

**MARIA CAROLINA BAYEUX LEME DE OLIVEIRA**

---

**ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DOS EXTRATOS  
OBTIDOS DE *Cordia curassavica* DC**

---

*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de Ciências Básicas, da Farmacêutica MARIA CAROLINA BAYEUX LEME DE OLIVEIRA.*

  
Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho  
Orientador

---

---

**CAMPINAS**

**2002**

i

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

**MARIA CAROLINA BAYEUX LEME DE OLIVEIRA**

---

**ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DOS EXTRATOS  
OBTIDOS DE  
*Cordia curassavica* DC**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica na Área de Ciências Básicas.

Orientação:

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho  
CPQBA / UNICAMP

---

**CAMPINAS  
2002**

UNICAMP	
Nº CHAMADA/UNICAMP	
OL4a	
V	EX
TOMBO BCI 51844	
PROC. 16.837-02	
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO R\$ 11,00	
DATA 16/12/02	
Nº CPD	

CM00177401-6

BIB ID 272461

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP**

Ol 4a

Oliveira, Maria Carolina Bayeux Leme de  
Atividade antiinflamatória dos extratos obtidos de *Cordia  
curassavica* DC / Maria Carolina Bayeux Leme de Oliveira.  
Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : João Ernesto de Carvalho  
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Inflamação. 2. Analgesia. 3. Plantas medicinais. 4. Câncer.  
I. João Ernesto de Carvalho. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

---

**Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

---

**Orientador(a): Prof.Dr. João Ernesto de Carvalho**

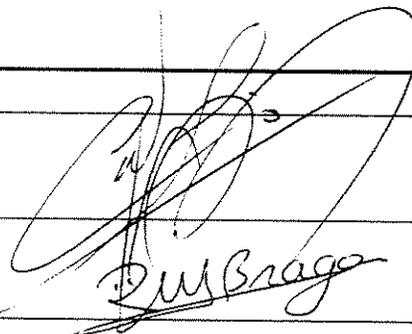


---

**Membros:**

1. Professor Doutor Carlos Eduardo Pulz Araújo

2. Professora Doutora Raquel Marques Braga



---

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

---

**Data: 22/08/02**

---

*Aos meus pais, Eurico e Terezinha, por  
todo apoio, por estarem sempre ao meu lado  
incondicionalmente, em todos os momentos  
da minha vida e pelo amor e incentivo  
sempre constantes, dedico-lhes este  
trabalho.*

*Amo muito vocês.*

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

## *Agradecimentos*

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

Ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela inserção no programa de pós-graduação,

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

À Alik Teixeira Fernandes, pelo companheirismo em todos os momentos, principalmente os difíceis, na execução dos experimentos e pelas palavras certas na hora certa, além do grande carinho,

À Carina Denny; à Aparecida Érica Bighetti, à Patrícia Dias, à Ana Possenti, a Cristiana Madjarof pela colaboração indispensável na realização dos experimentos e inestimável amizade,

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

À Márcia Aparecida Antônio e à Luciana Konecny Kohn, pelo apoio técnico prestado, pela paciência, e colaboração nos experimentos, além da amizade dispensada,

Aos amigos estimados da Divisão de Fitoquímica do CPQBA-Unicamp, André, Rodney, Carmem Queiroga, que contribuíram para a execução deste trabalho,

À Renata Maia, secretária do curso de Pós-Graduação da Clínica Médica da FCM/UNICAMP, pela disposição e atenção constante,

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

*A Natureza é minha Mãe.  
O Universo é meu Caminho.  
A Eternidade é meu Reino.  
A Imortalidade é minha Vida.*

*A Mente é meu Lar.  
O Coração é meu Templo.  
A Verdade é meu Culto.  
O Amor é minha Lei.*

*A Forma em si é minha Manifestação.  
A Consciência é meu Guia.  
A Paz é meu Abrigo.  
A Experiência é minha Escola.*

*O Obstáculo é minha Lição.  
A Dificuldade é meu Estímulo.  
A Alegria é meu Cântico.  
A Dor é meu Aviso.*

*A Luz é minha Realização.  
O Trabalho é minha Bênção.  
O Amigo é meu Companheiro.  
O Adversário é meu Instrutor.*

*O Próximo é meu Irmão.  
A Luta é minha Oportunidade.  
O Passado é minha Advertência.  
O Presente é minha Realidade.*

*O Futuro é minha Promessa.  
O Equilíbrio é minha Atitude.  
A Ordem é minha Senha.  
A Beleza é meu Ideal.  
A perfeição é meu Destino.*

*Chico Xavier*

*Índice*

<b>1. RESUMO.....</b>	<b>29</b>
<b>2. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>41</b>
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>57</b>
<b>A.)PROCESSAMENTO FITOQUÍMICO.....</b>	<b>62</b>
1.) Obtenção dos extratos brutos.....	62
2.) Obtenção da fração rica em artemetina.....	63
3.) Fracionamento do extrato bruto diclorometânico.....	65
4.) Fracionamento da fração de média polaridade.....	66
5.) Fracionamento da fração 6.....	68
<b>B.) TESTES DE ATIVIDADE FARMACOLÓGICA.....</b>	<b>70</b>
<b>1.) SCREENING HIPOCRÁTICO.....</b>	<b>70</b>
<b>2.) ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....</b>	<b>70</b>
2.1) Teste de contorções abdominais.....	70
2.2) Teste de algesia induzida por calor.....	70
<b>3.) ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA.....</b>	<b>71</b>

3.1) Edema de pata induzido por carragenina.....	71
3.2) Edema de pata induzido pelo composto 48/80.....	72
3.3) Edema de pata induzido por bradicinina.....	72
3.4) Edema de pata induzido por Naja Naja.....	73
3.5) Edema de pata induzido por carragenina em animais adrenoectomizados .....	74
3.6) Edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	74
3.7) Peritonite induzida por carragenina.....	74
4.) ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA.....	75
6.) RESULTADOS.....	77
7.) DISCUSSÃO.....	111
8.) CONCLUSÕES.....	123
9.) SUMMARY.....	127
10.) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131

## *Lista de Figuras*

- Figura 1:** Foto da espécie *Cordia curassavica*.....59
- Figura 2:** Fluxograma da obtenção dos extratos bruto diclorometânico e etanólico de *C. curassavica*.....62
- Figura 3:** Fluxograma da obtenção do extrato bruto éter de petróleo de *C. curassavica*.....63
- Figura 4:** Fluxograma da obtenção da fração rica em artemetina de *C. curassavica*.....64
- Figura 5:** Cromatografia em camada delgada da fração rica em artemetina e dos extratos brutos de *C. curassavica*.....64
- Figura 6:** Fluxograma das frações (FS, FM, FI, F30, F39) obtidas do fracionamento do EBD de *Cordia curassavica*: .....65
- Figura 7:** Cromatografia em camada delgada das frações (FS, FM, FI, F30, F39) obtidas do fracionamento do EBD de *Cordia curassavica*:.....66
- Figura 8:** Fluxograma das frações (F1, F3, F4, F6, F8, F11) obtidas do fracionamento da FM de *Cordia curassavica*.....67
- Figura 9:** Cromatografia em camada delgada das frações (F1, F3, F4, F6, F8, F11) obtidas do fracionamento da FM de *Cordia curassavica*.....68

**Figura 10:** Fluxograma das frações  $F\alpha$ ,  $F\beta$ ,  $F\gamma$  e  $F\tau$  obtidas do fracionamento da F6 de *Cordia curassavica*.....69

## *Lista de Gráficos*

- Gráfico 1:** Efeito do EBD de *C. curassavica* (vo), em modelo de contorções abdominais induzida por ácido acético.....80
- Gráfico 2:** Efeito do EBD de *C. curassavica* (vo), em modelo de placa quente.....81
- Gráfico 3:** Efeito do EBD, do EBE e do EBP de *C. curassavica* (vo), em modelo de edema de pata induzido por carragenina.....83
- Gráfico 4:** Curva-dose efeito do EBD de *C. curassavica* (vo).....84
- Gráfico 5:** Efeito da fração artemetina de *C. curassavica* (vo), em modelo de edema de pata induzido por carragenina.....85
- Gráfico 6:** Efeito das frações obtidas do fracionamento do EBD de *C. curassavica* (vo), em modelo de edema de pata induzido por carragenina.....87
- Gráfico 7:** Efeito do EBD de *C. curassavica* (vo), em modelo de edema de pata induzido pelo composto 48/80.....88
- Gráfico 8:** Efeito do EBD de *C. curassavica* (vo), em modelo de edema de pata induzido pela bradicinina.....89
- Gráfico 9:** Efeito do EBD de *C. curassavica* (vo), em modelo de edema de pata induzido pelo naja naja.....91

<b>Gráfico 10:</b> Efeito do EBD de <i>C. curassavica</i> (vo), em modelo de edema de pata induzido pela carragenina em ratos adrenalectomizados.....	93
<b>Gráfico 11:</b> Efeito do EBD de <i>C. curassavica</i> (vo), em modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton.....	95
<b>Gráfico 12:</b> Efeito do EBD de <i>C. curassavica</i> e da dexametasona (via tópica), em modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton.....	96
<b>Gráfico 13:</b> Efeito do EBD de <i>C. curassavica</i> e da indometacina (via tópica), em modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton.....	97
<b>Gráfico 14:</b> Efeito do EBD de <i>C. curassavica</i> (vo) em modelo de peritonite induzida pela carragenina.....	99
<b>Gráfico 15:</b> Curva-Concentração do EBD de <i>C. curassavica</i> sobre linhagens tumorais humanas.....	100
<b>Gráfico 16:</b> Curva-Concentração da Fração 01 obtida da FM de <i>C. curassavica</i> sobre linhagens tumorais humanas.....	101
<b>Gráfico 17:</b> Curva-Concentração da Fração 03 obtida da FM de <i>C. curassavica</i> sobre linhagens tumorais humanas.....	102
<b>Gráfico 18:</b> Curva-Concentração da Fração 04 obtida da FM de <i>C. curassavica</i> sobre linhagens tumorais humanas.....	103

**Gráfico 19:** Curva-Concentração da Fração 06 obtida da FM de *C. curassavica* sobre linhagens tumorais humanas.....104

**Gráfico 20:** Curva-Concentração da Fração 08 obtida da FM de *C. curassavica* sobre linhagens tumorais humanas.....105

**Gráfico 21:** Curva-Concentração da Fração 11 obtida da FM de *C. curassavica* sobre linhagens tumorais humanas.....106

**Gráfico 22:** Curva-Concentração da indometacina sobre linhagens tumorais humanas.....107

**Gráfico 23:** Curva-Concentração da Fração  $\alpha$  obtida da F6 de *C. curassavica* sobre linhagens tumorais humanas.....108

