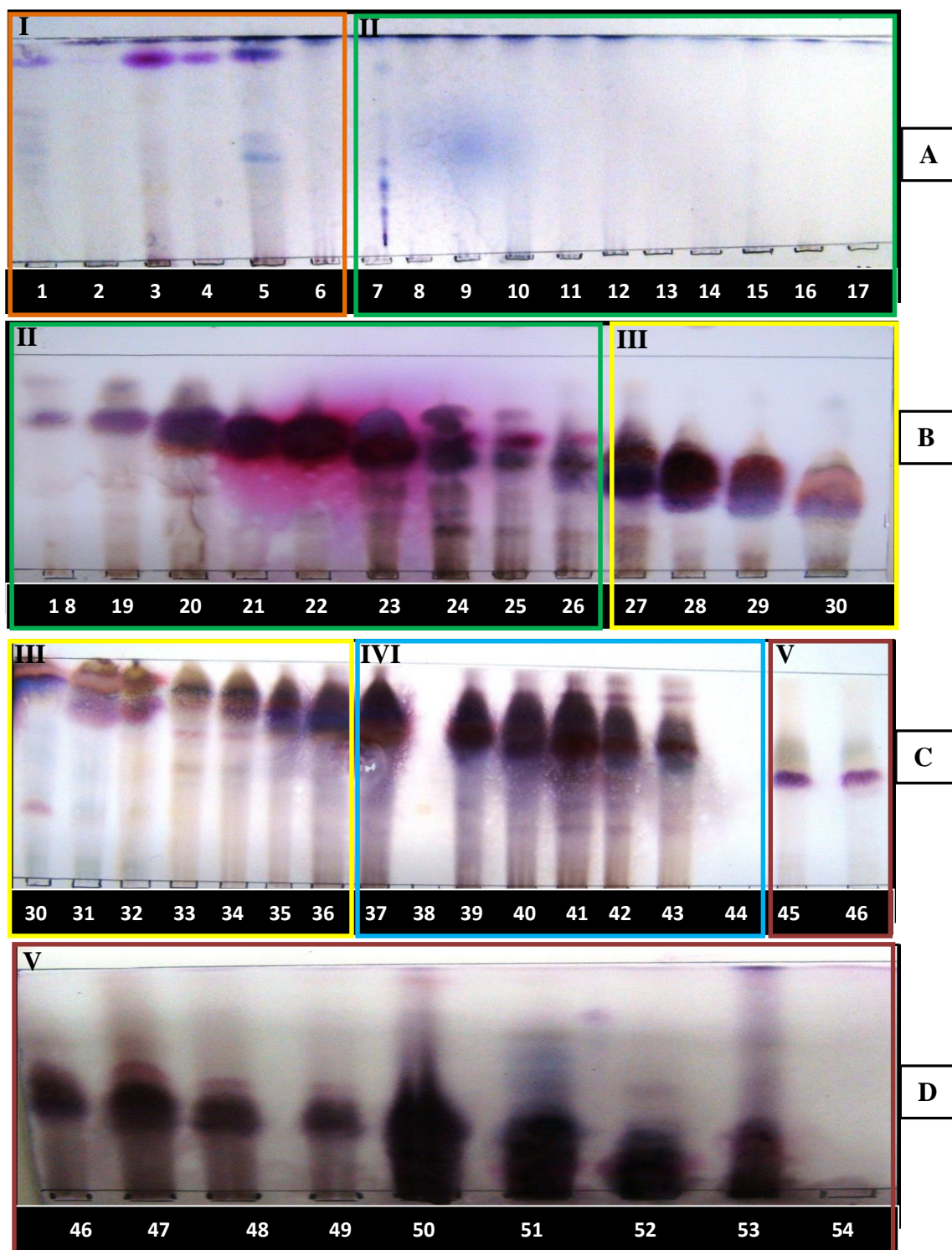


Figura 25 – Cromatografia em camada delgada dos eluatos do fracionamento da FR2Ppg. As placas de Sílica gel 60 de 10 x 20 cm A e B, foram desenvolvidas com a fase móvel AcOEt:Hex (15:85 v/v) e as placas C e D, com a fase móvel AcOEt:Hex (30:70 v/v) e reveladas para terpenoides com ácido sulfúrico 1% e vanilina 1%. I) Eluatos 1-6, SF2.1; II) Eluatos 7-26, SF2.2; III) Eluatos 27-36, SF2.3; IV) Eluatos 37-44, SF2.4; V) Eluatos 45-54, SF2.5.

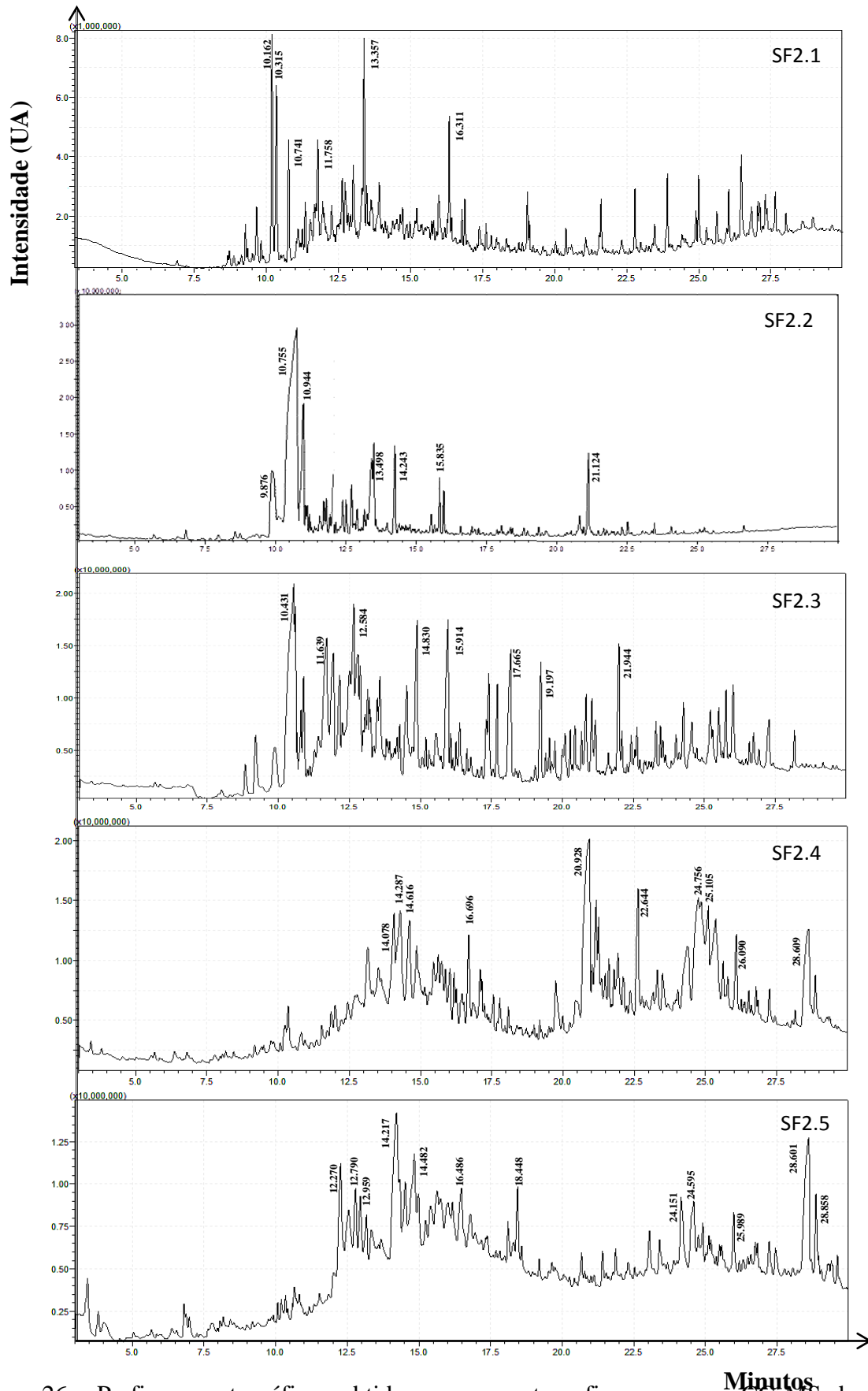


Figura 26 - Perfis cromatográficos obtidos por cromatografia gasosa em CG-MS das sub-frações originadas da fração Fr2Ppg. As temperaturas do injetor e detector foram 220 e 290°C, respectivamente. A programação de temperatura utilizada foi de 100°C até 300°C com gradiente de 7°C/minuto. Foi aplicado 1 µL de cada amostra solubilizada em metanol.

A SF 2.3 apresentou maior complexidade com picos distribuídos entre 10 e 27,5 minutos, caracterizando maior variação da polaridade dos compostos presentes. A SF 2.4 e a SF 2.5 exibiram predominância de picos na mesma região com TR entre 14 e 28 minutos. A SF 2.4 exibiu maior número de picos majoritários e de maior intensidade do que a SF 2.5, que apresentou dois picos majoritários com TR de 14.217 e 28.601 minutos em uma faixa de intensidade de até 1,25 UA.

4.4.3 Potencial anti-inflamatório agudo das sub-frações da Fr2Ppg

Foram testadas as cinco sub-frações originadas do fracionamento da fração Fr2Ppg no modelo de bolha de ar (Figura 27). A SF 2.1 exibiu potencial anti-inflamatório reduzindo em 54,7% e 48,6% (8,3 e 8,9 milhões de células) o número total de células do exsudato no tratamento com as doses 0,02 e 0,2 mg/kg, respectivamente, se comparado com o grupo controle com carragenina tratado apenas com o ao veículo (18,3 milhões de células) (Figura 27A). Para a SF 2.2 (Figura 27B), observou-se eficácia no tratamento com a menor dose, com inibição de 79% (12,19 milhões de células), em relação ao grupo carragenina (57,8 milhões de células), o que não observado com a maior dose ($p > 0,05$). A sub-fração SF 2.3, produziu 51,9% de inibição (21,63 milhões de células) em relação ao grupo carragenina (44,92 milhões de células), não se observando inibição significativa no tratamento com a maior dose (Figura 27C). De maneira semelhante o tratamento com a SF 2.4 (Figura 27D) reduziu o número total de leucócitos no exsudato em 54% apenas na menor dose (20,6 milhões de células) em relação ao veículo (44,92 milhões de células). Finalmente, a SF 2.5 (Figura 27E) apresentou uma quantidade total de leucócitos semelhante ao grupo carragenina (42 milhões de células) nas doses 0,02 (42,3 milhões de células) e 0,2 mg/kg (49,9 milhões de células).

Visto que a SF 2.1 exibiu efeito anti-inflamatório em ambas as doses testadas e que SF 2.2 apresentou percentual anti-inflamatório de quase 80% na menor dose testada, decidiu-se realizar as demais análises apenas para estas duas sub-frações.