**Gráfico 24:** Curva-Concentração da Fração  $\gamma$  obtida da F6 de *C. curassavica* sobre linhagens tumorais humanas.....109

**Gráfico 25** Curva-Concentração da Fração  $\tau$  obtida da F6 de *C. curassavica* sobre linhagens tumorais humanas.....110

*Lista de Abreviaturas*

<b>AA</b>	<i>Ácido Araquidônico.</i>
<b>AMPc</b>	<i>Adenosina monofosfato cíclico.</i>
<b>ATP</b>	<i>Trifosfato de Adenosina</i>
<b>BK</b>	<i>Bradicinina</i>
<b>CCD</b>	<i>Cromatografia de Camada Delgada</i>
<b>CE</b>	<i>Célula Endotelial</i>
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	<i>Diclorometano</i>
<b>COX-1</b>	<i>Ciclooxigenase-1</i>
<b>COX-2</b>	<i>Ciclooxigenase-2</i>
<b>EBD</b>	<i>Extrato bruto diclorometânico</i>
<b>EBE</b>	<i>Extrato bruto etanólico</i>
<b>EBP</b>	<i>Extrato bruto de éter de petróleo</i>
<b>GMPc</b>	<i>Guanosina monofosfato cíclico</i>
<b>GM-CSF</b>	<i>Fator estimulador de colônias de macrófagos</i>
<b>GC/MS</b>	<i>Cromatografia / gasosa com detetor de massas</i>
<b>5-HT</b>	<i>Serotonina (5-hidroxitriptamina)</i>
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	<i>Interferon-<math>\alpha</math></i>

<b>IL -1</b>	<i>Interleucina-1</i>
<b>IL -6</b>	<i>Interleucina-6</i>
<b>IL -8</b>	<i>Interleucina-8</i>
<b>LT</b>	<i>Leucotrieno</i>
<b>LTB<sub>4</sub></b>	<i>Leucotrieno B<sub>4</sub></i>
<b>LISO-FAP</b>	<i>Liso glicerofosfolina</i>
<b>LSP</b>	<i>Lipopolissacarídeos</i>
<b>NCI</b>	<i>National Cancer Institute (Estados Unidos)</i>
<b>NO</b>	<i>Óxido Nítrico</i>
<b>NOS</b>	<i>Óxido Nítrico sintase</i>
<b>NOS<sub>c</sub></b>	<i>Óxido Nítrico sintase constitutiva</i>
<b>NOS<sub>i</sub></b>	<i>Óxido Nítrico sintase induzível</i>
<b>NSAIDs</b>	<i>Antiinflamatórios não esteroideais</i>
<b>PLA<sub>2</sub></b>	<i>Fosfolipase A<sub>2</sub></i>
<b>PAF</b>	<i>Fator ativador plaquetário</i>
<b>PGE<sub>2</sub></b>	<i>Prostaglandina E<sub>2</sub></i>
<b>PGG<sub>2</sub></b>	<i>Prostaglandina G<sub>2</sub></i>
<b>PGI<sub>2</sub></b>	<i>Prostaciclina I<sub>2</sub></i>

<b>PMN</b>	<i>Leucócitos Polimorfonuclear</i>
<b>SFB</b>	<i>Soro fetal bovino desativado</i>
<b>TGI</b>	<i>Trato gastrointestinal</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Fator de necrose tumoral</i>
<b>TXA<sub>2</sub></b>	<i>Tromboxano A<sub>2</sub></i>

# *Resumo*

## Resumo

A *Cordia curassavica* DC. (Boraginaceae) conhecida popularmente como “erva baleeira” é utilizada popularmente no tratamento de diversos processos inflamatórios. Alguns autores sugerem que a fração artemetina é a fração responsável pela atividade antiinflamatória. No entanto, resultados contraditórios sugeriram uma reavaliação dos efeitos antiinflamatórios dos extratos e da fração rica em artemetina de *Cordia curassavica*, e ainda identificar a fração ativa responsável pela ação farmacológica.

Para a avaliação da atividade antiinflamatória, foram utilizados modelos de edema de pata induzido por vários agentes flogísticos como a carragenina, histamina, bradicinina e fosfolipase da Naja-Naja; edema de orelha induzido por óleo de cróton e peritonite induzida por carragenina. Para a avaliação da atividade antinociceptiva foram utilizados o teste de algesia induzida por calor (placa quente) e o teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético. A metodologia da atividade antiproliferativa em células tumorais humanas foi utilizada para monitoramento do processo de purificação do extrato bruto diclorometânico.

Inicialmente foram obtidos os extratos brutos éter de petróleo (EBP), etanólico (EBE) e diclorometânico (EBD), que foram avaliados no modelo de pata induzido por carragenina. O EBP não inibiu o edema e o EBE reduziu em 44% após 4 horas do agente flogístico. Como o EBD inibiu o edema induzido por carragenina em 59% após 4 horas da administração do agente flogístico e também por extrair quantidades menores de substâncias, facilitando fracionamentos posteriores, foi escolhido para dar continuidade a este trabalho.

No modelo de edema de pata induzido por histamina o EBD de *C. curassavica* não inibiu o edema, ao passo que nos modelos de edema de pata induzido por bradicinina o EBD de *C.*

*curassavica* reduziu o edema induzido por bradicinina em 60 % e 66% nas doses de 300 e 1000 mg/kg após 60 minutos da aplicação do agente, respectivamente. O EBD de *C. curassavica* reduziu o edema induzido pela fosfolipase A<sub>2</sub> do veneno da *Naja Naja* em 37 % e 45% nas doses de 300 e 1000 mg/kg respectivamente, após 60 minutos da aplicação do agente. No modelo de dermatite provocada pela aplicação de óleo de cróton, o EBD de *C. curassavica* também inibiu a formação de edema em 54% na dose de 1000 mg/kg e na peritonite induzida por carragenina diminuiu a migração leucocitária em 70%. Em ratos adrenalectomizados o EBD manteve a atividade antiedematogênica, inibindo o edema em 45% após 4 horas da administração da carragenina, confirmando que sua atividade independe da liberação de corticóides endógenos.

No modelo de nocicepção químico, o EBD de *C. curassavica* inibiu o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em 54% (dose de 300 mg/kg) e 65% (dose de 1000 mg/kg). Já no teste da placa quente o EBD de *C. curassavica* não aumentou o tempo de reação dos animais ao estímulo térmico, sugerindo que a ação analgésica do EBD é por bloqueio da reação inflamatória.

Na avaliação da atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas, a F3, F4 e a fração F6 apresentou efeito citostático e citocida de modo semelhante à indometacina.

Os resultados obtidos permitem concluir que a *C. curassavica* possui princípios ativos com atividade antiinflamatória provavelmente relacionada com a inibição da síntese e/ou atividade dos prostanóides. A artemetina, encontrada nessa espécie, não é o princípio ativo responsável pelos efeitos observados.

# *Introdução*

## Introdução

Até meados do século XX as plantas medicinais e seus derivados constituíam a base da terapêutica medicamentosa, quando a síntese química, que teve início no final do século XIX, iniciou uma fase de desenvolvimento vertiginoso (Calixto, 2000). Grandes civilizações antigas como a chinesa, indiana e norte africana, utilizavam plantas para tratamento de diversas doenças (Phillipson, 2001).

Atualmente cerca de 50% dos medicamentos utilizados são de origem sintética e cerca de 25% de origem vegetal, isolados diretamente ou produzidos por síntese partindo-se de um precursor vegetal. No entanto, a última década registrou um aumento expressivo no interesse em drogas derivadas de espécies vegetais, evidenciado pelo crescimento de publicações nessa linha de pesquisa pelas principais revistas científicas das áreas de química e farmacologia (Calixto, 2000; Rates, 2001).

Exemplos de drogas importantes obtidas de plantas são o cardiotônico digoxina da *Digitalis* spp., os antimaláricos quinina e quinidina da *Chinchona* spp, os analgésicos morfina e codeína de *Papaver somniferum* (Rates, 2001), os quimioterápicos vincristina e vinblastina de *Catharanthus roseus* (Phillipson, 2001).

Algumas estimativas revelam a existência de aproximadamente 250.000 espécies de plantas superiores em todo o mundo. Entretanto, dados disponíveis revelam que apenas 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal. Portanto, o estudo dessa flora pode possibilitar a descoberta de novos medicamentos (Hamburger e Hostettmann, 1991; Cragg e Newman, 1999).

Muitos fatores contribuíram para o aumento do retorno do interesse na pesquisa de plantas medicinais. Um desses fatores foi a descoberta de drogas eficazes no combate ao câncer.

Outro fator foi o interesse nos estudos sobre a biodiversidade acoplados à preservação das espécies. Da mesma forma, a falta de acesso da maioria da população aos medicamentos modernos e seu alto custo, faz com que buscas alternativas mais baratas sejam oferecidas (Filho e Yunes, 1998; Calixto, 2000; Taylor e Staden, 2001).

Por outro lado, a falta de informação e o mau uso dos medicamentos geralmente provocam o aparecimento de reações colaterais graves ou então o insucesso do tratamento, causando descrença em sua eficácia. Acompanhando esses fatos, o ressurgimento de práticas alternativas (cromoterapia, florais, homeopatia, medicina chinesa, medicina ayurveda e outros) de eficácia duvidosa, muitas vezes prometem milagres sem ocorrência de efeitos colaterais, colaborando com a disseminação da falsa crença na absoluta segurança de uso dos produtos naturais (Alice e col., 1995; Carvalho, 1999).

As plantas popularmente utilizadas como medicinais requerem investigações científicas efetivas, pois embora uma planta possa conter centenas de metabólitos secundários, apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica. A análise de substâncias ativas é muito mais complexa e longa, já que geralmente os compostos presentes em menor proporção na planta são os que apresentam melhores efeitos farmacológicos, portanto, é essencial a colaboração interdisciplinar de botânicos, farmacologistas, fitoquímicos, farmacognostas e agrônomos, para se obter extratos semi-puros, frações e finalmente, compostos puros (Phillipson, 1999; Filho e Yunes, 1998).

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

As espécies do gênero *Cordia* (Boraginaceae) são encontradas nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, sul da África, Austrália, Guiana e América do Sul (Ficarra e col., 1995). Conhecida popularmente no Brasil como “erva baleeira”, a *Cordia curassavica* DC, anteriormente classificada como *Cordia verbenaceae*, ocorre no Brasil do Amazonas até o Rio Grande do sul, preferencialmente em uma faixa de 500 a 1000 metros do mar (Angely, 1970).

O Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Unicamp desenvolveu estudos agronômicos e fitoquímicos dessa espécie, e atualmente, possui uma área em seu campo experimental destinada ao seu cultivo. Um exemplar dessa espécie está depositado no herbário da Unicamp sob o registro –UEC: 112744.

O extrato etanólico das partes aéreas dessa erva, é muito utilizado pela população litorânea no tratamento de diversos processos inflamatórios. Geralmente o uso é externo através de fricção das regiões inflamadas. Alguns autores sugerem que o flavonóide artemetina, seja o princípio ativo responsável pela atividade antiinflamatória dos extratos dessa espécie (Sertié e col., 1990). Segundo estes autores, o extrato bruto hidroalcoólico de *C. curassavica* reduziu o edema de pata induzido por carragenina de forma dose-dependente (0,59 a 2,98mg/kg, com ED<sub>50</sub> de 1,24 mg/kg) (Sertié e col.,1988). No entanto os flavonóides isolados desse extrato foram ativos somente nas doses de 30,4 a 153,9 mg/kg, com ED<sub>50</sub> de 67,07 mg/kg (Sertié e col., 1990). Esses resultados sugerem que a artemetina não é a principal substância responsável pela atividade antiinflamatória dos extratos dessa espécie pois, a atividade específica dessa substância foi 54 vezes menor do que a observada com o extrato bruto.

Em virtude das contradições observadas, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antiedematogênica da fração rica em artemetina, de diversos extratos e frações de *Cordia curassavica* e avaliar o provável mecanismo de ação.

Inicialmente, foram produzidos alguns extratos brutos, através do uso de solventes com polaridade diferentes, para avaliação da atividade antiedematogênica. Dessa forma o teste de atividade selecionou o solvente mais eficiente para a extração dos princípios ativos dessa espécie. Do extrato bruto obtido com acetona foi purificada uma fração rica em 5-hidroxi-3,6,7,3'4'-pentametoxiflavona (Artemetina), para avaliar a sua atividade antiedematogênica.

Para avaliação da analgesia o EBD de *C. curassavica* foi testado em modelos agudos de nocicepção (químico e térmico). Um dos modelos químicos de nocicepção escolhido foi o das contorções abdominais em camundongos. Este teste baseia-se na contagem das contorções da parede abdominal. A atividade antinociceptiva dos extratos brutos de *C. curassavica*, também foi estudada no teste da placa quente (hot plate) em camundongos. Este modelo mede o tempo de reação do animal a um estímulo térmico (Woolfe e McDonald, 1944).

A metodologia da atividade antiproliferativa em células tumorais humanas foi utilizada no monitoramento das frações obtidas do extrato bruto diclorometânico.

# *Objetivos*

## *Objetivos*

- ✓ Avaliar a atividade antiinflamatória de extratos obtidos de folhas da *Cordia curassavica* DC, utilizando solventes de diversas polaridades.
  
- ✓ Obtenção da fração rica em artemetina para a avaliação da atividade antiedematogênica.
  
- ✓ Isolar e identificar os princípios ativos responsáveis pela atividade farmacológica.
  
- ✓ Identificar o provável mecanismo de ação envolvido.

# *Revisão Bibliográfica*

## *Revisão Bibliográfica*

### **Aspectos Fisiopatológicos da Inflamação.**

O termo inflamação provém do latim *enflamare*, que significa “atear fogo”. No primeiro século DC, Celsus, um escritor romano, descreveu os quatro sinais cardeais característicos da inflamação: calor, rubor, tumor e dor (Gahmberg e col., 1998; Siqueira e Dantas, 2000).

A inflamação pode ser definida como uma reação da microcirculação induzida por uma injúria aos tecidos, com conseqüente movimentação de elementos intravasculares como fluidos, células e moléculas, para o espaço extravascular. A agressão tecidual é o agente desencadeador da resposta inflamatória, e este pode ser de origem química, física (mecânica, térmica e radiação) e biológica (microorganismos) ( Siqueira e Dantas, 2000).

A maior função do sistema imune é proteger o hospedeiro da invasão de patógenos. A defesa tecidual contra uma infecção consiste em reações inatas (reação pré-inflamatória), reação inflamatória aguda e reações imunologicamente específicas. Quando os microorganismos vencem as barreiras naturais e invadem os tecidos, a primeira linha de defesa contra os invasores é a defesa inata. As reações inatas podem ser divididas em eventos vasculares (vasodilatação, hiperemia, aumento da permeabilidade vascular e marginação de neutrófilos) e em eventos celulares. Durante os eventos vasculares são gerados mediadores químicos pelas células, sendo que esses mediadores regulam os eventos vasculares e celulares. São mediadores como a bradicinina (BK), histamina e fator de ativação plaquetária (PAF), o sistema complemento, fibrinolítico e de coagulação. A resposta inflamatória aguda, faz parte de uma imunidade inata induzida, de caráter inespecífico, não distinguindo então o agente agressor, tampouco o que é próprio ou não do

organismo (Vane e Botting, 1995; Cicala e Cirino, 1998; Siqueira e Dantas, 2000; Laskin e Laskin, 2001).

A ativação da cascata do sistema complemento e a ação dos macrófagos ocorrem nas primeiras horas após a infecção. Os macrófagos liberam mediadores químicos, fagocitam microorganismos e liberam fatores quimiotáticos para leucócitos (Okabe e col., 2000; Monsinjon e col., 2001).

Já a resposta imunológica, se desenvolve quando os patógenos superam os elementos inatos de defesa. Apresenta alta especificidade e a capacidade de aumentar a atividade de defesa após sucessivas exposições a esse patógeno. A resposta defensiva do hospedeiro vai se tornando cada vez mais eficaz, como também mais específica ao patógeno invasor: os linfócitos B, células-chave para produção de anticorpos, e os linfócitos T são importantes na indução dessa resposta. Essas células migram ao lugar da injúria e iniciam a resposta inflamatória, que quando adequadamente orquestrada, leva a destruição do patógeno e reparo tecidual, mas quando não, a resposta inflamatória torna-se crônica (Roitt, 1994; Laskin e Laskin, 2001).

O endotélio vascular participa do controle da homeostase através de mecanismos que envolvem a síntese e liberação de fatores pró-coagulantes e anticoagulantes. Quando há dano no endotélio como na inflamação, o balanço entre os fatores pró e anticoagulantes é perdido e predomina o estado pró-coagulante. A ativação dos sistemas da coagulação resulta na formação de trombina e fibrina. A trombina catalisa a conversão de fibrinogênio em fibrina e promove a migração de neutrófilos. A conjugação desses fenômenos resulta na interrupção da perda sanguínea, com formação de um tampão hemostático pela fibrina que bloqueia a saída de sangue (Nemerson, 1988; Cirino e col., 2000; Hinsbergh, 2001).

A atividade do agente agressor ou dos próprios mediadores podem produzir lesões nos tecidos, inclusive podendo levar à necrose. Cessada a ação do agente agressor, reduz-se a liberação dos mediadores, a microcirculação recupera o estado hemodinâmico original; o

líquido e as células exsudadas voltam à circulação sanguínea geralmente pelos vasos linfáticos. Se há necrose, o tecido destruído é fagocitado. O resultado ideal do processo inflamatório é a completa e rápida restauração tecidual. Se o agente agressor que evocou uma resposta inflamatória aguda não for eliminado, este tipo de resposta aguda evolui para um quadro crônico, que se não for adequadamente tratado pode durar meses ou anos (Lima e Bogliolo, 1994; Foxwell e col., 2001).

### **CÉLULAS ENVOLVIDAS NA INFLAMAÇÃO:**

#### **Mastócitos:**

Sua principal função é sintetizar e armazenar em grânulos citoplasmáticos mediadores químicos, como: histamina, leucotrienos (LTs), prostaglandinas (PGs), interleucinas (ILs) e PAF. Esses mediadores potencializam a resposta inflamatória, estando também envolvidos nas reações alérgicas. A substância P, mediador neurogênico da inflamação, induz a degranulação dos mastócitos, liberando os mediadores químicos descritos acima e também induzindo a infiltração de granulócitos (Okabe e col., 2000).

#### **Leucócitos Polimorfonucleares (granulócitos- PNM):**

Os PNM não possuem especificidade para antígenos, mas atua em sinergismo com anticorpos e o sistema complemento na proteção contra microorganismos. São ativados pela invasão de patógenos, sendo os primeiros a penetrarem na área inflamatória, principalmente os neutrófilos que atacam o revestimento das células endoteliais do foco inflamatório para fagocitar bactérias, substâncias estranhas, complexos imunes e tecidos degenerados podendo prolongar a inflamação e induzir lesão tecidual ao liberar enzimas proteolíticas, mediadores químicos e radicais tóxicos do oxigênio. No entanto, sua estratégia de proteção pode ser inadequada e excessiva, com risco de causar reação sistêmica (Gahmberg e col., 1998; Bellingan, 2000). Os neutrófilos são capazes de liberar

citocinas como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), IL-1 e a IL-8, que por sua vez são capazes de ativar macrófagos e linfócitos. Sua infiltração excessiva no tecido é característica de doenças inflamatórias crônicas como artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico (Matsukawa e Yoshinaga, 1998; Johnston e Kubes, 1999).

#### **Monócitos/Macrófagos:**

Os monócitos chegam à área da inflamação posteriormente aos polimorfos. Ao deixarem o sangue, atravessando as paredes dos vasos, atingem o tecido conjuntivo e diferenciam-se em macrófagos. Os macrófagos são células do sistema fagocitário, tendo várias funções como: fagocitose de microorganismos, parasitas, células tumorais, partículas estranhas; pinocitose de complexos antígeno-anticorpo; síntese de mediadores inflamatórios (PGs, LTs, PAF); apresentação de antígenos para linfócitos; e ainda secretam enzimas proteolíticas e radicais derivados do oxigênio. No entanto, a liberação desses fatores é um dos principais responsáveis pelo dano tecidual, sendo que essas enzimas degradam a matriz extracelular e outros componentes teciduais ocasionando a formação de pus. Os macrófagos são ativados pelas citocinas como interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), TNF- $\alpha$ , fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), IL-1 e por componentes bacterianos como lipolissacarídeos (LPS) (Bellingan, 2000; Siqueira e Dantas, 2000; Vidal e col., 2000; Laskin e Laskin, 2001).

#### **Células Endoteliais Vasculares (CE):**

No processo inflamatório, as CE são ativadas por mediadores inflamatórios como por exemplo citocinas, óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI), fatores de coagulação que aumentam a permeabilidade vascular, desempenhando funções importantes no processo inflamatório como manutenção do fluxo sanguíneo; prevenção da formação de trombose; regulação do extravasamento de fluídos, solutos, hormônios e macromoléculas; e também expressam moléculas de adesão de leucócitos (E-selectina e P-selectina). As CE também

são importantes no processo de proliferação vascular após a lesão, conhecida como angiogênese, levando à revascularização da área lesada. (Beekhuizen e Gevel, 1998; Johnston e Kubes, 1999; Siqueira e Dantas, 2000; Hinsbergh, 2001).