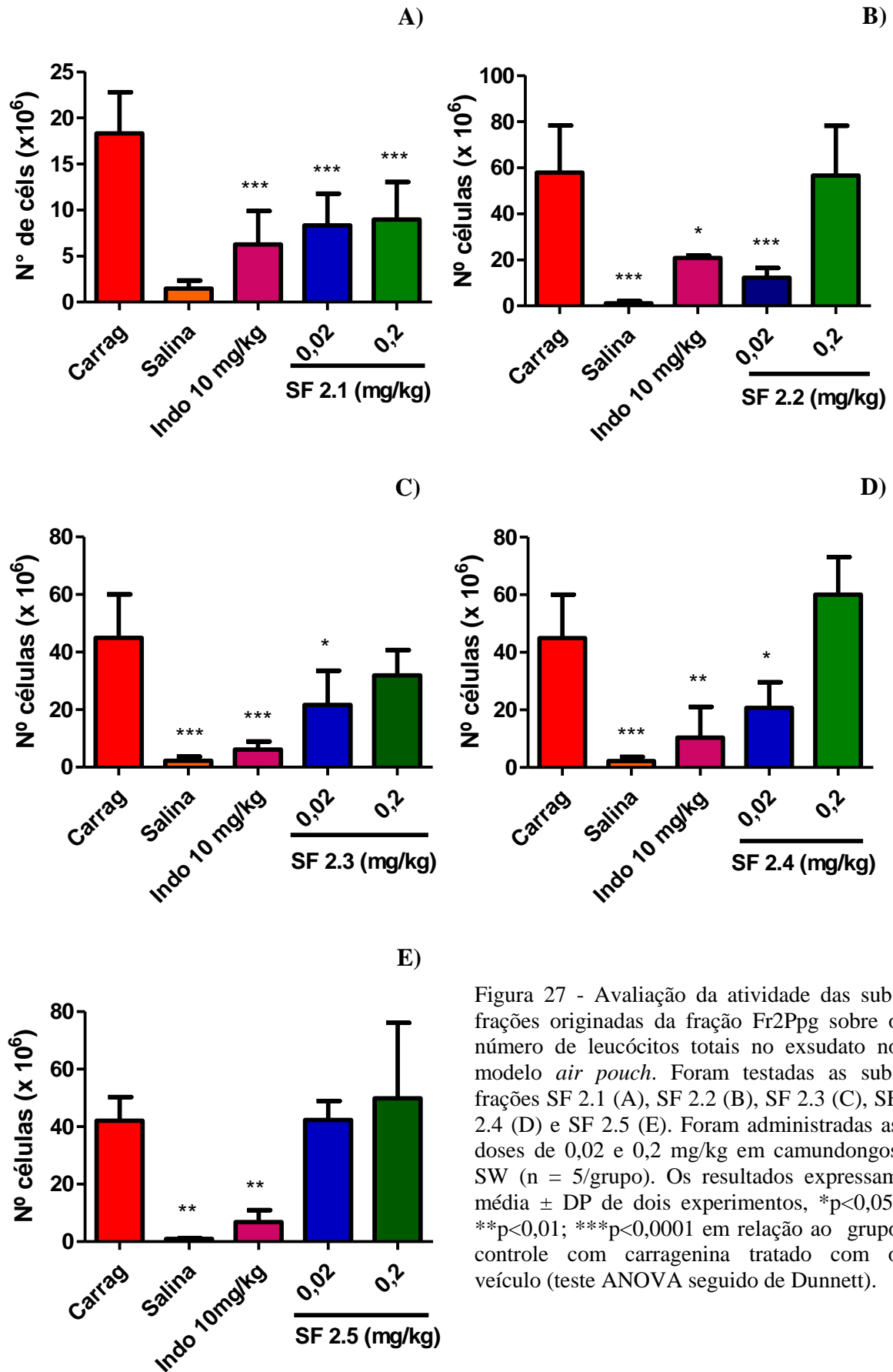


Figura 27 - Avaliação da atividade das sub-frações originadas da fração Fr2Ppg sobre o número de leucócitos totais no exsudato no modelo *air pouch*. Foram testadas as sub-frações SF 2.1 (A), SF 2.2 (B), SF 2.3 (C), SF 2.4 (D) e SF 2.5 (E). Foram administradas as doses de 0,02 e 0,2 mg/kg em camundongos SW (n = 5/grupo). Os resultados expressam média \pm DP de dois experimentos, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle com carragenina tratado com o veículo (teste ANOVA seguido de Dunnett).

4.4.3.1 Dosagem do conteúdo total de proteína no exsudato da bolha das sub-frações da fração Fr2Ppg

Foi avaliado o efeito das subtrações SF 2.1 e SF 2.2 no teor proteico do exsudato da bolha. Podemos observar um aumento do conteúdo de proteínas no grupo controle tratado com carragenina (Figura 28 A e B) em relação ao grupo que recebeu apenas salina fisiológica. Para o grupo indometacina houve inibição de 74% (Figura 28A) ou 73,3% (Figura 28B) do extravasamento proteico. No tratamento com a sub-fração SF 2.1 observou-se uma redução da concentração de proteína de 71,1% e 68,2%, para as doses 0,02 e 0,2 mg/kg, respectivamente, com valores de 2 e 2,2 mg/mL, em relação ao grupo carragenina (7 mg proteína/mL) (Figura 28A). Com a SF 2.2 houve uma redução do teor de proteína total em relação ao grupo carragenina (Figura 28B) de 73,3% e 30,4% para as doses 0,02 mg/kg e 0,2 mg/kg, respectivamente (1,5 e 3,9 mg/mL).

4.4.3.2 Análise macroscópica das alterações morfológicas no tecido da bolha das sub-frações da fração Fr2Ppg

Os tecidos das bolhas foram removidos para avaliação das possíveis alterações vasculares e teciduais através de uma análise macroscópica do material. É possível visualizar sinais como vermelhidão, vasodilatação e possivelmente formação de novos vasos em bolhas de animais que receberam carragenina na cavidade e tratamento oral com o veículo (Figura 29 A e F) se comparados a animais tratados com droga padrão Indometacina (Figura 28 B e G) ou com as doses 0,02 (Figura 29D) ou 0,2 mg/kg (Figura 29E) da SF 2.1 e 0,02 ((Figura 29I) ou 0,2 mg/kg (Figura 29J) da SF 2.2. Além disso, animais que receberam apenas salina fisiológica no interior da bolha de ar não apresentam sinais inflamatórios (Figura 29C e H).

4.4.3.3 Alterações histológicas do tecido da bolha das sub-frações da fração Fr2Ppg

O processamento histológico da pele do dorso dos animais foi realizado para avaliar alterações histológicas como espessamento e infiltrado de polimorfonucleares (Figura 30).

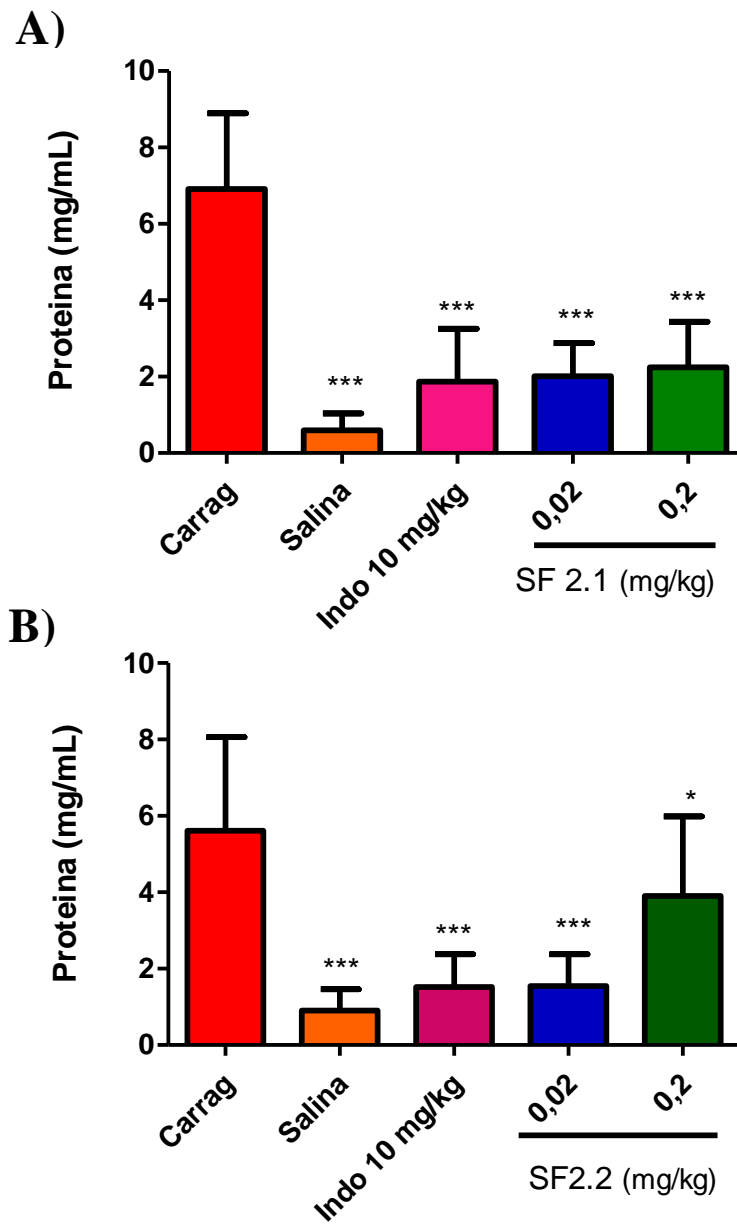


Figura 28 - Avaliação da atividade das sub-frações obtidas da Fr2Ppg sobre a concentração de proteína total do exsudato no modelo *air pouch*. A) SF2.1 e B) SF2.2. Foram administradas as doses de 0,02 e 0,2 mg/kg em camundongos SW (n = 5/grupo). Os resultados expressam média \pm DP de dois experimentos, * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle com carragenina tratado com o veículo (teste ANOVA seguido de Dunnett).

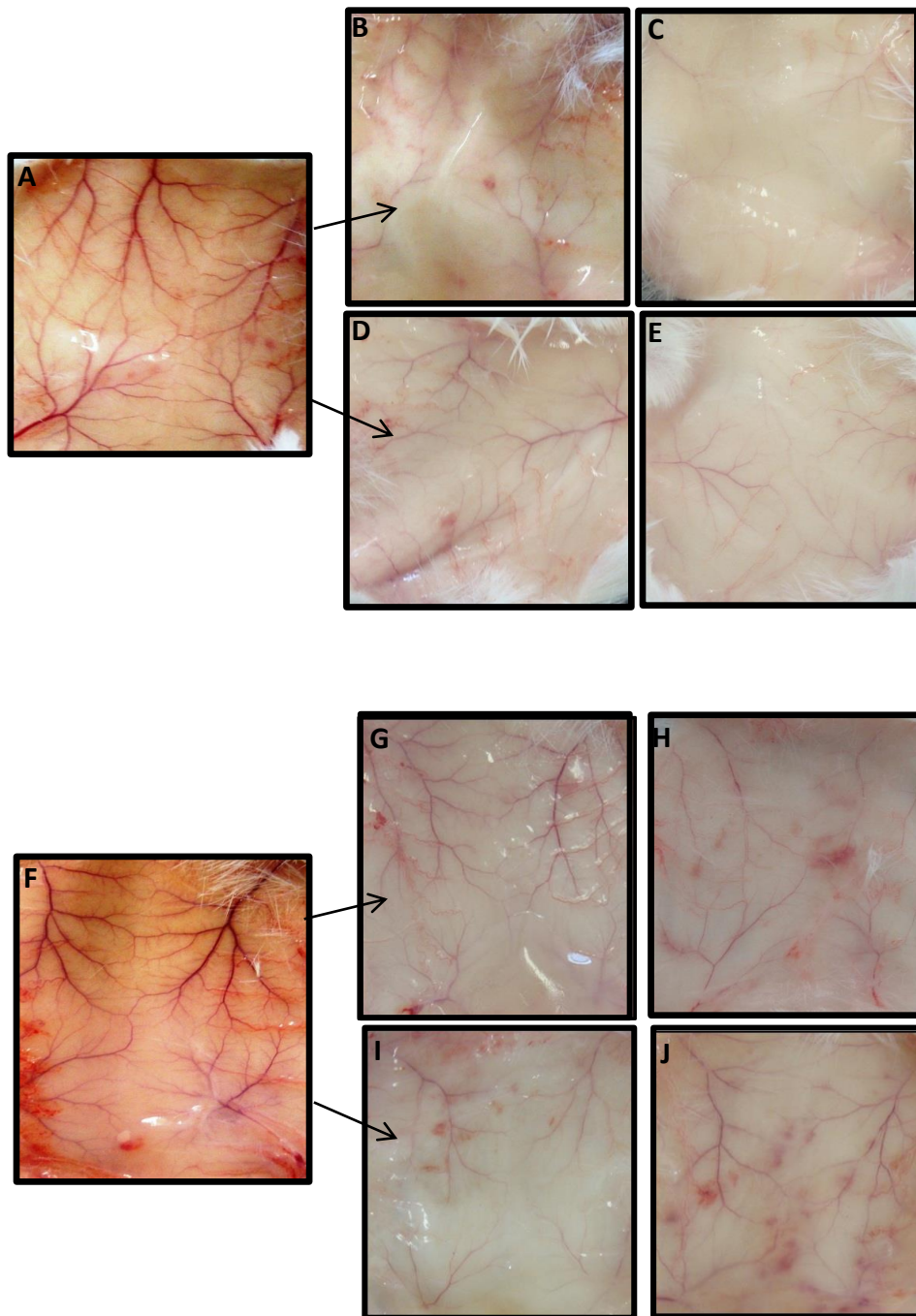


Figura 29 - Avaliação do efeito do tratamento com as sub-frações SF 2.1 e SF 2.2 sobre alterações morfológicas do tecido da bolha. Animais do grupo carragenina (A e F), grupo tratado com indometacina (B e G), grupos inoculados com salina (C e H) e grupos tratados com as sub-frações SF 2.1 ou SF 2.2 nas doses de 0,02 mg/kg (D e I), respectivamente e 0,2 mg/kg (E e J), respectivamente. Imagens fotográficas representativas de cada grupo (três experimentos).