## **MEDIADORES QUÍMICOS RESPONSÁVEIS PELA INFLAMAÇÃO:**

### **HISTAMINA**

A histamina ( $\beta$ -aminoetilimidazol) é uma molécula sintetizada a partir da descarboxilação da histidina pela L-histidina descarboxilase. É o mediador mais importante da fase inicial da resposta inflamatória aguda. Isto se deve ao fato de ela já se encontrar formada e estocada nos grânulos de mastócitos, basófilos e plaquetas. Os estímulos que causam a liberação da histamina são: físicos (trauma, calor e frio); reações imunes mediadas pela IgE; as anafilatoxinas do sistema complemento (C3a - C5a); LPS bacterianos; IL-1 e IL-8 e pela substância P (Okabe e col., 2000).

A histamina causa vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e adesão de neutrófilos às células endoteliais em consequência à ligação com receptores específicos - H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub> - Os receptores H<sub>2</sub> estão localizados nas células secretoras de ácido do estômago; já os receptores H<sub>1</sub> situam-se nas células endoteliais e sua estimulação leva à contração dessas células, aumentando a permeabilidade capilar. Estudos sugerem que a ativação do receptor H<sub>1</sub> contribui na resposta nociceptiva, portanto o receptor pode estar presente nos nervos aferentes primários, enquanto que os receptores H<sub>3</sub> aparentemente apresentam localização no sistema nervoso central e são responsáveis pela liberação de histamina neste local. Os receptores histamínicos são associados à proteína G e seus efeitos são mediados através do aumento da concentração do AMPc (Monofosfato Cíclico de Adenosina). Dependendo do tipo de tecido, a histamina estimula a síntese de NO via

receptor H<sub>1</sub> ou H<sub>2</sub> (Izzo e col., 1998; Schaefer e col., 1998; Tozer e col., 1999; Backker e col., 2001; Herbert e col., 2001).

Os antagonistas histamínicos possuem benefícios terapêuticos em diversos estados patológicos. Os antagonistas do receptor H<sub>1</sub> são amplamente utilizados para aliviar os sintomas de reações alérgicas. Antagonista do receptor H<sub>2</sub> são utilizados para tratar úlceras gástricas (Tozer e col., 1999; Backker e col., 2001).

## **SEROTONINA**

A serotonina (5-hidroxitriptamina - 5-HT), é uma amina vasoativa oriunda da descarboxilação do aminoácido triptofano. É encontrada nas células enterocromafins do intestino, nas plaquetas e cérebro. A sua ação está relacionada a presença de receptores celulares para 5-HT, sendo três os tipos mais conhecidos: 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub>. O receptor 5-HT<sub>7</sub> é o mais recente membro identificado, e como os outros receptores é acoplado à proteína G, ativando a adenilato ciclase (Vanhoenacker e col., 2000).

A serotonina é um dos mediadores da dor e da inflamação. Na periferia, sua principal ação é na hemostasia. Após a lesão vascular, ela é liberada por plaquetas juntamente com tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) potencializando a agregação plaquetária, promovendo a vasoconstrição da musculatura lisa vascular, favorecendo a hemostasia. A 5-HT não é quimiotática para células inflamatórias, mas produz hiperalgesia pela ação direta em nervos aferentes primários via receptor 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2</sub>, sensibilizando fibras nervosas intradentais (Giordano e col., 1998; Siqueira e Dantas, 2000; Voog e col., 2000).

## CININAS

Em 1949, Rocha e Silva descreveu a existência de uma nova substância relaxadora de músculo liso, liberada no plasma que foi chamada de bradicinina (BK) (Rocha e Silva e col., 1949). As principais cininas são a bradicinina e a calidina, sendo que a calidina pode converter-se em bradicinina pela aminopeptidase plasmática. A bradicinina é a molécula de maior atividade biológica do sistema das cininas, ela é um peptídeo composto por nove resíduos de aminoácidos, sua síntese depende da ativação do Fator de Hageman (fator XII da cascata de coagulação), que é ativado por lesão tissular, endotoxinas liberadas por bactérias, infecções virais, heparina. (O Fator de Hageman converte a pré-caliceína plasmática em uma enzima ativa caliceína, esta cliva o cininogênio (glicoproteína plasmática de alto peso molecular) em bradicinina, esta tem meia-vida curta (15 segundos) pois é rapidamente inativada por cininases que a hidrolisam (Saleh e col., 1998; Linardi e col., 2000; Medeiros e col., 2001).

A BK, quando se liga a três tipos de receptores  $B_1$ ,  $B_2$  e  $B_3$ , tem ação potente sobre o aumento da permeabilidade vascular, na vasodilatação e na quimiotaxia de células inflamatórias. O receptor  $B_2$  é amplamente distribuído nos tecidos periféricos e central, é constitutivo e medeia a maioria de efeitos fisiológicos das cininas (Medeiros e col., 2001). O receptor  $B_1$  é induzido rapidamente em condições patológicas pela ação de agentes pró-inflamatórios como citocinas ou LPS. A BK, ativando os receptores  $B_2$ , estimula a produção de prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ),  $PGI_2$  e a liberação de citocinas como a  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL-8$  e  $TNF-\alpha$  (Calixto e col., 2000; Ikeda e col., 2001; Medeiros e col., 2001).

A BK também está envolvida em estados patológicos como asma, alergia, artrite reumatóide, tendo papel importante na manutenção da pressão sanguínea sistêmica devido a vasodilatação que provoca, também estando diretamente envolvidas na inflamação neurogênica, através da ativação das fibras sensitivas aferentes (fibras C), que conduzem o estímulo álgico e conseqüente produção de neuropeptídeos como a substância P (Calixto e col., 2000).

### **ATP (trifosfato de adenosina)**

Alguns estudos sugerem que o ATP extracelular é um importante mediador vascular da inflamação. Liberado pelas células endoteliais, modula a perfusão vascular, promovendo a agregação plaquetária e regulando a função dos neutrófilos. Acredita-se que o dano às CE é a principal causa para a alta concentração extracelular de ATP no local da inflamação (Bodin e Burnstock, 1998). Cockayne e colaboradores investigaram a hipótese que o ATP liberado das células de tecidos injuriados excitam neurônios sensíveis a dor (Cockayne, 2000).

### **SISTEMA COMPLEMENTO**

As proteínas do sistema complemento são sintetizadas em macrófagos e células Kupffer do fígado. A ativação do sistema complemento (C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>) efetua-se em duas vias (clássica e alternativa). A ativação da via alternativa ocorre nas primeiras horas após a infecção local, induzindo vários efeitos biológicos como: citólise de microorganismos, opsonização (ligam-se a superfície de microorganismos favorecendo a sua fagocitose), liberação de histamina, LTs, PGs e quimiotaxia de leucócitos. Na ativação da via clássica pelo complexo antígeno-anticorpo, o sistema complemento medeia a resposta imune específica (Siqueira e Dantas, 2000; Monsinjon e col., 2001).

As anafilatoxinas C3a e C5a são peptídeos bioativos gerados através da clivagem de C3 e C5 respectivamente. São liberados em diversas condições patológicas como doença autoimune, trauma e sepsia. O C5a é um poderoso agente quimiotático de neutrófilos; é um potente mediador pró-inflamatório que induz a contração do músculo liso, aumentando assim a permeabilidade vascular; é também um potente indutor de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8), atuando sobre os neutrófilos, gerando radicais tóxicos de oxigênio intensificando o processo inflamatório. A fração C3a não é quimioatática de neutrófilos, mas medeia a migração de eosinófilos, induz a liberação de mediadores mastocitários,

umentando a permeabilidade vascular, atuando também como opsonina (Jagels e col., 2000; Sahu e Lambris, 2000; Monsinjon e col., 2001).

## **EICOSANÓIDES**

Os eicosanóides modulam diversos processos fisiológicos como por exemplo a ovulação, resposta imune e a mitose. Mas sua excessiva produção leva à processos patológicos como inflamação, alergia, câncer e doenças cardiovasculares. São derivados do ácido araquidônico (AA), que é um ácido graxo poliinsaturado de 20 carbonos, originado da dieta ou da conversão do ácido linoléico (ácido graxo essencial). O AA é liberado dos fosfolipídios de membrana pela enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), após estímulos mecânicos, físicos ou químicos. Existem duas formas de PLA<sub>2</sub>, uma encontrada intracelularmente e outra presente nos líquidos extracelulares. É principalmente a forma intracelular que age não apenas no AA, mas também à lisogliceril-fosforilcolina (liso-PAF), que é o precursor de outro mediador da inflamação – o fator de ativação de plaquetas (PAF). Uma vez liberado, o AA é metabolizado por diversas vias – da enzima **ciclooxigenase** (COX) também chamada de PGH sintetase, que dá origem às prostaglandinas e tromboxanos; e por várias **lipoxigenases**, que originam os leucotrienos e lipoxinas (Bedick e col., 2000; Kam e See, 2000; Yedgar e col., 2000).

A inibição da PLA<sub>2</sub>, é uma boa estratégia terapêutica no tratamento de doenças inflamatórias, pois resultaria na supressão de diversas classes de mediadores pró-inflamatórios (PGs, LTs, PAF, Lyso-PL,) (Yedgar e col., 2000).

Existem dois tipos de COX: A **COX-1** é constitutivamente expressa pela maioria dos tecidos, atua em processos fisiológicos, sintetizando prostaglandinas, que regulam a homeostasia vascular, a função gástrica e a função renal. Já a **COX-2** é induzível por dano tecidual, por citocinas, LPS, fatores de crescimento. Está envolvida na produção de PGs que atuam em processos inflamatórios (Kam e See, 2000; Woods e col., 2001).

As COXs convertem o AA ao endoperóxido cíclico PGG<sub>2</sub>, que é em sequência convertido enzimaticamente por uma peroxidase a PGH<sub>2</sub> endoperóxido, a PGH<sub>2</sub>. As etapas subsequentes diferem em diferentes células. Nas plaquetas, a via leva à síntese de TXA<sub>2</sub>, ao passo que no endotélio vascular, conduz à síntese de PGI<sub>2</sub> e, nos macrófagos, resulta em síntese de PGE<sub>2</sub> (Lands, 1981)

As prostaglandinas PGI<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>, são potentes vasodilatores que também potencializam o aumento da permeabilidade vascular; ambas causam algesia por aumentar a permeabilidade vascular, o que resulta na formação de edema que comprime fibras nervosas, além de potencializar a atividade algica da bradicinina; estimulam a produção de esteróides na adrenal, liberando corticóides que participam do processo inflamatório; possuem ação citoprotetora gástrica, reduzindo a secreção ácida, aumentando a secreção de muco e bicarbonato e produzindo vasodilatação na mucosa gástrica. PGI<sub>2</sub> e TXA<sub>2</sub> possuem efeitos opostos, enquanto PGI<sub>2</sub> é um poderoso agente antiagregante plaquetário, o TXA<sub>2</sub> é um mediador importante na obtenção da hemostasia, pois é um potente vasoconstritor e é um ativador da agregação plaquetária (Cirino, 1998; Kam e See, 2000; Oketani e col., 2001).