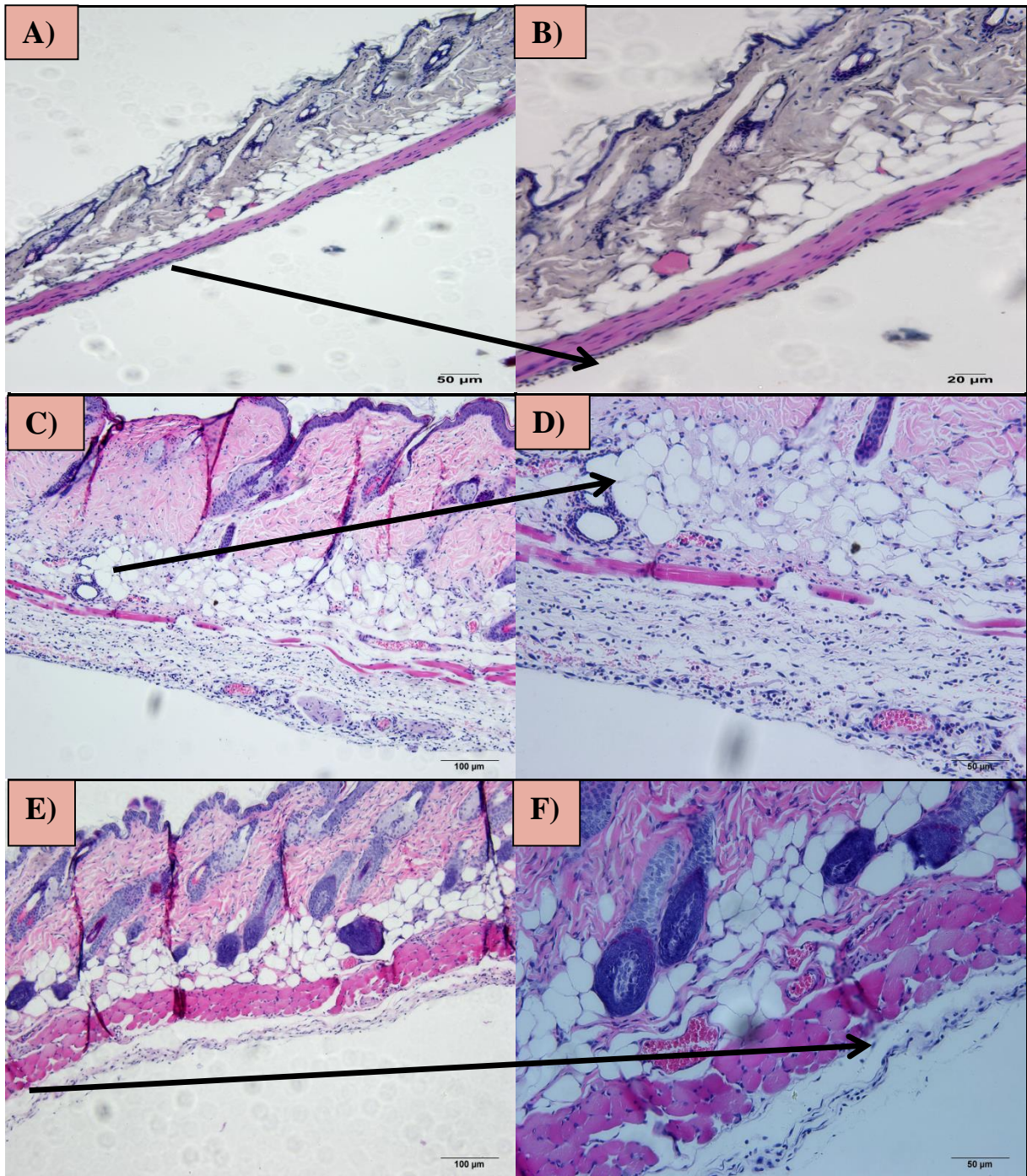


Figura 30 - Fotomicrografias de cortes histológicos dos tecidos da bolha de ar dos grupos controle nos aumentos de 100x e 200x. A) Grupo controle carragenina, aumento de 100x; B) Grupo controle carragenina, aumento de 200x; C) Grupo controle salina, aumento de 100x; D) grupo controle salina, aumento de 200x; E) Grupo indometacina, aumento de 100x; F) Grupo indometacina, aumento de 200x. Coloração por HE. Figura representativa de três experimentos independentes.

Nas Figuras 30A e 30B observa-se o tecido da bolha de um animal do grupo salina com a pele delgada e sem infiltrado inflamatório. As Figuras 30C e 30D apresentam as alterações de um animal do grupo controle com carragenina, tratado com etanol 15% 1,25% Tween-20, em diferentes aumentos, 100x e 200x, respectivamente. Pode-se observar um espessamento da pele e acúmulo de leucócitos na camada mais interna da bolha, em relação ao tecido de um animal do grupo salina. A droga padrão, indometacina foi capaz de reduzir o infiltrado de leucócitos na camada mais interna da bolha (Figuras 30E e 30F).

Em relação ao efeito das sub-frações SF 2.1 (Figura 31) e SF 2.2 (Figura 32), observamos redução do infiltrado inflamatório na camada mais interna da bolha em ambas as doses destas sub-frações, embora com intensidades diferentes. A SF 2.2 na dose 0,2 mg/kg mostrou redução da infiltração leucocitária no tecido da bolha (Figura 32C e 32D) associada a uma celularidade alta no exsudato (Figura 27B) diferentemente de todas as outras amostras analisadas.

4.4.4 Análise da SF 2.1 a SF 2.2 da Fr2Ppg por CG-MS

Como descrito anteriormente, os eluatos provenientes do fracionamento da Fr2Ppg foram evaporados separadamente e posteriormente reunidos em cinco sub-frações para análise do potencial anti-inflamatório. Tendo em vista a predominância dos efeitos biológicos nas sub-frações SF2.1 e SF2.2, os eluatos destas regiões do fracionamento foram reunidos em novos subgrupos visando à análise de sua composição por GC-MS (Figura 32 e 33). A SF2.1 foi subdividida em SF2.1.1 (eluatos 1 e 2) e SF2.1.2 (eluatos 3 a 6), enquanto a SF2.2 foi subdividida em SF2.2.1 (eluatos 7 a 10), SF2.2.2 (eluatos 11 a 17), SF2.2.3 (18 e19), SF 2.2.4 (eluato 20) e SF2.2.5, (eluatos 21 a 26).

Para a SF 2.1.1 pôde-se observar três picos majoritários com tempos de retenção entre 10 e 17,5 minutos (tempos de retenção de 10,163; 13,357 e 16,317 minutos), apresentando intensidade de até 4 UA. A SF 2.1.2 exibiu um conjunto de picos na região mais inicial do cromatogramas (tempos de retenção entre 9 e 15 minutos), indicando maior apolaridade das substâncias ali presentes. O perfil de SF 2.2.1 exibiu um conjunto de picos entre 10 e 17,5 minutos, apresentando cinco picos majoritários com tempos de retenção de 10,174; 10,338; 11,780; 13,364 e 16.323, presentes em região mediana do cromatograma. A SF 2.2.2 apresentou três picos majoritários distribuídos pelo cromatograma com tempos de retenção de

14,616; 22,756 e 23,439 minutos. A SF 2.2.3 exibiu dois picos majoritários com tempos de retenção de 14,167 e 14,616 minutos e a SF 2.2.4 quatro picos majoritários com tempos de retenção de 9,784; 10,311; 14,171 e 21,057 minutos. Para a SF 2.2.5, o perfil cromatográfico exibiu um pico majoritário com tempo de retenção de 10,351 minutos com intensidade de 10 UA. A partir da análise dos fragmentogramas de picos presentes nos cromatogramas das Figuras 33 e 34 foram identificados por comparação com o banco de dados NIST do GC-MS, os compostos mostrados na Tabela 2 correlacionando-os com seus respectivos tempos de retenção e índices de similaridade (%).

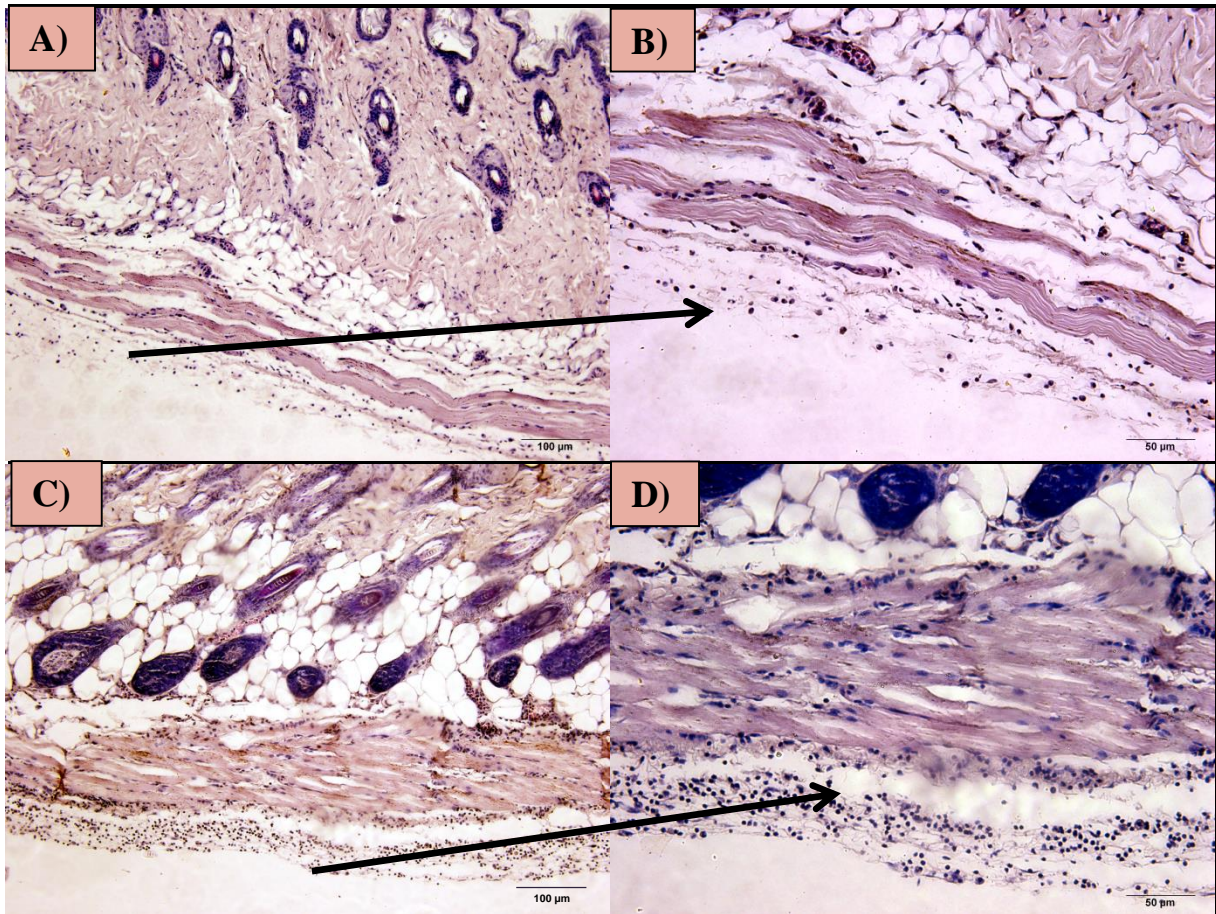


Figura 31 - Fotomicrografias de cortes histológicos dos tecidos da bolha de ar dos grupos tratados com a SF2.1, nos aumentos de 100x e 200x. A) Grupo SF2.1 0,02 mg/kg, aumento de 100x; B) Grupo SF2.1 0,02 mg/kg, aumento de 200x; C) Grupo SF2.1 0,2 mg/kg, aumento de 100x; D) Grupo SF2.1 0,2 mg/kg, aumento de 200x. Coloração por HE. Figura representativa de três experimentos independentes.