Os antiinflamatórios não esteroidais (NSAIDs) são utilizados no tratamento da dor e inflamação e, mais recentemente, no tratamento do Mal Alzheimer e do câncer. A inibição da COX e conseqüentemente da síntese de PGs é o mecanismo descrito por Vane (1971) para explicar as propriedades antiinflamatórias e analgésicas dos NSAIDs. Como inibem a síntese de PGE<sub>2</sub> renal, seu uso contínuo pode diminuir a perfusão sangüínea deste órgão resultando em vasoconstrição, isquemia e culminando em insuficiência renal aguda, pois, além de interferir no metabolismo de água e sódio no túbulo distal, resultando em excessiva retenção destes; influencia o controle da pressão arterial em pacientes que consomem anti-hipertensivos (Vane, 1971; Brooks e O Day., 2000; Mazario e col, 2001; e Whelton, 2001).

Na última década foram desenvolvidos inibidores seletivos da COX-2, com objetivo de diminuir os efeito indesejáveis da inibição da COX-1, porém, a experiência clínica com esses inibidores é ainda insuficiente. No entanto, estudos sugerem que os inibidores da

COX-2 não são melhores do que os tradicionais NSAIDs em reduzir a dor musculoesquelética e inflamação, pois produzem os mesmos efeitos que os inibidores da COX-1, a vantagem seria a diminuição dos efeitos adversos, como a gastrotoxicidade (Brooks e O Day, 2000; Yedgar e col., 2000).

Os leucotrienos são derivados lipídicos formados pela oxidação do AA no Carbono 5, por intermédio da enzima 5-lipoxigenase, levando a formação do eicosanóide 5-hidroxi-peroxieicosatetraenóico (5-HpETE), este é por fim metabolizado em leucotrienos. O LTA<sub>4</sub> é transformado em LTB<sub>4</sub> através da LTA<sub>4</sub> hidrolase que catalisa a adição de água no LTA<sub>4</sub>. O LTB<sub>4</sub> é precursor de uma importante classe de leucotrienos contendo cisteinil: LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub> (cisteinil-leucotrienos). Estes cisteinil leucotrienos conhecidos como “substância de reação lenta da anafilaxia” (SRS-A), que gerada no pulmão, é um importante mediador envolvido na asma e outras reações de hipersensibilidade imediata, sendo liberada por mastócitos, basófilos e macrófagos, causam vasoconstrição, broncoespasmo e aumento da permeabilidade vascular. O LTB<sub>4</sub> é um potente quimiotático de PMN, além de aumentar a permeabilidade vascular. A inibição da enzima COX por NSAIDs pode aumentar a quantidade de AA disponível para ser metabolizado pela lipoxigenase, com conseqüente aumento da síntese de LTs (Hevko e Murphy., 2001; Oketani e col., 2001)

## **COX-2 X CÂNCER**

A enzima COX-2 é induzida por vários estímulos como por exemplo, os promotores de tumores. Estudos recentes sugerem que o tratamento de pacientes com os tradicionais NSAIDs, diminuiu o risco de câncer de cólon. Como a COX-2 é expressa em numerosas linhagens celulares cancerígenas, incluindo de próstata, estômago e de cólon cresceu o interesse em inibidores seletivos da COX-2. Observou-se que a grande quantidade de COX-2 está relacionada com a tumorigênese, anormalidades do ciclo celular, na progressão do tumor e com metástase de células cancerígenas humanas. Esta enzima pode promover o

desenvolvimento de células cancerígenas por vários mecanismos como: geração de radicais livres e carcinogênicos; aumento da proliferação celular; diminuição da apoptose; indução da angiogênese. Portanto, inibidores seletivos da COX-2 podem desempenhar um papel importante na quimioprevenção e tratamento do câncer prostático (Kirschenbaum e col., 2001; Myers e col., 2001; Sjö Dahl, 2001).

A PGE<sub>2</sub> tem papel importante no câncer prostático humano. O mecanismo ainda não é conhecido, mas estudos sugerem que ela possa modular várias respostas imunes, inibindo a atividade do supressor neoplásico, estimulando a proliferação celular epitelial e a angiogênese (Sjö Dahl, 2001; Kirschenbaum e col., 2001; Myers e col., 2001).

## **CITOCINAS**

São glicoproteínas solúveis de baixo peso molecular que são potentes em baixas concentrações. Quando se ligam a receptores específicos de superfície celular, iniciam seus múltiplos efeitos, como a síntese de outras citocinas, regulação da resposta imune, sendo ainda mediadores da inflamação, regulação do crescimento e maturação celular, cicatrização tecidual e formação de vasos sanguíneos (Mayers e Johnson, 1998; Dunlop e Campbell, 2000; Szelényi, 2001).

Funcionalmente, as citocinas são classificadas em pró-inflamatórias (IL-1, IL-8, IL-12 e TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10). Em macrófagos que é a maior fonte de citocinas durante a inflamação, existem uma forte predominância de citocinas anti-inflamatórias. Na primeira fase da inflamação, as citocinas que controlam a infiltração leucocitária nos tecidos especialmente de neutrófilos são: TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8. A IL-8 é um poderoso agente quimiotático. Entre os principais efeitos inflamatórios da IL-1 estão a estimulação da síntese de PGs e da reabsorção óssea; a ativação de macrófagos; quimiotaxia para neutrófilos e indução de febre, por isso intensificou-se pesquisas de citocinas anti-inflamatórias e inibidores específicos de citocinas, no tratamento da

inflamação e na febre, pois acredita-se que a IL-1 e TNF- $\alpha$  estejam envolvidas diretamente na febre (Sugita e col., 1998; Matsukawa e Yoshinaga, 1998; Opal e DePalo, 2000; Szelényi, 2001).

O TNF- $\alpha$  é uma potente citocina pró-inflamatória que durante a resposta imune ou inflamação é sintetizada e liberada por monócitos e macrófagos. Ela estimula, em células endoteliais, a expressão de moléculas de adesão de neutrófilos, estimula a produção de IL-1 e IL-6. Evidências apontam para seu papel na manutenção da hiperalgesia, o efeito álgico é devido a sensibilização dos nervos aferentes primários (fibra C), diminuindo o seu limiar nociceptivo, aumentando também o extravasamento do plasma no processo inflamatório (Junger e Sorkin, 2000).

#### **FATOR DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA (PAF)**

O PAF é um acetilglicerol éter fosfocolina, derivado da família dos fosfolipídios. As principais células envolvidas na produção do PAF são células endoteliais, neutrófilos, eosinófilos, monócitos e plaquetas em resposta a estímulos como mediadores químicos, trombina, colágeno e peptídeos quimiotáticos. Pode atuar sobre várias células por meio de ligação a receptores específicos, associados a proteína G (Kilgore e col., 1998; Ishii e Shimizu, 2000; Marathe e col, 2000).

O PAF pode promover vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular; sua ação sobre plaquetas consiste na indução da agregação, favorecendo a obtenção da hemostasia após lesão vascular. Alguns antagonistas do PAF tem sido pesquisados como agentes anti-inflamatórios como por exemplo o BN52021 (Ishii e Shimizu, 2000; Tiemann e col., 2001).

## **ÓXIDO NÍTRICO (NO)**

Em 1980 foi descoberto o "fator relaxante derivado do endotélio" (EDRF) (Furchgott e Zawadzki, 1980). O gás monóxido de nitrogênio (óxido nítrico - NO) é considerado o mais importante representante do EDRF. Desde então, um grande número de estudos experimentais sugerem a importância do NO na função cardiovascular (Furchgott e Zawadzki, 1980; Janero, 2000; Goumas e col., 2001).

O NO é derivado por oxidação da L-arginina (amino-ácido semi-essencial encontrado em peixes e frangos), possui um elétron não pareado, tornando a molécula altamente reativa. A formação do NO é catalisada por uma família de enzimas NO sintetase (NOS). O NO é sintetizado através da ativação de células endoteliais, que são ativadas por stress ou por certas substâncias (como acetilcolina, substância P, bradicinina, histamina, serotonina) que agindo em receptores endoteliais específicos levam a expressão NO sintetase. Foram identificadas três tipos diferentes de NOS: 1.) A NOS I é expressada constitutivamente nos tecidos nervosos central e periféricos é cálcio-dependente e produz NO em baixas concentrações; 2.) O NOS II ou iNO é induzido por citocinas nos processos inflamatórios, produz grandes quantidades de NO e é cálcio independente; 3.) A NOS III é constitutivamente expressa em células endoteliais e converte a L-arginina em NO (Janero, 2000; Goumas e col., 2001).

O NO modula uma variedade de processos biológicos como indução/ativação de genes, apoptose, resposta imune, inibição de plaquetas e relaxamento do musculo liso, no trato gastrointestinal (TGI) controlando o muco e a secreção de bicabornato, regulando o fluxo sanguíneo da parede do TGI, agindo como um agente antiinflamatório local. Por esse motivo o NO é considerado um forte candidato terapêutico para reduzir a toxicidade dos NSAID (antiinflamatórios-não esteroideais) no TGI (Janero, 2000). O NO modula a permeabilidade vascular em resposta a adenosina-5-difosfato e bradicinina (Mayhan, 1992).

Quando a iNO produz NO em grandes quantidades, causa vasodilatação excessiva com conseqüente hipotensão e perda do tônus vascular. A efetiva inibição da acumulação de NO induzido pelo estímulo inflamatório pode representar uma benéfica estratégia terapêutica. Sendo assim é possível inibir a iNOS usando um análogo como a Aminoguanidina. O NO quando excessivamente produzido também reage com radicais livres prejudicando o funcionamento normal dos tecidos, por exemplo reage com o radical ânion superóxido formando o oxidante peroxinitrito (ONOO-) (Mayers e Johnson, 1998; Janero, 2000; Xiong e col., 2000).

Fisiologicamente o NO ativa a enzima guanilato ciclase e inicia a geração intracelular enzimática de segundos mensageiros, como o guanosina monofosfato cíclico (cGMP). Em contrapartida, cGMP inicia uma cascada de ativação enzimática de proteínas quinases, que regulam muitos processos fisiológicos. Como a produção excessiva de NO é prejudicial, a insuficiência de NO também é prejudicial, principalmente para o sistema cardiovascular, para a pressão sangüínea, para a homeostase dos vasos sangüíneos, levando a hipertensão e arterioesclerose. A partir de 1879 iniciou-se o uso disseminado de "nitroglicerina" (trinitrato de gliceril), a nitoglicerina aumenta a produção de NO, usado para tratamento de hipertensão e arterioesclerose (Janero , 2000; Ramamurthi e col., 2001).