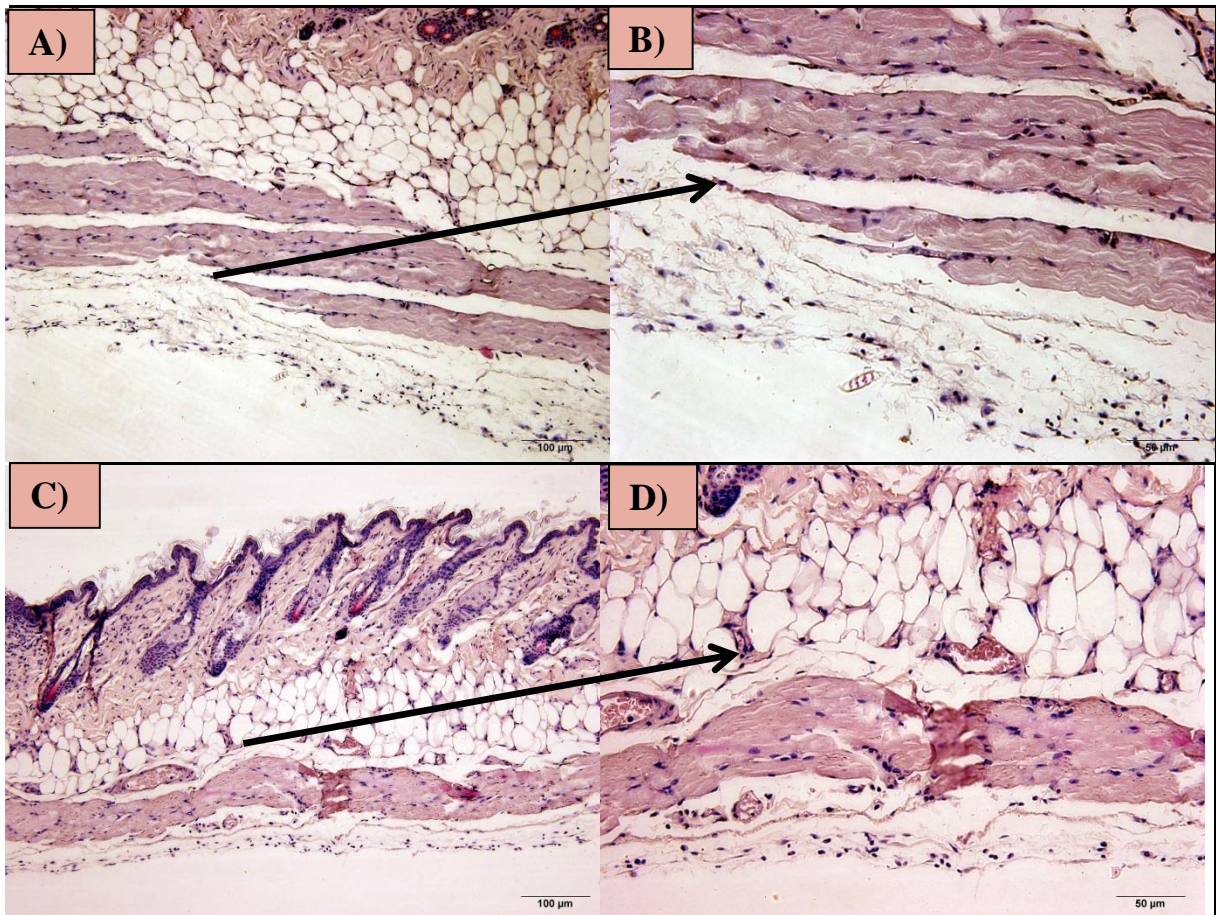


Figura 32 - Fotomicrografias de cortes histológicos dos tecidos da bolha de ar dos grupos tratados com a SF2.2, nos aumentos de 100x e 200x. A) Grupo SF2.2 0,02 mg/kg, aumento de 100x; B) Grupo SF2.2 0,02 mg/kg, aumento de 200x; C) Grupo SF2.2 0,2 mg/kg, aumento de 100x; D) Grupo SF2.2 0,2 mg/kg, aumento de 200x. Coloração por HE. Figura representativa de três experimentos independentes.

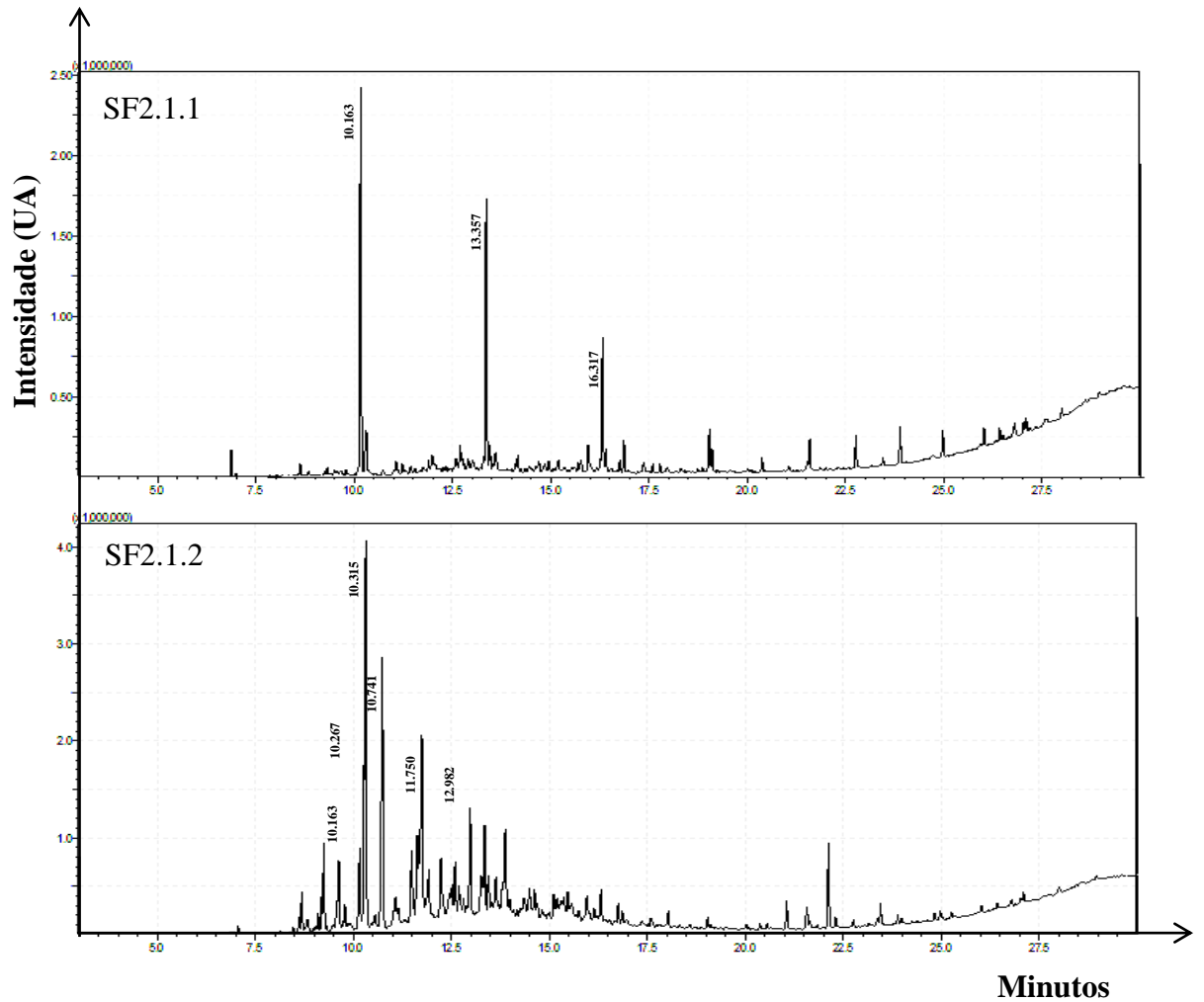


Figura 33 - Perfis cromatográficos obtidas por cromatografia gasosa em CG-MS das sub-frações originadas do Fr2Ppg. As temperaturas do injetor e detector foram 220 e 290°C, respectivamente. A programação de temperatura utilizada foi de 100°C até 300°C com gradiente de 7°C/minuto. Foi aplicado 1 µL de cada amostra solubilizada em metanol.

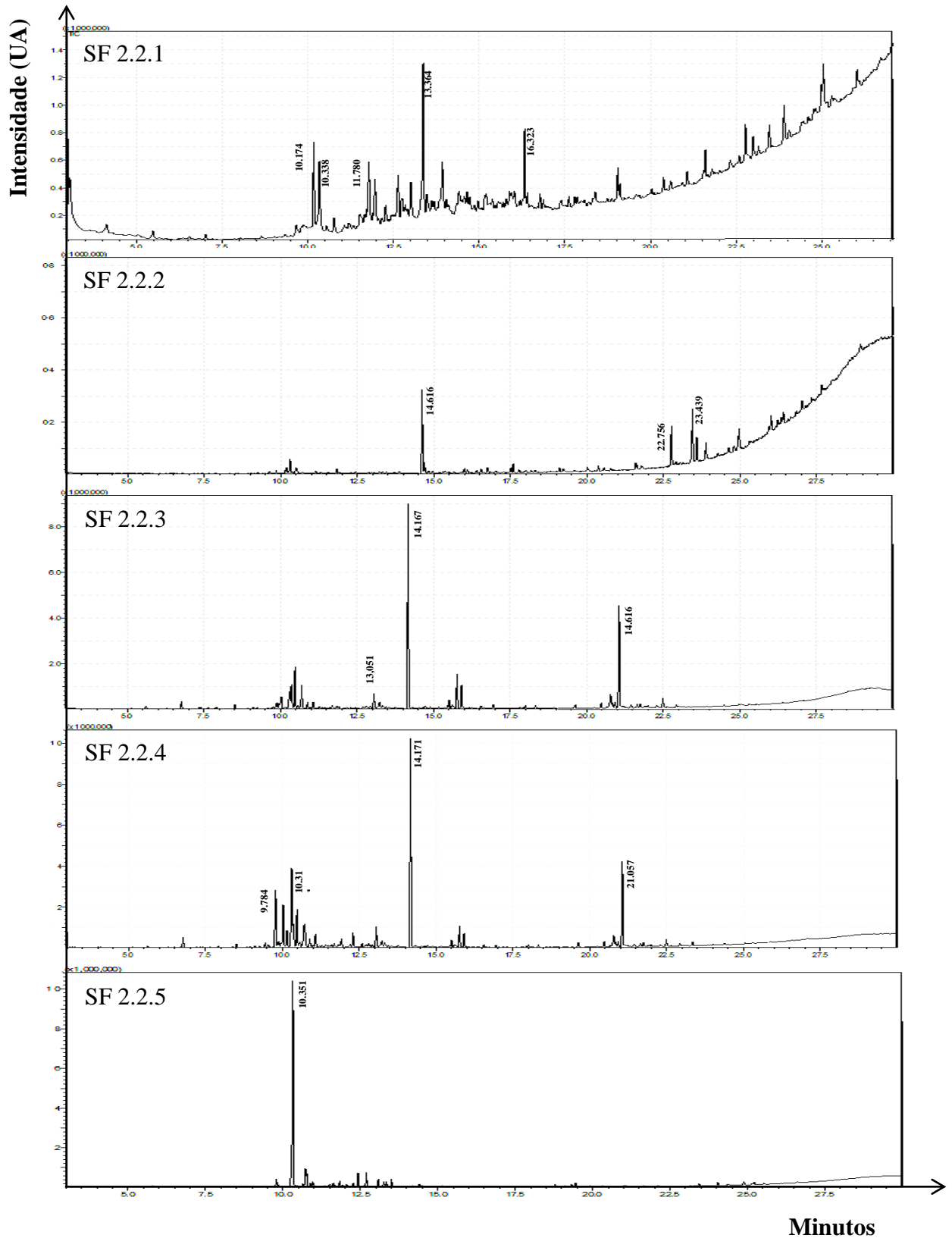


Figura 34 - Perfis cromatográficos obtidos por cromatografia gasosa em CG-MS das sub-frações originadas da Fr2Ppg. As temperaturas do injetor e detector foram 220°C e 290°C, respectivamente. A programação de temperatura utilizada foi de 100°C até 300°C com gradiente de 7C°/minuto. Foi aplicado 1 µL de cada amostra solubilizada em metanol.

Tabela 2 – Identificação de componentes das sub-frações SF 2.1 e SF 2.2 através da biblioteca NIST do GC-MS, com seus respectivos índices de similaridade.

Compostos	T _R (min)	Índice de similaridade (%)
1- Heptadeceno	13,357	97%
1- Nonadeceno	16,317	93%
Óxido de cariofileno	10,163	95%
Óxido de cariofileno	10,267	95%
Trans-farnesil acetato	13,051	90%
Trans-farnesil acetato	14,167	95%

5 DISCUSSÃO

Uma revisão na literatura mostra claramente que nos últimos 25 anos, pouco, se nenhum campo na ciência da América Latina tem progredido tão rapidamente como a pesquisa em produtos naturais. Também são relevantes os esforços para estabelecer colaboração entre universidades e indústrias farmacêuticas, com o objetivo de produzir novos medicamentos aprovados por segurança, qualidade e eficácia (Calixto, 2005).

A natureza se desenvolveu ao longo do tempo para produzir uma grande diversidade de metabólitos secundários. Os extratos de produtos naturais representaram durante anos os únicos medicamentos disponíveis para o homem, que se baseavam em observações e folclore popular. Entretanto, extratos brutos ainda são considerados como principal ferramenta no combate às enfermidades no mundo ocidental (Ganesan, 2008).

Como a espécie *Pterodon polygalaeflorus* é conhecida popularmente pelo seu potencial anti-inflamatório e é largamente utilizada no tratamento de diversas enfermidades. Este trabalho teve como objetivo analisar e confirmar esse efeito, através de modelos *in vivo* de inflamação e biomonitorar o fracionamento do ExHPpg, como forma de contribuir para o conhecimento etnofarmacológico desta espécie.

A inflamação é uma resposta adaptativa acionada por estímulo nóxico e condições como infecção e dano tecidual (Uddin e Levi, 2011). A resposta inflamatória aguda é uma sequência de eventos coordenados que envolvem diversas alterações moleculares, celulares e fisiológicas. O processo inicia-se com a produção de mediadores pelas células residentes (macrófagos, células dendríticas, linfócitos, células endoteliais, fibroblastos e mastócitos) que promovem a exsudação de proteínas e influxo de leucócitos do sangue. Os leucócitos, tipicamente neutrófilos, inicialmente, fagocitam e eliminam microrganismos invasores através de mecanismos intracelulares, acompanhados de processos anti-inflamatórios e pró-resolutivos que bloqueiam o excessivo recrutamento contínuo de neutrófilos e formação de edema (Stables e Gilroy, 2011).

As plantas podem produzir diferentes tipos de metabólitos secundários, os quais vêm sendo usados pelo homem por suas diversas características e aplicações (Zwenger e Basu, 2008).

O fracionamento biomonitorado de extratos de plantas medicinais, realizado por técnicas cromatográficas de separação, leva ao isolamento dessas moléculas e outras biologicamente ativas, cuja estrutura química pode ser determinada por métodos espectroscópicos modernos, como por exemplo, Espectrometria de Massa, Ressonância

Magnética Nuclear, Ultra Violeta e Infra Vermelho, (Philipson, 2003). Terpenoides são definidos como metabólitos secundários com estruturas moleculares contendo esqueletos de unidades de isopreno (2-butametil- 1,3 dieno). Mais de 36.000 terpenoides já foram identificados, fazendo deste grupo o maior de metabólitos secundários (Yamunadevi, 2011). Brinker e colaboradores (2007) descreveram a redução da resposta inflamatória e autoimune, utilizando o diterpeno do gênero *tripterygium* em experimentação biológica.

Depois de demonstrada a ação anti-inflamatória do ExHPpg, o mesmo foi submetido ao fracionamento em coluna de sílica gel 60. Obtiveram-se quatro frações (Fr1Ppg, Fr2Ppg, Fr3Ppg e Fr4Ppg). As frações Fr2Ppg e Fr4Ppg foram as de maior rendimento com 26,6 e 37,4%, respectivamente (Tabela 1) e destas a fração Fr2Ppg foi a que apresentou maior ação anti-inflamatória, sendo por esta razão sub-fracionada. Realizou-se cromatografia de camada delgada (TLC) com revelação para terpenoides para análise do conteúdo do conteúdo do ExHPpg, frações e sub-frações obtidas de *Pterodon polygalaeflorus*. A cromatografia por TLC é um método simples de análise usado na separação dos constituintes de uma mistura. Na fina camada de adsorvente (sílica, alumina, etc.) depositada sobre uma superfície plana os constituintes migram de forma diferenciada envolvendo interações intermoleculares entre os constituintes, o eluente e o adsorvente utilizado (Moura *et al.*, 1997).

Neste trabalho, a análise cromatográfica por TLC realizada para ExHPpg, frações e sub-frações foi realizada com fase móvel de elevada apolaridade permitindo a melhor distribuição de compostos mais apolares através da sílica. Após revelação para terpenoides uma grande quantidade de bandas foi observada para o ExHPpg (Figura 15) demonstrando grande complexidade de substâncias. Esse perfil mostrou-se semelhante ao exibido para a Fr3Ppg, com uma faixa extensa de substâncias polares (mais próximas da origem). Para as frações Fr1Ppg e Fr2Ppg, houve concentração de bandas (uma a duas) em uma região mais apolar, visto que se encontraram ao final da corrida na placa. A fração Fr4Ppg apresentou maior predominância de bandas no início da corrida, mostrando o caráter mais polar dos compostos dessa fração, com quatro bandas mais evidentes. As características de polaridade apresentadas pelas substâncias presentes nas frações, nas condições realizadas da TLC, estão de acordo com as condições de fracionamento (Sílica gel- 60) e eluição (misturas solventes utilizadas) no fracionamento do ExHPpg. Além disso, foi realizada cromatografia por fase gasosa acoplada à espectrômetro de massas para avaliação do perfil das frações (Figura 16).

A análise de metabólitos de plantas é frequentemente realizada utilizando ensaios enzimáticos específicos ou técnicas cromatográficas como HPLC ou GC, os quais registram o tempo de retenção das substâncias e o utiliza como parâmetro para a identificação de

compostos comparados a substâncias padrões (Roessner *et al.*, 2000). De outra forma, tais metodologias podem ser associadas à espectrometria de massas, RMN, etc., também para identificar as substâncias presentes na amostra.

Neste trabalho, o perfil cromatográfico por GC-MS da Fr1Ppg apresentou predominância de picos em região indicativa de maior apolaridade de substâncias, característica já observada para essa fração no perfil cromatográfico por TLC. A Fr2Ppg apresentou picos distribuídos por toda a placa, com menor intensidade que a Fr1Ppg, porém exibiu pico majoritário com tempo de retenção de 10,355 minutos. As frações Fr3Ppg e Fr4Ppg exibiram cromatogramas com picos em regiões mais polares. Desta forma, o fracionamento permitiu separar, a partir do ExHPpg frações com diferentes substâncias.

A fim de estudar o perfil de substâncias presentes na fração Fr2Ppg, por esta ter apresentado ação anti-inflamatória significativa, realizou-se o sub-fracionamento da mesma. Este também foi monitorado por TLC (Figura 24) e também analisado por cromatografia em fase gasosa (Figura 25). As bandas, no geral, apresentaram boa separação em função dos eluatos coletados da coluna de sílica. A sequência de eluatos (1 a 26) apresentou bandas de diversas colorações indicando diversidade de compostos. As diferentes polaridades das substâncias eluídas da coluna também estão de acordo com as misturas de solventes usados na eluição da coluna.

Visando determinar possíveis substâncias presentes nas sub-frações SF 2.1 e SF 2.2, buscou-se uma menor complexidade dessas amostras, reduzindo o número de eluatos reunidos em cada subgrupo (Figuras 33 e 34). Os cromatogramas referentes a tais subdivisões exibiram grande distribuição dos picos indicando extensa diferença de apolaridade das substâncias presentes nas sub-frações. A identificação e alguns desses componentes foram sugeridos (Tabela 2) de acordo com seus tempos de retenção e índices de similaridade de acordo com a biblioteca NIST do GC-MS. A SF 2.1.2 apresentou dois picos, dentre os majoritários, com índices de similaridade de 95% com a estrutura do Óxido de cariofileno. Estudos fitoquímicos realizados por Teixeira (2003) no extrato hexânico de *Pterodon emarginatus* mostraram a presença de ácidos graxos, sesquiterpenos, (α -cariofileno, β -cariofileno, mirceno, α -pineno, farneseno) e diterpenos tricíclicos furânicos com o isolamento do $6\alpha,7\beta$ -diacetoxivouacapano-17 β -oato de metila. O óxido de cariofileno foi isolado da espécie de planta *Annona squamosa* por Chavan e colaboradores (2010), e foi atribuída a essa substância as atividades analgésica e anti-inflamatória em modelos animais de nocicepção induzida por ácido acético e edema de pata induzido por carragenina. Além disso, a sub-fração 2.2.3 exibiu dois picos majoritários, com 90 e 95% de índice de similaridade com compostos derivados do Trans-farnesil acetato.

Dutra e colaboradores (2009) exibiram o perfil químico do óleo essencial de sementes de *Pterodon emarginatus* o qual apresentou percentuais de óxido de cariofileno e farnesil acetato em sua composição. Foram avaliadas as atividades anti-ulcerogênica e anti-inflamatória em modelos animais.

O biomonitoramento inicial das frações Fr1 a Fr4, obtidas do ExHPpg, foi realizado empregando o modelo de edema de pata induzido por carragenina (Figura 17), visando sua comparação com o efeito já observado para o ExHPpg (Vigliano, 2010). Este modelo experimental, originalmente descrito para ratos por Winter e colaboradores (1962), é muito utilizado para avaliar o potencial anti-inflamatório de fármacos. A carragenina é um polissacarídeo proveniente de alga marinha, sendo considerada um agente edematogênico não específico, que promove a liberação de vários mediadores quando injetada na pata do animal (Winter *et al.*, 1962). A resposta inflamatória é frequentemente avaliada pelo aumento no tamanho da pata (edema), e é modulada por diversas moléculas (Morris, 2003). O edema de pata induzido por carragenina em camundongos é similar ao que foi mostrado por Winter e colaboradores (1962) em ratos. O modelo é bifásico, a primeira fase ocorrendo até 24 h e a segunda entre 24 e 72 h após a injeção de carragenina (Henriques *et al.*, 1987). Durante a primeira fase são descritos três estágios da resposta inflamatória. O primeiro estágio (1 h) envolve a liberação de histamina e serotonina, e é seguido de um segundo estágio (2 h), mediado por cininas, principalmente bradicinina. e finalmente o último estágio (3-4 horas após o estímulo) é atribuído à produção local de prostaglandinas, especialmente aquelas das séries E (Morris, 2003).

As frações Fr1Ppg e Fr2Ppg (Figura 13) foram as que apresentaram melhores resultados no modelo de edema de patas induzido por carragenina, inibindo significativamente o edema ($P < 0,05$) em diferentes estágios do modelo. Embora ambas as frações tenham apresentado potencial anti-inflamatório, neste trabalho foi priorizada a Fr2Ppg para prosseguimento dos estudos em função de seu maior rendimento no fracionamento. Neste trabalho foi utilizada a droga padrão indometacina, um anti-inflamatório não esteroideais (AINES). Os AINES representam as mais antigas e satisfatórias drogas conhecidas na medicina moderna e são efetivos para alívio da dor, febre e inflamação pela inibição da síntese de prostaglandinas (Vonkeman e Van de Laar, 2010-). Como esperado, a indometacina foi eficaz nos tratamentos dos animais nos modelos testados inibindo a inflamação em torno de 70%. Se comparado ao tratamento exercido pela indometacina, o tratamento com as doses de ExHPpg, frações e sub-frações foi capaz de inibir os índices inflamatórios.

Visto que, a primeira linha de defesa imunológica do organismo é a resposta inata imune, na qual participam ativamente os neutrófilos e visando avaliar se o tratamento poderia estar interferindo na migração desses neutrófilos na inflamação aguda buscou-se avaliar a presença destas células no exsudato da cavidade dos animais no modelo *air pouch*. Este modelo foi primeiramente descrito por Selye (1953) e tem sido utilizado como uma importante ferramenta para se avaliar mecanismos da resposta inflamatória a uma série de agentes químicos, incluindo zimosan e carragenina (Kon *et al.*, 1999). Embora existam outros modelos experimentais para estudar a resposta inflamatória aguda, como a pleurisia e a peritonite, a bolha de ar subcutânea apresenta a vantagem de ser de fácil desenvolvimento e manutenção e de permitir diversas análises nos fluidos nela formados (Sedgewick *et al.*, 1985). A injeção de um irritante no interior da cavidade induz uma resposta inflamatória que se assemelha à observada na articulação reumatoide (Ellis *et al.*, 2000). Estudos realizados por García-Ramallo e colaboradores (2002) mostraram o papel das células residentes no desenvolvimento da inflamação. Tais células quando estimuladas, liberam TNF- α , responsável pela indução da síntese de quimiocinas e, como consequência a migração de leucócitos. Outras citocinas como IL-1 e IL-6 também participam deste processo.