# *Materiais e Métodos*

*Materiais e Métodos*

**MATERIAL VEGETAL**



**Figura 1:** Foto da espécie *Cordia curassavica*.

## **MATERIAL QUÍMICO**

### **Drogas**

Carragenina (tipo IV); dexametasona; indometacina (Sigma Chem. Co. – USA), heparina (Liquemine – Roche, Brasil); bradicinina; histamina; Naja naja kaouthia lectin; Composto 48/80 (Sigma Chem. Co. – USA); dipirona sódica (Hoechst Marion Roussel S/A – Brasil); morfina. (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda). Todas as drogas foram solubilizadas em solução salina (NaCl 0,9%). Na dissolução da indometacina usou-se 0,5% de tween 80.

### **Solventes e Reagentes**

Diclorometano (Merck®); Etanol (Merck®); metanol (Merck®); éter de petróleo (Nuclear); éter etílico (Nuclear); acetato de etila (Merck®); acetona (Chemco); tween 80 (Labsynth – Brasil); cloreto de sódio (Labsynth – Brasil); Álcool etílico absoluto (Labsynth – Brasil); hexano (Merck®); ácido acético glacial (Merck®); ácido sulfúrico (Chemco); óleo de cróton (Botica Veado d'ouro); silicagel F<sub>254</sub> (Merck®); sulforrodamina B; tampão tris base (Sigma Chem Co – USA); éter etílico (Nuclear).

### **LINHAGENS CELULARES.**

As células utilizadas neste trabalho são originárias de neoplasias humanas e foram cedidas ao CPQBA pelo “National Cancer Institute” (NCI - USA) (Tab. 1). As células foram mantidas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (Nunc®), com 5 mL de meio RPMI (Gibco®) suplementadas com 5% de soro fetal bovino (SFB), incubadas a 37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade.

Tabela 1. Linhagens celulares tumorais humanas utilizadas

Tipo celular	Nome
Pulmão	NCI-460
Mama	MCF 7
Mama	NCI-ADR *
Melanoma	UACC-62
Ovário	OVCAR-03
Cólon	HT-29
Prostata	PC-03
Leucemia	k-562
Renal	786-0

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

## ANIMAIS

Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) e mantidos em câmaras com temperatura controlada ( $23\pm 2^\circ\text{C}$ ) em ciclos claro-escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. Foram utilizados camundongos albinos Swiss machos, adultos (25-35g) ou ratos Wistar aclimatados às condições do laboratório por 7 dias, sendo agrupados ao acaso, em grupos de até 8 animais submetidos a jejum de 12 horas. Todos os experimentos foram desenvolvidos seguindo normas que envolvem cuidados com animais de laboratório e normas éticas para o seu uso em experimentos com dor (Porter, 1992; Fraser, 1999).

## MÉTODOS

### PROCESSAMENTO FITOQUÍMICO

#### 1.) Obtenção dos Extratos Brutos de *Cordia curassavica*

Para obtenção do extrato bruto 1,5 kg das partes aéreas, secas e moídas, de *C. curassavica*, foram submetidos à maceração dinâmica por um período de 4 horas, com 8L de solvente. Após a decantação os 8L de solvente foram renovados para um novo período de 4 horas de extração. Esse procedimento foi repetido mais uma vez. Após a filtração, todo volume extraído foi concentrado sob vácuo até a completa eliminação do solvente, dando origem ao extrato bruto do solvente utilizado. Para obtenção desses extratos foram utilizados éter de petróleo, diclorometano e etanol. (Figura 1e 2)

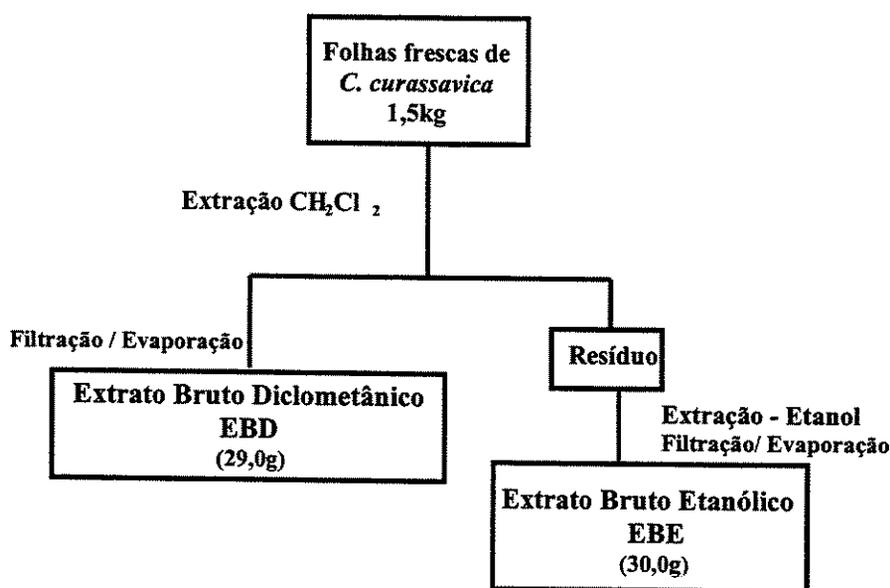


Figura 2: Procedimentos realizados para a obtenção do EBD e EBE.

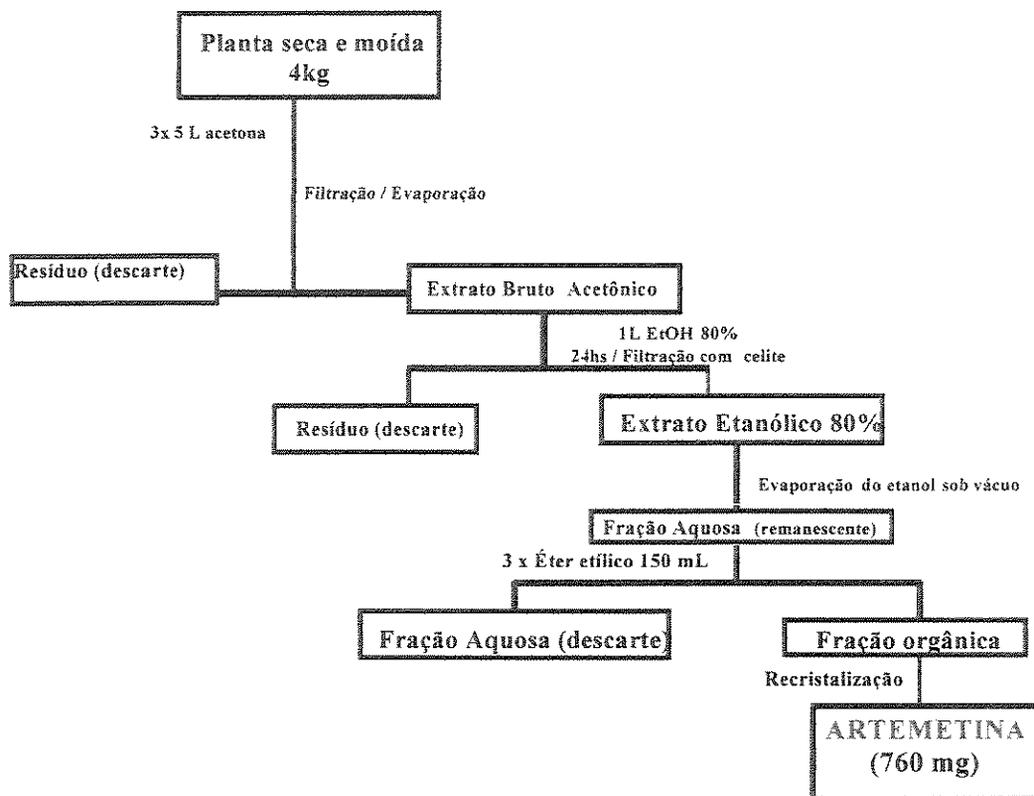


Figura 4: Procedimentos realizados durante o isolamento da fração rica em artemetina.



Figura 5: CCD das frações (A) artemetina, (B) EBD, (C) EBE e (D) EBP obtidas de *Cordia curassavica*,

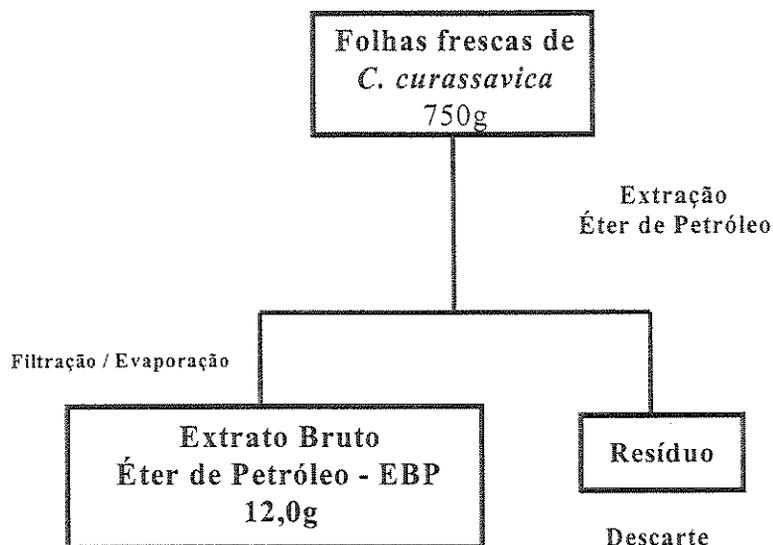


Figura 3: Procedimentos realizados para a obtenção do EBP

## 2.) Obtenção da fração rica em artemetina de *Cordia curassavica*

A artemetina foi isolada do extrato acetônico de *C. curassavica*, por precipitação das clorofilas e graxas e posterior separação cromatográfica em coluna de sílica-gel, com gradiente de hexano/acetato de etila. A fração contendo artemetina foi cristalizada em pentano fornecendo um cristal amarelo com ponto de fusão na faixa de 154-155°C. A estrutura química da artemetina foi confirmada por comparação dos dados obtidos em ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13, com os dados da literatura (Shilin e col, 1989). (Figura 4)

3.) Fracionamento do EBD de *Cordia curassavica*.

O EBD (10g) foi purificado por cromatografia em coluna seca utilizando silicagel como fase estacionária, colocada em um tubo de celulose ( $\varnothing= 3\text{cm}$ , 30cm de altura). Esta coluna foi eluída com Hexano/Acetato de etila 15%. A coluna foi cortada em 5 frações de 6cm cada, extraídas com acetato de etila, filtradas em funil de placa porosa e evaporadas sob vácuo, fornecendo as frações que foram denominadas de 1 a 5. As frações foram agrupadas por apresentar perfis cromatográficos semelhantes fornecendo uma fração FA-(8g) que foi repurificada por cromatografia em coluna, utilizando silicagel como fase estacionária, e fase móvel Hexano/diclorometano com gradiente de variação de 1%. As frações eluídas foram agrupadas em 13 frações distintas conforme seus perfis cromatográficos em cromatografia de camada delgada (Hexano/Acetato de Etila 15%) e seqüencialmente foram reunificadas em 5 frações principais para teste denominadas: Fração superior (FS-fração apolar), fração média (FM-fração de média polaridade), fração inferior (FI)-fração polar) e frações intermediárias denominadas: fração 30 (F30) e fração 39 (F39).