Neste trabalho o estímulo da inflamação foi feito por injeção de carragenina 1%, no interior da cavidade dorsal formada em camundongos. A indução da inflamação foi eficiente com média de $36,7 \pm 14,7$ milhões de células nos grupo carragenina se comparada à média de células de animais que receberam injeção de 1 mL de salina estéril 0,9% ($1,2 \pm 0,8$ milhões de células) (Figuras 14A, 19A e 27 A, B, C, D e E), o que representa um aumento médio de 96,8% de células no exsudato. Estes resultados estão de acordo com Romano e colaboradores (1997), que verificaram que o estímulo com carragenina 1% na cavidade da bolha de camundongos machos CD1, levou a uma média de migração de $28,95 \pm 8,4$ milhões de células.

O tratamento com a droga padrão mostrou-se efetivo na redução do número de células, se comparada ao grupo carragenina, apresentando média de $9,1 \pm 5,4$ milhões de células, o que representa uma redução média de 75,2% no número total de leucócitos (Figuras 14A, 19A e 27 A, B, C, D e E). Ambas as doses do Extrato hexânico de *Pterodon polygalaeiflorus* (ExHPpg) testadas, exibiram redução do número de células em relação ao grupo carragenina, com percentual de inibição de 70,6% e 62,94%, respectivamente. Estudos anteriores em nosso laboratório também demonstraram uma atividade analgésica do ExHPpg no modelo de nocicepção induzida por formalina em camundongos (Pinto, 2006).

Para avaliação dos efeitos do ExHPpg nos tipos celulares envolvidos na resposta inflamatória desenvolvida na bolha, realizou-se a contagem diferencial de leucócitos nos exsudatos coletados da mesma em cada grupo de animais. Foi observada a predominância de neutrófilos no exsudato da bolha dos grupos controle positivo de carragenina, o que já é descrito na literatura para este modelo (Morikawa *et al.*, 2003). Não se observou também diferenças significativas dos tratamentos com as amostras de Ppg ou indometacina no número de monócitos, linfócitos e eosinófilos (dados não mostrados). Desta forma, os efeitos dos tratamentos na migração celular para a bolha foram mostrados apenas sobre a contagem total de células e número de neutrófilos presentes nestes exsudatos (Figuras 14 e 19).

Também foi realizada a dosagem de conteúdo total de proteína no exsudato dos diferentes grupos, a fim de verificar alterações da concentração proteica, visto que durante o processo inflamatório agudo há extravasamento de proteínas plasmáticas (Francischetti *et al.*, 2010). Os exsudatos de animais que receberam a menor dose de ExHPpg, Fr2Ppg, SF 2.1 e SF 2.2 (0,02 mg/kg), os quais apresentaram menor número de neutrófilos na bolha, também apresentaram maior redução na concentração de proteína em relação ao grupo carragenina e à dose de 0,2 mg/k. Em contrapartida, o tratamento com a maior dose (0,2 mg/kg) funcionou apenas para ExHPpg e Fr2Ppg (Figuras 15, 20 e 28 A e B).

A reação inflamatória é um fenômeno estereotipado cujos sinais cardinais foram primeiro descritos por Celsus (40 a.C.) como sendo rubor, tumor, calor e dor. A estes, Galeno adicionou a perda de função. No século XVII, John Hunter sugeriu que os sinais observados na inflamação poderiam ocorrer devidos à liberação de substâncias químicas no local da reação.

Os tecidos seccionados do dorso dos animais no ensaio da bolha de ar, foram analisados macroscopicamente para avaliação das alterações vasculares e teciduais após os tratamentos ou não com as amostras de Ppg. É possível visualizar aumento do calibre dos vasos e vermelhidão nos tecidos dos animais do grupo carragenina (Figuras 16A, 21A, 29A e F), o que não é observado nos tecidos dos animais que recebem apenas injeção de salina estéril, como esperado (Figuras 12C, 21C e 29 (C e H)).

O tratamento com indometacina reduziu principalmente a vasodilatação (Figuras 16B, 21B e 29 (B e G)), assim como o tratamento com o ExHPpg (Figura 16D e 16E) Fr2Ppg (Figura 21D e 21E), SF 2.1 (Figuras 29D e 29E) e SF 2.2 (Figuras 29I e 29J), embora a eficiência do efeito com as doses varie entre as amostras.

Em seguida, esses tecidos foram submetidos à processamento histológico para avaliação de redução ou não de infiltrado inflamatório e espessamento da derme no tecido. Após processamento dos tecidos da bolha para análise histológica observou-se que o tecido de animais do grupo carragenina (Figuras 16, 22 e 30 (C e D)), apresentaram grande infiltrado inflamatório, principalmente nas camadas mais internas e espessamento da pele, características não apresentadas em tecidos de animais dos grupos salina (Figuras 17, 22 e 30 (A e B)). Com exceção da maior dose da Fr2Ppg (Figuras 23C e 23D), ambas as doses do ExHPpg (Figura 18) e das doses de SF 2.1 (Figuras 31D e 32E) e SF 2.2 (Figuras 32I e 32J), além da dose 0,02 mg/kg da Fr2Ppg (Figuras 23A e 23B) reduziram o infiltrado inflamatório assim como o tratamento com a indometacina (Figuras 17, 22 e 30 (E e F)).

A análise conjunta dos resultados com a maior dose da Fr2Ppg no modelo da bolha não mostra ação anti-inflamatória importante, não reduzindo significativamente a vasodilatação ou a migração de neutrófilos para o exsudato ou extravasamento de proteínas ou o infiltrado inflamatório na camada mais interna do tecido removido da bolha. Já o tratamento com a dose 0,02 mg/kg foi efetivo em todos esses parâmetros.

O tratamento com a indometacina reduziu o infiltrado inflamatório (17, 22 e 30 (E e F)) assim como o tratamento, com exceção da maior dose da Fr2Ppg as doses 0,02 e 0,2 mg/kg (Figuras 18, 23, e 31 (A, B, C e D)).

A transmigração de leucócitos do sangue através das células endoteliais (CE) que revestem os vasos sanguíneos, geralmente vênulas pós-capilares para o local da injúria é um estágio inicial da resposta inflamatória (Lally *et al.*, 2005). Essa migração celular é um processo crítico, não só para a resposta inflamatória, mas também para os vários estágios do desenvolvimento embrionário, e essencial para reparo tecidual e função imune (Valster *et al.*, 2005).

Já foi constatado por contagem diferencial que os leucócitos apresentam em torno de 95% de neutrófilos no exsudato de animais do grupo induzido com carragenina no modelo de bolha de ar. Dada à importância do fenômeno de migração celular para o processo inflamatório objetivou-se avaliar também o efeito da Fr2Ppg sob a migração *in vitro* de neutrófilos através do ensaio de transwell (Figura 20). O quimioatraente utilizado (sobrenadante recolhido do exsudato da bolha) estimulou a migração de cerca de 45% das células mostrando-se um quimioatraente eficiente para esse modelo.

Dentre as concentrações testadas, a de 80 µg Fr2Ppg/mL exibiu um índice de inibição significativo da migração de neutrófilos de 31,4% em relação ao índice de migração exercido pelo quimioatraente, assim como a indometacina.

O presente estudo mostrou evidências significativas do potencial anti-inflamatório da espécie *Pterodon polygalaeflorus*, inibindo consideravelmente o processo inflamatório a nível celular e tecidual e permitiu um fracionamento satisfatório em relação à separação de compostos e ação farmacológica. Tais resultados estimulam que sejam realizados estudos mais aprofundados, relacionados ao isolamento de substâncias e mecanismos de ação sobre o sistema imune e processo inflamatório.

6 CONCLUSÃO

De posse dos dados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

- O tratamento com ExHPpg e Fr2Ppg foi capaz de reduzir o índice de edema em modelo de inflamação aguda (Edema de pata);
- O modelo de Bolha de ar mostrou-se satisfatório para avaliação da redução do número de células e do teor de proteína, presentes no exsudato inflamatório de animais tratados com ExHPpg, Fr2Ppg, SF 2.1 e SF 2.2.
- As análises macroscópica e histológica dos tecidos das bolhas de animais tratados com extrato, fração e sub-frações também mostraram efeitos anti-inflamatórios importantes como redução da vasodilatação e infiltrado de neutrófilos, respectivamente;
- O sobrenadante de exsudato inflamatório da bolha de ar mostrou-se eficiente como agente quimiotático *in vitro* para neutrófilos no ensaio de migração de células por *transwell*. A fração Fr2Ppg 80 µg/mL foi capaz de reduzir significativamente o índice dessa migração *in vitro* de neutrófilos;
- O fracionamento do ExHPpg, assim como o sub-fracionamento da Fr2Ppg foram eficientes em obter algumas frações/sub-frações com perfis cromatográficos diferenciados e rendimentos e ação farmacológica relevantes;
- Os resultados deste trabalho servirão de base para estudos posteriores em relação aos mecanismos envolvidos na ação anti-inflamatória do produto natural estudado.

REFERÊNCIAS

- Almeida, M.E.L., Gottlieb, O.R. Further isoflavones from *Pterodon apparicioi*. *Phytochem.* 1975; 14: 2714.
- Ammon, H.P.T.. Modulation of the immune system by *Boswellia serrata* extracts and boswellic acids. *Phytomed.* 2010; 17: 862-867.
- Arriaga, A.M.C.; Castro, M.A.B.; Silveira, E.R.; Braz-Filho, R.. Futher diterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. *J. Braz. Chem. Soc.* 2000;11: 187-190.
- Belinelo, VJ, Reis, GT, Stefani, GM, Ferreira-Alves, DL, Piló-Veloso, D. J. *Braz. Chem. Soc.* 2002; 13: 830-837.
- Berenbaum, F. COX-3: Fact or fancy? *Joint Bone Spine.* 2004; 71:451-453,.
- Braz-Filho, R., Gottlieb, O.R., Assumpção, R.M.V.. A química de leguminosas brasileiras. XXVIII [1] - As isoflavonas de *Pterodon pubescens*. *An. Acad. Brasil. Ciênc.*, 12 (Suplem.) 111-113, 1970.
- Braz-Filho, R., Gottlieb, O.R. The isoflavones from *Pterodon pubescens*. *Phytochem.* 10: 2835-2836, 1971.
- Brinker, A.M., Ma, J., Lipsky, P.E., Raskin, I. Medicinal chemistry and pharmacology of genus *Tripterygium* (Celastraceae). *Phytochem.* 68: 732-766, 2007.
- Burke-Gaffney, A., Hellewell, P.G.. Tumour necrosis factor- α -induced ICAM-1 expression in human vascular endothelial and lung epithelial cells: modulation by tyrosine kinase inhibitors. *Brit. J. Pharmacol.* 119: 1149-1158, 1996.
- Calixto, J.B.. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. *J. Ethnopharmacol.* 100: 131-134, 2005.
- Calixto, N.O., Silva, M.C.C., Gayer, C.R.M., Coelho, M.G.P., Paes, M.C., Todeschini, A.R.. Antiplatelet activity of geranylgeraniol isolated from *Pterodon pubescens* fruit oil is mediated by inhibition of Cyclooxygenase-1. *Planta Med.* 73: 480-483, 2007.
- Campos, A.M., Silveira, E.R., Braz-Filho, R., Teixeira, T.C.. Diterpenoids from *Pterodon polygalaeflorus*. *Phytochem.* 36: 403-406, 1994.
- Cardoso, C.C., Pinto, A.C., Marques, P.R., Gayer, C.R., Afel, M.I., Coelho, M.G., Sabino, K.C.. Suppression of T and B cell responses by *Pterodon pubescens* seeds ethanolic extract. *Pak. J. Biol. Sci.*, 1: 2308-2313, 2008.
- Carvalho, J.C.T., Sertie, J.A.A., Barbosa, M.V.J., Patrício, K.C.M., Caputo, L.R.G., Sarti, S.J., Ferreira, L.P., Bastos, J.K.. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. *J. Ethnopharm.* 64: 127-133, 1999.
- Chaplin, D. D.. Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125: 3-23, 2010.
- Chavan, M.J., Wakte, P.S., Shinde, D.B.. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomed.* 17: 149-151, 2010.