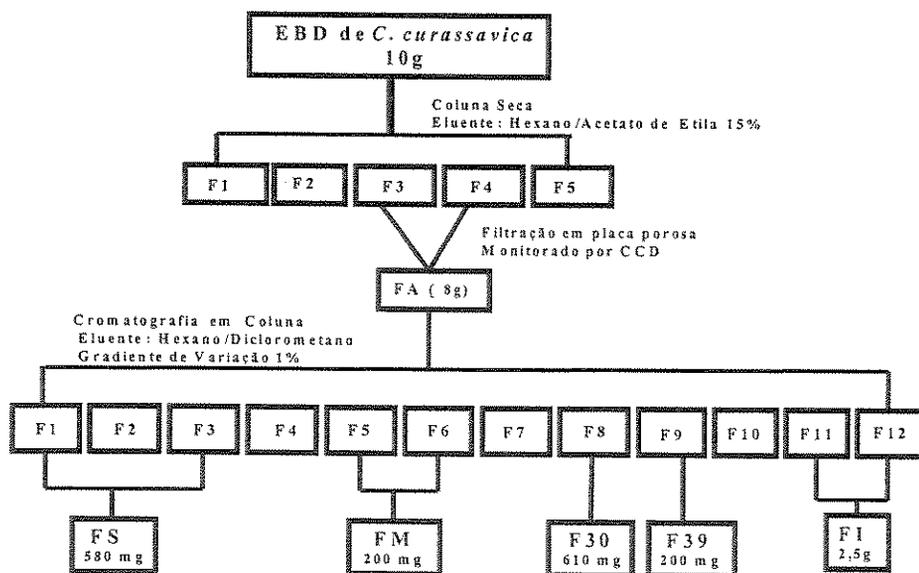


Figura 6: Fluxograma das frações resultantes da purificação de EBD de *Cordia curassavica*: FS, FM, FI, F30, F39.

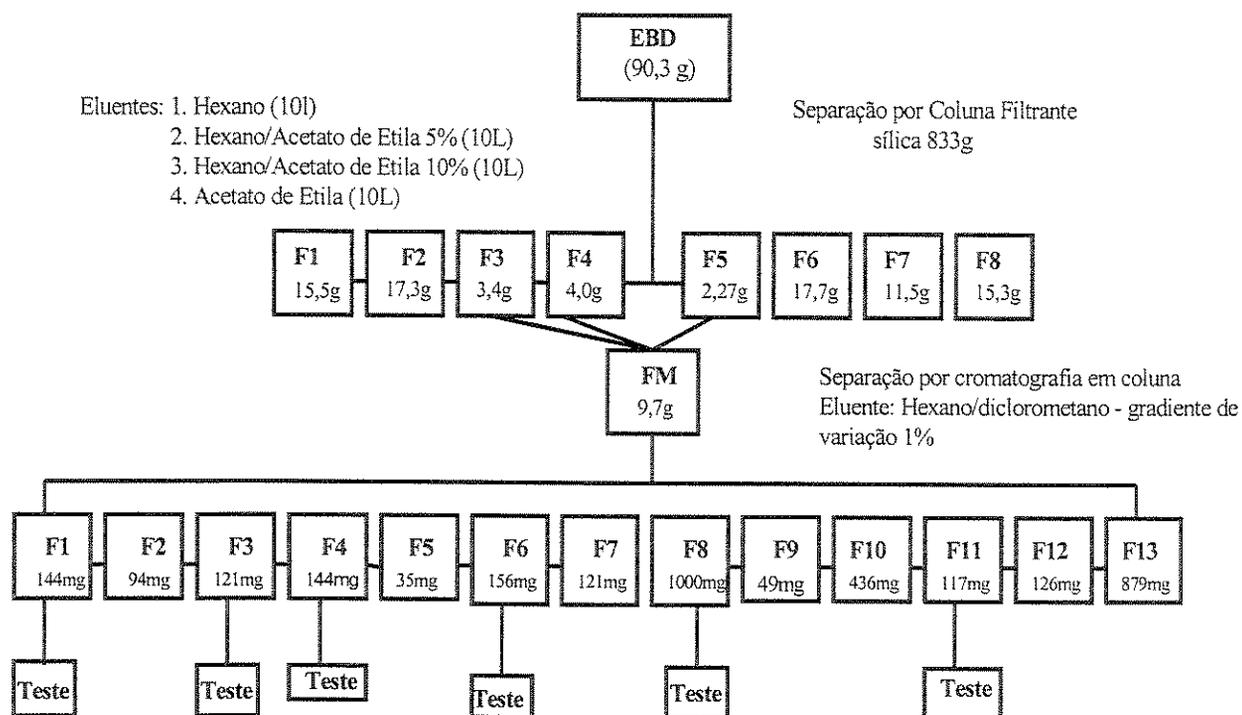


**Figura 7:** CCD das frações FS, FM, FI, F30 e F39 resultantes da purificação por cromatografia do EBD de *Cordia curassavica*, utilizando como sistema de solvente uma mistura de Hexano/Acetato de etila 15% e como revelador anisaldeído.

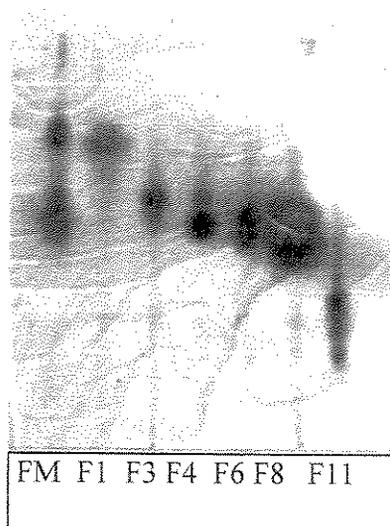
#### 4.) Fracionamento da fração de média polaridade de *Cordia curassavica*

O EBD (90,30g) foi submetido a separação por coluna filtrante em coluna de inox. Como fase estacionária foi utilizada silicagel (833g) e como eluentes 3 misturas distintas de hexano e acetato de etila (H:Ac). A eluição da coluna foi iniciada com hexano (10 litros), sendo recolhidas 2 frações, sequencialmente aumentou-se a polaridade para H:Ac 5% (10 litros), H:Ac 10% (10litros) e no final acetato de etila puro (10 litros). As frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD), eluídas com Hexano/Acetato de etila 15% e reagrupadas conforme seus perfis cromatográficos. As frações 3-4-5 foram agrupadas fornecendo 9,67g de fração denominada Fração Média (FM). Esta fração (FM) foi submetida a uma separação por cromatografia em coluna utilizando Hexano/diclorometano com gradientes de variação de 1% como eluente. As frações resultantes foram agrupadas conforme seus perfis cromatográficos fornecendo 13

frações distintas. Destas foram escolhidas as frações F1, F3, F4, F6, F8 e F11 para submeter ao teste de atividade antiproliferativa in vitro.



**Figura 8:** Fluxograma de obtenção frações (F1, F3, F4, F6, F8, F11) resultantes da purificação do EBD de *Cordia curassavica*

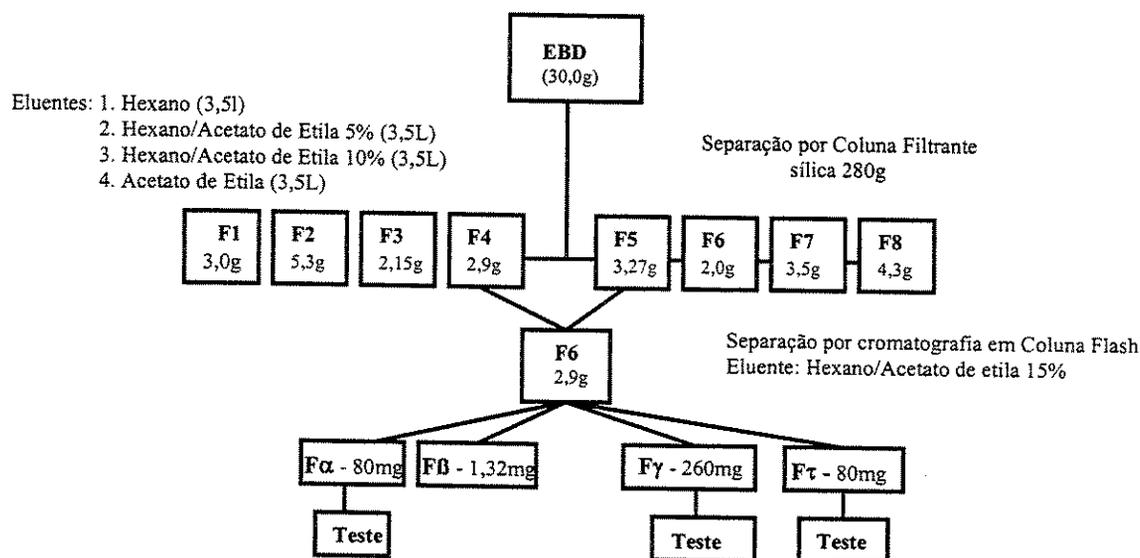


**Figura 9:** CCD das frações FM, F1, F3, F4, F6, F8 e F11 resultantes da purificação por cromatografia do EBD de *Cordia curassavica*, utilizando como sistema de solvente uma mistura de Hexano/Acetato de etila 15% e como revelador anisaldeído.

##### 5.) Fracionamento da F6 de *Cordia curassavica*

O EBD (30,0g) foi submetido a separação por coluna filtrante em coluna de inox. Como fase estacionária foi utilizada silicagel (280g) e como eluentes 3 misturas distintas de hexano e acetato de etila (H:Ac). A eluição da coluna foi iniciada com hexano (3,5 litros), sendo recolhidas 2 frações (F1 e F2), sequencialmente aumentou-se a polaridade para H:Ac 5% (3,5litros) sendo recolhidas 2 frações (F3 e F4), H:Ac 10% (3,5 litros) sendo recolhidas 2 frações (F5 e F6), e no final acetato de etila puro (3,5 litros) sendo recolhidas 2 frações (F7 e F8). As frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD), eluídas com Hexano/Acetato de etila 15% e reagrupadas conforme seus perfis cromatográficos. A fração 4 foi submetida a uma separação por cromatografia em coluna flash utilizando Hexano/Acetato de etila 15%. As frações resultantes foram agrupadas conforme seus perfis cromatográficos fornecendo 4 frações

distintas. Destas foram escolhidas as frações  $F\alpha$ ,  $F\gamma$ ,  $F\tau$  para submeter ao teste de atividade antiproliferativa in vitro.