- Coelho, M.G.P., Marques, P.M., Gayer, C.R.M., Vaz, L.C.A., Neto, J.F.N., Sabino, K.C.C.. Subacute toxicity evaluation of a hydroalcoholic extract of *Pterodon pubescens* seeds in mice with collagen-induced arthritis. *J. Ethnopharm.* 77: 159-164, 2001.
- Coelho, M.G., Sabino, K.C., Dalmau, S.R.. Immunomodulatory effects of sucupira (*Pterodon pubescens*) seed infusion on collagen-induced arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 22: 213-218, 2004.
- Coelho, MGP., Sabino, KCC., Dalmau, SR. Immunomodulatory effects of sucupira (*P. pubescens*) seed infusion on collagen-induced arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 22: 213-218, 2004b.
- Coelho L.P., Reis, PA, de Castro, F.L., Gayer, C.R., da Silva Lopes, C., da Costa e Silva, M.C.C., de Carvalho Sabino, K.C., Todeschini, A.R., Coelho, M.G. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. *J Ethnopharmacol.* 98: 109-116, 2005.
- Coelho, LP, Reis, PA, Castro, FL, Gayer, CRM, Lopes, CS, Silva, MCC, Sabino, KCC, Todeschini, AR, Coelho, MGP. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. *J. Ethnopharmacol.* 98: 109-116, 2005a
- Coimbra, R.. Notas de fitoterapia. Catálogos dos dados principais sobre plantas utilizadas em medicina e farmácia. Araújo, C.S. Ed.. 1ª ed., p.222, 1942.
- Cruz, G. L.. Livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil. Belo Horizonte, MG. 1ª ed., v.2: p 779-780, 1965.
- Davies, D. E., Wicks, J., Powell, R.M., Puddicombe, S.M., Holgate, S.T.. Airway remodeling in asthma: New insights. *Curr. Rev. All. Clin. Immunol.* 111: 210-250, 2003.
- De Brito, F. B., Corry, D. G., Moore, A. R., Howat, D. E., Willoughby, D. A.. Polyarthritis and the air pouch reaction: dissimilarity of adjuvant and collagen models. *Immunopharmacol.* 15: 123-130, 1988.
- Demuner, A. J., Barbosa, L.C.A., Piló-Veloso, D., Ferreira-Alves, D.L., Howarth, O.W.. Structure and plant growth regulatory activity of new diterpenes from *Pterodon polygalaeflorus*. *J. Nat. Prod.* 59:770-772, 1996 De Omena, M.C., Bento, E.S., De Paula, J.E., Sant'Ana, A.E.. Larvicidal diterpenes from *Pterodon polygalaeflorus*. *Vect. Bor. Zoon. Dis. Sum.* 6: 216-222, 2006. De Vries, J.E., Carballido, J.M., Aversa, G.. Receptors and cytokines involved in allergic TH2 cell responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103: S492-S496, 1999.
- Dias, F.L., Takahashi, C.S., Sakamoto-Hojo, E.T., Vichnewski, W., Sarti, S.J.. Genotoxicity of the natural cercaricides "Sucupira" oil and eremanthine in mammalian cell *in vitro* and *in vivo*. *Environ. Mol. Mutagen.* 26: 338-344, 1995.
- Dos Santos Filho, D., Vichnewski, W., Baker, P.M., Gilbert, B.. Prophylaxis of Schistosomiasis: Diterpenes from *Pterodon pubescens* Benth. *An. Acad. Brasil. Ciênc.* 44: 45-49, 1972.
- Duarte, I.D.G., Ferreira-Alves, D.L., Veloso, D.P., Nakamura-Craig, M.. Possible participation of endogenous opioid peptides on the mechanism involved in analgesia induced by vouacapan. *Life Sci.* 50: 891-897, 1992.
- Duarte, I.D.G., Ferreira-Alves, D.L., Veloso, D.P., Nakamura-Craig, M.. Evidence of the involvement of biogenic amines in the antinociceptive effect of a vouacapan extracted from *Pterodon polygalaeflorus* Benth.. *J. Ethnopharmacol.* 55: 13-18, 1996.

Dutra, R.C., Leite, M.N., Barbosa, N.R.. Quantification of Phenolic Constituents and Antioxidant Activity of *Pterodon emarginatus* Vogel Seeds. *Int. J. Mol. Sci.* 9: 606-614, 2008.

Dutra, RC, Fava, MB, Alves, CC, Ferreira, AP, Barbosa, NR. Antiulcerogenic and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Pterodon emarginatus* seeds. *J. Pharm. Pharmacol.* 61: 243-250, 2009.

Edwards, J.C., Sedgwick, A. D., Willoughby, D.A.. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. *J. Pathol.* 134: 147-156, 1981.

Ellis, L., Gilston, V., Soo, C., Morris, C., Kidd, B., Winyard, P.. Activation of the transcription factor nf-kb in the rat air pouch model of inflammation. *Ann. Rheum. Dis.* 59: 303-307, 2000.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em <http://www.embrapa.br>, 2008.

Euzébio, F.P.G., Dos Santos, F.J.L., Piló-Veloso, D., Ruiz, A.L.T.G, Carvalho, J.E., Ferreira-Alves, D.L., De Fátima, A.. Effect of 6alfa,7beta-Dihydroxyvouacapan-17beta-oic Acid and Its Lactone Derivatives on the Growth of Human Cancer Cells. *Bioorg. Chem.* 37: 96-100, 2009.

Euzébio, FPG, dos Santos, FJL, Piló-Veloso, D, Ruiz, ALTG, Carvalho, JE, Ferreira-Alves, DL, de Fátima, A. Synthesis, antiproliferative activity in cancer cells and theoretical studies of novel 6alfa,7beta-dihydroxyvouacapan-17beta-oic acid Mannich base derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 18: 8172-8177, 2010.

Fascio, M., Gilbert, B., Mors, W.B., Nishida, T. Two new diterpenes from *Pterodon pubescens* Benth. *An Acad Bras Ciênc.* 42 (Suplem), 97-101, 1970.

Fascio, M., Mors, W.B., Gilbert, B., Mahajan, J.R., Monteiro, M.B., Dos Santos, F. D., Vichnewsky, W.. Diterpenoids furans from *Pterodon pubescens* species. *Phytochemistry* 15: 201-203, 1976.

Flower, R., Gryglewski, R., Herbaczynska-Cedro, K., Vane, J.R.. Effects of anti-inflammatory drugs on prostaglandin biosynthesis. *Nature* 238: 104-106, 1972.

Francischetti, I., Moreno, J. B., Scholz, M., Yoshida, W. B.. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperusão. *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.* 25: 575-584, 2010.

Galina, E. & Gottlieb, O.R.. Isoflavones from *Pterodon apparicioi*. *Phytochem.* 13: 2593-2595, 1974.

Ganesan, A.. The impact of natural products upon modern drug discovery. *Curr. Op. Chem. Biol.* 12: 306-317, 2008.

Garcia-Ramallo, E; Marques, T; Prats, N.. Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. *Journal of immunology*, 169(11): 6467-73, 2002.

Gartner, L.P., Hiatt, J.L. *Tratado de histologia em cores.* 1ª Ed. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2003.

- Gilbert, B., De Souza, J.P., Fascio, M., Kitagawa, M., Nascimento, S.S.C., Fortes, C.C., Do Prado, S.A., Pellegrino, J.. Esquistossomose: Proteção contra infecção por terpenóides.. An. Acad. Brasil. Ciênc., 42 (Suplem.): 397-400, 1970.
- Gilligan, J.P., Lovato, S.J., Erion, M.D., Jeng, A.Y.. Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P. Inflammation. 18: 285-292, 1994.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M.. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem. 177: 751-766, 1949.
- Greene, E.R., Huang, S., Serhan, C.N., Panigrah, D.. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. Prostagl. Lipid Mediat. 96: 27-36, 2011.
- Hart, P.H., Vitti, G.F., Burgess, D.R., Whitty, G.A., Piccoli, D.S., Hamilton, J.A.. Potential antiinflammatory effects of Interleukin 4: Suppression of human monocyte tumor necrosis factor α , interleukin 1, and prostaglandin E2. Med. Scienc. 86: 3803-3807, 1989
- Hart, P.H., Cooper, R.L., Finlay-Jones, J.J.. IL-4 suppresses IL-1, TNF- α and PGE2 production by human peritoneal macrophages. Immunology 72: 344-349, 1991.
- Haydek J.M., Keshavarzian A.. Circulating neutrophils from patients with ulcerative colitis have a normal respiratory burst. Inflammation 19:701-715, 1995.
- Henriques, M.G., Silva, P.M., Martins, M.A., Flores, C.A., Cunha, F.Q., Assreuy-Filho, J.; Cordeiro, R.S.. Mouse paw edema. A new model for inflammation? *Braz. J. Med. Biol. Res.* 20: 243-249, 1987.
- Hickey, M.J.. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of leucocyte recruitment. Clin. Sci. 100: 1-12, 2001.
- Imig, J.D., Hammock, B.D.. Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases. Nature 8:794-805, 2009.
- Jung, H.W., Jung, J.K., Sonc K.H., Lee, D.H., Kang, T.M., Kim, Y.S., Parka, Y.. Inhibitory effects of the root extract of *Dipsacus asperoides* on collagen-induced arthritis in mice. J. Ethnopharmacol. 139: 98-103, 2012.
- Khatsenko, O.G., Gross, S.S., Rifkind, A.B., Vane, J.R.. Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 11147-11151, 1993.
- Kon, Y., Tsukada, H., Hasegawa, T., Igarashi, K., Wada, W.. The role of *Pseudomonas aeruginosa* elastase as a potent inflammatory factor in a rat air pouch inflammation model. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 25: 313-321, 1999.
- Korn, T., Oukka, M., Kuchroo, V., Bettelli, E.. Th17 cells: Effector T cells with inflammatory properties. Sem. Immunol. 19: 3626-371, 2007.
- Kovanen, P. E., Leonard, W.J.. Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gc-dependent cytokines interleukins2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. Immunol. Rev. 202: 67-83, 2004.
- Kumar, V., Shrama, A.. Neutrophils: Cinderella of Innate Immune System. Internat. Immunopharmacol. 10: 1325-1334, 2010.

- Kummer, C. L., Coelho, T. C. R. B.. Cyclooxygenase-2 Inhibitors Nonsteroid Anti-Inflammatory Drugs. *Current Issues Rev. Bras. Anesthesiol.* 52: 498-512, 2002.
- Lawrance, T., Willoughby, D.A., Gilroy, D.W.. Chronic inflammation: a failure of resolution? *Internat. J. Exp. Pathol.* 88: 85-94, 2007.
- Liew, F.Y.. The role of innate cytokines in inflammatory response. *Immunol. Let.* 85: 131-134, 2003.
- Liew, F.Y., Xu, D., Brint, E.K., O'Neill, L.A. J.. Negative regulation of Toll-like receptor mediated immune responses. *Nature Immunol.* 5: 446-458, 2005
- Lin, Q., Li, M., Fang, D., Fang, J., Su, S.B.. The essential roles of Toll-like receptor signaling pathways in sterile inflammatory diseases. *Int. Immunopharmacol.* 11: 1422-1432, 2011.
- Luster, A.D., Alon, R., Andrian, U.H.V.. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nature Immunol.* 6: 1182-1190, 2005.
- Maciel, M.A.M., Pinto, A.C., Veiga jr., V.F.. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* 25: 429-438, 2002.
- Mackay, C.R.. Chemokines: immunology's high impact. *Nature* 2: 95-101, 2001.
- Mackay, C.R.. Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. *Nature Immunol.* 9: 988-998, 2008.
- Mahajan, J.R., Monteiro, M.B.. New diterpenoids from *Pterodon emarginatus* Vog.. *An. Acad. Brasil. Ciênc.*, 42 (Suplem.): 103-106, 1970.
- Mahajan, J.R., Monteiro, M.B. New diterpenoids from *Pterodon emarginatus* Vog. *J. Chem.Soc. Perkin. Trans.* 4 (Suplem.): 520-525, 1973.
- Malinin, A., Oshrine, B., Serebruany, V.. Treatment with selective serotonin reuptake inhibitors for enhancing wound healing. *Med. Hypotheses* 63: 103-109, 2004.
- Marques, D.D., Machado, M.I.L., De Carvalho, M.G., Meleira, L.A.C., Braz-Filho, R.. Isoflavonoids and triterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. *J. Braz. Chem. Soc.* 9: 295-301, 1998.
- Martin, S.W., Stevens, A. J., Brennan, B.S., Davies, D., Rowland, M., Houston, J. B.. The Six-Day-Old Rat Air Pouch Model of Inflammation: Characterization of the Inflammatory Response to Carrageenan. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* 32: 139-147, 1994.
- Menna-Barreto, R.F.S, Laranja, G.A.T, Silva, MCC, Coelho, MGP, Paes, MC, Oliveira, MM, de Castro, SL. Anti-Trypanosoma cruzi activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. *Parasitol. Res.* 103: 111-117, 2008.
- Morikawa, K., Nonaka, M., Narahara, M., Torii, I., Kawaguchi, K., Yoshikawa, T., Kumazaw, Y., Morikawa, S.. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sci.* 74: 709-721, 2003.
- Morris C.J.. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods. Mol. Biol.* 225:115-2, 2003.

- Mors, W.B., Pellegrino, J., Dos Santos Filho, M.F.. Ação profilática do óleo dos frutos de Sucupira-Branca, *Pterodon pubescens* Benth. contra a infecção pelo *Schistosoma mansoni*.. An. Acad. Brasil. Ciênc. 38(Suplem.): 325-330, 1966.
- Mors, W.B., Dos Santos Filho, F., Monteiro, H.J., Gilbert, B., Pellegrino, J.. Chemoprophylactic agent in schistosomiasis: 14,15-epoxygeranylgeraniol. Science, 157: 950-951, 1967.
- Moser, B., Wolf, M., Walz, A.. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. Trend. Immunol. 25: 75-84, 2004.
- Moura, M., Oliveira, C., Flach, A., Costa, L. A.M.. Cromatografia em camada delgada na pesquisa de biodiesel: despertando para o ensino de química. Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 31a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 1997.
- Neto, J.J. Contribuição ao estudo farmacognóstico dos frutos de *Pterodon pubescens* (Benth) Benth. Parte III – Identificação cromatográfica em fase gasosa, química e ação microbiológica do óleo do fruto. Rev. Fac. Farm. Odont. Araraq. 10: 317-27, 1976.
- Nunam, E.A., Carvalho, M.G., Pilo-Veloso, D., Turchetti-Maia, R.M.M., Ferreira Alves, D.L. Furane diterpenes with anti- and proinflammatory activity. Braz. J. Med. Res. 15: 450, 1982.
- Ouyang, W., Kollis, J. K., Zheng, Y.. The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. Immunity 28: 454-467, 2008.
- OMS, Organização Mundial da Saúde. Disponível em <http://www.oms.org/>, 2008
- Panigrahy, D., Kaipainen, A., Greene, E.R., Huang, S.. Cytochrome P450-derived eicosanoids: the neglected pathway in câncer. Cancer Metast. Rev. 29: 723-735, 2010.
- Paula, FBA, Gouvêa, CMCP, Alfredo, PP, Salgado, I. Protective action of a hexane crude extract of *Pterodon emarginatus* fruits against oxidative and nitrosative stress induced by acute exercise in rats. BMC Complem. Alternat. Med. 5: 17, 2005.
- Pedersoli, J. L.. Contribuição ao conhecimento do gênero *Pterodon* Benth. *Pterodon apparicioi* Pedersoli, n. sp.. Acad. Brasil. Ciênc., 42 (Suplem): 391-395, 1970.
- Pena, M. Dicionário Brasileiro de Plantas Mediciniais. 2ª Ed. Livraria Kosmos Editora. 1946. pp.64-65.
- Pereira, M.F., Simão, T.A., Dalmau, S.R., Albano, R.M., Coelho, M.G.P., Sabino, K.C.C.. *Pterodon pubescens* seed extract induces the cell cycle arrest of leukemic cells by deregulating cyclin D1 and E2 mRNA levels. Onc. Letters 1: 533-536, 2010.
- Pereira, M.F., Martino, T., Dalmau, S.R., Albano, R.M., Ferezou, J., Costa, S.S., Coelho, M.G.P., Sabino, K.C.C.. Terpenic subfraction of pterodon pubescens induces apoptosis of k562 leukemic cells by modulating gene expression. Oncol. Rep. 25: 215-221, 2011.
- Philipson, J.D.. 50 Years of Medicinal Plant Research – Every Progress in Methodology is a Progress in Science. Planta Med. 69: 491-495, 2003.
- Pinto, F.A.. Fracionamento Biomonitorado do Extrato Hexânico de *Pterodon polygalaeiflorus* pela Atividade Antinociceptiva. Dissertação de Mestrado em Biologia, UERJ, 2010.

- Proudfoot, A.E.I. Chemokine Receptors: Multifaceted Therapeutic Targets. *Nature Rev. Immunology*. 2: 106-115, 2002.
- Rathé, C., Ennaciri, J., Gonçalves, D. M. G., Chiasson, S., Girard, D.. Interleukin (IL)-4 Induces Leukocyte Infiltration In Vivo by an Indirect Mechanism. *Mediat. Inflamm.* doi 10.1155/2009/193970, 2009.
- Renton, KW. Hepatic drug metabolism and immunostimulation. *Toxicol.* 142:173-178, 2000.
- Rodriguez-Vita, J., Lawrence, T.. The resolution of inflammation and cancer. *Cytok. Growth Fact. Rev.* 21: 61-65, 2010.
- Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R.N., Willmitzer, L.. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography–mass spectrometry. *Plant J.* 23: 31-142, 2000.
- Romano, M., Faggioni, R., Sironi, M., Sacco, S., Echtenacher, B., Di Santo, E., Salmona, M., Ghezzi.. Carrageenan-induced acute inflammation in the mouse air pouch synovial model. Role of tumour necrosis factor. *Mediators Inflamm.* 6: 32-38, 1997.
- Sabino, K.C.C.. Estudo do efeito do óleo de semente de sucupira (*Pterodon pubescens*) na proliferação de células mononucleares de sangue periférico humano. Tese (Mestrado em Ciências) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 1995.
- Sabino, K.C.C., Castro, F.A., Oliveira, J.C.R., Dalmau, S.R.A., Coelho, M.G.P.. Successful therapy of collagen-induced arthritis in mice with a hydroalcoholic extract of seeds of *Pterodon pubescens*. *Phytother. Res.* 13: 613-615, 1999.
- Sabino, KCC, Castro, FA, Oliveira, JCR, Dalmau, SRA, Coelho, MGP. Successful therapy of collagen-induced arthritis in mice with a hydroalcoholic extract of seeds of *P. pubescens*. *Phytother. Res.* 13: 613-615, 1999a.
- Sadeghi, H., Halhashemi, V., Minaiyan, M., Movahedian, A., Talebi, A.. A study on the mechanisms involving the anti-inflammatory effect of amitriptyline in carrageenan-induced paw edema in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 667: 396-401, 2011.
- Savill, J.S., Wyllie, A.H., Henson, J.E., Walport, M.J., Henson, P.M., Haslett, C.. Macrophage Phagocytosis of Aging Neutrophils in Inflammation. Programmed Cell Death in the Neutrophil Leads to its Recognition by Macrophages. *J. Clin. Invest.* 83: 865-875, 1989.
- Scrive, R., Vasile, M., Bartosiewicz, I., Valesini, G.. Inflammation as “common soil” of the multifactorial diseases. *Autoimm. Rev.* 10: 369-374, 2011.
- Selye, H. Induction topical resistance to acute tissue injury; an experimental study with the granuloma pouch technique. *Surg. Clin. North Amer.* pp. 1417-1466, 1953.
- Sedgwick, A. D., Sin, Y. M., Edwards, J. C. M., Willoughby, D. A.. Increased inflammatory reactivity in newly formed lining tissue. *J. Pathol.* 141: 483-495, 1983.
- Sedgwick, A. D., Moore, A. R., Al-duaij, A. Y.. The immune response to pertussis in the 6-day air pouch: a model of chronic synovitis. *Brit. J. Exp. Pathol.* 66: 455-464, 1985.
- Segal, A.W.. How neutrophils kill microbes. *Ann. Rev. Immunol.* 23: 197-223, 2005.
- Serhan, C. N., Chiang, N., Van Dyke, T. E.. Resolving inflammation: dual anti- inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Immunol.* 8: 349-361, 2008.

- Shagdarsuren, E., Müller, D., Weber, C., Zerneck, A.. Complement activation in vascular remodeling and organ damage. *Drug Discov. Today. Dis. Mech.* 5: 299-306, 2008.
- Sherwood, E. R., Toliver-Kinsky, T.. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* 18: 385-405, 2004.
- Silva, M.C.C., Gayer, C.R.M., Lopes, C.S., Calixto, N.O., Reis, P.A., Passaes, C.P.B., Paes, M.C., Dalmau, S.R., Sabino, K.C.C., Todeschini, A.R., Coelho, M.G.P.. Acute and Topic anti-edematogenic fractions isolated from the seeds of *Pterodon pubescens*. *J. Pharm. Pharmacol.* 56: 135-141, 2004.
- Simmons, D.L.. Variants of cyclooxygenase-1 and their roles in medicine. *Thromb. Res.* 110: 265-268, 2003.
- Sostres, C., Fellow, R., Gargallo, C.J., Arroyo, M.T., Membera, P.S., Lanas, A.I.. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 24: 121-132, 2010.
- Spindola, H.M., Servat, L., Denny, C., Rodrigues, R.A.F., Eberlin, M.N., Cabral, E., Sousa, I.M.O., Tamashiro, J.Y., Carvalho, J.E., Foglio, M.A.. Antinociceptive effect of geranylgeraniol and 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Benth. *BMC Pharmacol.* 10: 1-10, 2010.
- Stables, M.J., Gilroy, D.W.. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Progr. Lipid Res.* 50: 35-51, 2011.
- Stockinger, B., Veldhoen, M., Martin, B.. Th17 T cells: Linking innate and adaptive immunity. *Semin. Immunol.* 19: 353-361, 2007.
- Teixeira, D.F... Estudo químico e avaliação biológica de *Attalea excelsa* Mart. ex Spreng. (urucuri) e *Pterodon emarginatus* Vog. (Sucupira-branca) em *Aedes aegypti*. Dissertação de Mestrado, em Ciências Farmacêuticas, UFRJ, 2003.
- Uddin, M., Levy, B.D.. Resolvins: Natural agonists for resolution of pulmonary inflammation. *Progr. Lipid Res.* 50: 75-88, 2011.
- Valster, A., Tran, N.L., Nakada, M., Berens, M.E., Chan, A.Y., Symons, M.. Cell migration and invasion assays. *Methods* 37: 208-215, 2005.
- Vento, S., Cainelli, F.. Infections in patients with cancer undergoing chemotherapy: etiology, prevention, and treatment. *Oncology* 4: 595-604, 2003.
- Vieira, C.R., Marques, M.F., Soares, P.R., Matuda, L., de Oliveira, C.M.A., Katob, L., da Silva, C.C., Guillo, L.A.. Antiproliferative activity of *Pterodon pubescens* Benth. seed oil and its active principle on human melanoma cells. *Phytomedicine* 15: 528-532, 2008.
- Vigliano, M.V.. Potencial Anti-inflamatório agudo do Extrato Hexânico e das frações obtidas de *Pterodon polygalaeflorus*. Monografia, Universidade Castelo Branco, RJ, 2009.
- Vigliano, M.V.. Potencial anti-inflamatório agudo do extrato hexânico e das frações obtidas de *Pterodon polygalaeflorus*. Monografia, Ciências Biológicas, 2010.
- Viola, A., Luster, A. D.. Chemokines and Their Receptors: Drug Targets in Immunity and Inflammation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48:171-197, 2008.

- Vonkeman, M.D., Van de laar, M.A.F. J.. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Adverse Effects and Their Prevention. *Semin. Arthr. Rheum.* 39: 294-312, 2010
- Wagner, H.; Bladt, S.. *Plant Drug Analysis, A Thin-Layer Chromatography Atlas.* Springer Ed., 2^a Ed., Berlin, 1995.
- Willoughby, D.A., Moore, A.R., Colville-nash, P.R.. COX-1, COX-2, COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet* 335: 646-648, 2000.
- Winter, C.A., Ristey, E.A., Nuss, G.W.. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111: 544-547, 1962.
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., Halbwachs-Mecarelli, L., Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Investig.* 80: 617-654, 2000.
- Yamunadevi, M., Wesely E.G., Johnson, M.. Phytochemical studies on the terpenoids of medicinally important plant *Aerva lanata* L. using HPTLC. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* S220-S225, 2011.
- Yang, E.J., Lee, J., Song, B.B., Yun, C., Kim, D., Kim, S.. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract from *Lagerstroemia indica* on airway inflammation in mice. *J. Ethnopharmacol.* 136: 422- 427, 2011.
- Yu, L., Wang, L., Chen, S.. Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J. Cell. Mol. Med.* 14: 2592-2603, 2010.
- Zeldin, D.C.. Epoxygenase Pathways of Arachidonic Acid Metabolism. *J. Biolog. Chem.* 276: 36059-36062, 2001.
- Zhang, X.W., Liu, Q., Wang, Y., Thorlacius, H.. CXC chemokines, MIP-2 and KC, induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and extravascular migration in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 133: 413-421, 2001.
- Zipfel, P., Sherka, C.. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 9: 729-740, 2009.
- Zwenger, S., Basu, C.. Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotech. Molec. Biol. Rev.* 3: 1-7, 2008.