**Figura 9:** Fluxograma de obtenção frações  $F\alpha$ ,  $F\beta$ ,  $F\gamma$  e  $F\tau$  resultantes da purificação do EBD de *Cordia curassavica*

### Análise cromatográfica -Cromatografia em camada delgada

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram efetuadas em cromatofolhas de alumínio (Merck artigo 1.0554) de dimensões 20 x 20 cm com silicagel 60 F254. A detecção dos compostos foi feita por irradiação com lâmpada UV a 254 nm, com posterior pulverização com solução ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído (50:1:0,5) seguido de aquecimento.

## **TESTES DE ATIVIDADE FARMACOLÓGICA**

### **1.) TESTE DE ATIVIDADE GERAL (Screening Hipocrático)**

Grupos de seis camundongos Swiss foram tratados com os extratos brutos (EBE e EBP e EBD) de *C. curassavica* por via oral e intraperitoneal nas doses de 1000, 1500 e 2000 mg/kg; um grupo utilizado como controle positivo foi tratado com morfina (20 mg/kg). Os extratos foram diluídos em salina 0,9% e um animal em cada grupo foi tratado com salina. Os efeitos gerais foram observados mantendo-se os animais em deambulação livre sobre uma superfície plana por um período de cinco horas, e após 24 e 48 h (Malone,1977).

### **2.) ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA**

#### **2.1.) Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético**

Grupos experimentais de 6 camundongos Swiss, submetidos a jejum de 12 horas, foram tratados com veículo (solução NaCl 0,9%, 10 mL/kg), com indometacina (10mg/kg) como controle positivo, e com o EBD de *C. curassavica* por via oral nas doses de 100, 300 e 1000mg/kg. Após uma hora, os animais receberam ácido acético 1,2% (0,1mL/10g i.p.). As contrações da parede abdominal seguidas de torções do tronco e extensão dos membros posteriores foram contadas durante 15 minutos de avaliação experimental (Rates e Barros,1994).

#### **2.2.) Teste de algesia induzida por calor**

Grupos experimentais de 8 camundongos Swiss, submetidos a jejum de 12 horas, foram tratados pela via intraperitoneal com veículo (solução NaCl 0,9%, 10 mL/kg), com morfina

(20mg/kg i.p) como controle positivo e com o EBD de *C. curassavica* nas doses de 100, 300 e 1000mg/kg. Após 30, 60, 90 e 120 minutos desta administração, os animais foram submetidos ao estímulo álgico em placa quente com temperatura controlada de  $56,5 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ , até que apresentassem o reflexo doloroso característico (lamber as patas dianteiras e/ou traseiras), quando foi contado o tempo de reação dos animais até apresentarem este reflexo doloroso (Woolfe e McDonald, 1944).

### **3.) ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA**

#### **3.1) Edema de pata induzido por carragenina**

Neste experimento foram utilizados seis camundongos Swiss (25-30g, em jejum de 12h) ou seis ratos (125-165g, em jejum de 12h) por grupo, que foram tratados por via oral. Um grupo foi tratado, com veículo (solução NaCl 0,9%, 10 mL/kg, vo), outro com indometacina (10 mg/kg, vo), utilizada como controle positivo, e os outros com os extratos e frações da planta. Após 60 minutos, os animais foram submetidos a uma injeção sub-plantar de carragenina 1% (0,1 mL) em solução fisiológica na pata traseira direita. O volume da pata do rato/camundongo foi medido imediatamente antes e após a injeção do agente edematogênico e em intervalos pré-estabelecidos, utilizando um aparelho de hidropletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália). A pata direita posterior dos animais foi submergida até o maléolo lateral, em um recipiente contendo uma solução salina, conectado por um sistema de vasos comunicantes a um outro menor, contendo um transdutor de volume ligado a um multímetro digital. As variações de volume, mediante a imersão das patas no recipiente maior, foram numericamente registrados pelo multímetro digital nos tempos zero (imediatamente após a injeção de carragenina) 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos após a injeção do agente flogístico (Winter e col., 1962).

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

erro padrão da média, para cada grupo de tratamento ou expressos como porcentagem de variação (aumento ou inibição) do volume total de edema em comparação com o grupo controle.

### **3.2) Edema de pata induzido pelo composto 48/80**

Grupos experimentais de 6 camundongos Swiss, mantidos em jejum de 12 horas, foram tratados com veículo (solução NaCl 0,9%, 10 mL/kg), com prometazina (6mg/kg) como controle positivo, e com o EBD de *C. curassavica* por via oral nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg. Após uma hora, os animais foram submetidos a uma injeção subplantar de 3 µg de composto 48/80, dissolvidos em solução fisiológica, na pata traseira direita. O volume da pata do camundongo foi medido antes e após a injeção do agente edematogênico, em intervalos pré-estabelecidos: 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, utilizando um hidropletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália) (Landucci e col, 1995).

As respostas inflamatórias foram expressas como aumento de volume da pata (mL), calculado por subtração do volume basal. Os resultados apresentados como média ± erro padrão das médias, para cada grupo de tratamento e também expressos como porcentagem de variação (aumento ou inibição) do volume total de edema em comparação com o grupo controle negativo.

### **3.3) Edema de pata induzido por Bradicinina**

Grupos experimentais de 6 camundongos Swiss, mantidos a jejum de 12 horas, foram tratados com veículo (solução NaCl 0,9%, 10 mL/kg), e com o EBD de *C. curassavica* por via oral nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg. Após 60 minutos, os animais receberam uma injeção sub-plantar de 50µg de bradicinina (dissolvidas em solução fisiológica) na pata traseira direita. O volume da pata do rato foi medido imediatamente antes e após a injeção

do agente edematogênico, e em intervalos pré-estabelecidos: 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, utilizando o hidropletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália).

As respostas inflamatórias foram expressas como aumento de volume da pata (ml), calculado por subtração do volume basal. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão das médias, para cada grupo de tratamento e também expressos como porcentagem de variação (aumento ou inibição) do volume total de edema em comparação com o grupo controle negativo.

#### **3.4) Edema de pata induzido por fosfolipase A<sub>2</sub> purificada do veneno de Naja Naja**

Grupos experimentais de 6 camundongos Swiss, mantidos em jejum de 12 horas, foram tratados com veículo (solução NaCl 0,9%, 10 mL/kg), com dexametasona (1mg/kg) como controle positivo, e com o EBD de *C. curassavica* por via oral nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg. Após 60 minutos dos tratamentos, foram injetados 10 $\mu$ l de Naja Naja (0,3 mg/mL) na região subplantar das patas traseiras direita. O volume da pata do camundongo foi medido imediatamente antes e após a injeção do agente edematogênico, e em intervalos pré-estabelecidos: 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, utilizando o hidropletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália) (Versani, 1997).

As respostas inflamatórias são expressas como aumento de volume da pata (mL), calculado por subtração do volume basal. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão das médias, para cada grupo de tratamento e também expressos como porcentagem de variação (aumento ou inibição) do volume total de edema em comparação com o grupo controle negativo.

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

Ratos *Wistar* machos (130-180g) foram anestesiados com pentobarbital e adrenalectomizados bilateralmente através de incisão lateral no abdômen. O grupo SHAM, animais controle (falso operados) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, sem no entanto serem removidas as adrenais. Após as cirurgias, os animais adrenalectomizados (ADX) receberam *ad libitum* solução NaCl (0,9%) a fim de serem evitados os efeitos da ausência dos mineralocorticóides. Decorrida uma semana do procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos ao teste de edema de pata por carragenina descrito anteriormente (Romay e col., 1998).

### **3.6) Dermatite induzida por óleo de cróton**

Neste experimento foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 25-35 g, separados em grupos de oito animais. Estes foram tratados por via tópica com o EBD (1%, 3% e 10%) de *C. curassavica*, com veículo (NaCl 0,9%, 10 mL/kg) e dexametasona (4 mg/kg) ou indometacina (10mg/kg), utilizadas como controle positivo. Após 60 minutos dos tratamentos, foram aplicados 20 µL de uma solução de óleo de cróton a 5 % em acetona p.a. na superfície interna da orelha direita. Na orelha esquerda foi aplicado volume equivalente do solvente (acetona). Após 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e foram retiradas porções padronizadas (6mm diâmetro) das duas orelhas. Cada uma delas foi pesada separadamente e a diferença de peso foi considerada como o edema produzido pelo óleo de cróton (Tubaro e col., 1985 e Schintarelli, 1982).

### **3.7) Modelo de peritonite induzida por carragenina**

Neste experimento foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 25-35 g, separados em grupos de seis animais, que foram tratados por via oral com o EBD de *C.*

*curassavica* na dose de 1000 mg/kg; com dexametasona (1 mg/kg) e indometacina (10 mg/kg) como controles positivos do teste e como controle negativo foi utilizada uma solução de NaCl 0,9% (10mL/kg). Após 60 minutos dos tratamentos, os animais foram submetidos a administração pela via intraperitoneal de carragenina 1%. Após 4 horas, foram sacrificados e 2 mL de PBS modificado (sem cálcio e magnésio) heparinizado ( 10 UI/mL ) foram injetados na cavidade peritoneal. Em seguida, 60 movimentos de massagem foram realizados na parede abdominal e a seguir, o lavado peritoneal foi coletado para contagem do número de leucócitos totais migrados, em câmara de Neubauer (Ferrándiz e Alcaraz, 1991). Os resultados foram expressos como médias dos números de leucócitos ( $\times 10^5$ /mL) de cada grupo experimental.

#### **4 ) ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA**

A avaliação da atividade anticâncer das frações extraídas de *Cordia curassavica* foi realizada em oito linhagens tumorais humanas (tabela 1). Desta forma, os extratos (nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu$ g/mL) foram adicionados em placas de 96 compartimentos (Nunc<sup>®</sup>), contendo uma linhagem por placa. Após um período de incubação de 48 horas, (a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e 100% de umidade), as células foram fixadas com ácido tricloroacético 50% (50  $\mu$ L/compartimento). Após 60 minutos à 4°C, o ácido tricloroacético foi removido e a seguir as placas foram lavadas com água corrente para, após secagem, serem coradas com sulforrodamina B (SRB) a 0,4% (50  $\mu$ L/compartimento). O excesso de SRB foi removido das placas após 30 minutos, através de lavagem com ácido acético a 1%. Finalmente, o corante foi solubilizado por adição de tampão tris base (150  $\mu$ L/compartimento). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada por leitor de elisa em 540 nm (Labsystems Multiskan MCC/340). Este método quantifica as proteínas de modo linear em relação ao número de células da cultura (Skehan e col, 1990).

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

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

# *Resultados*

## *Resultados*

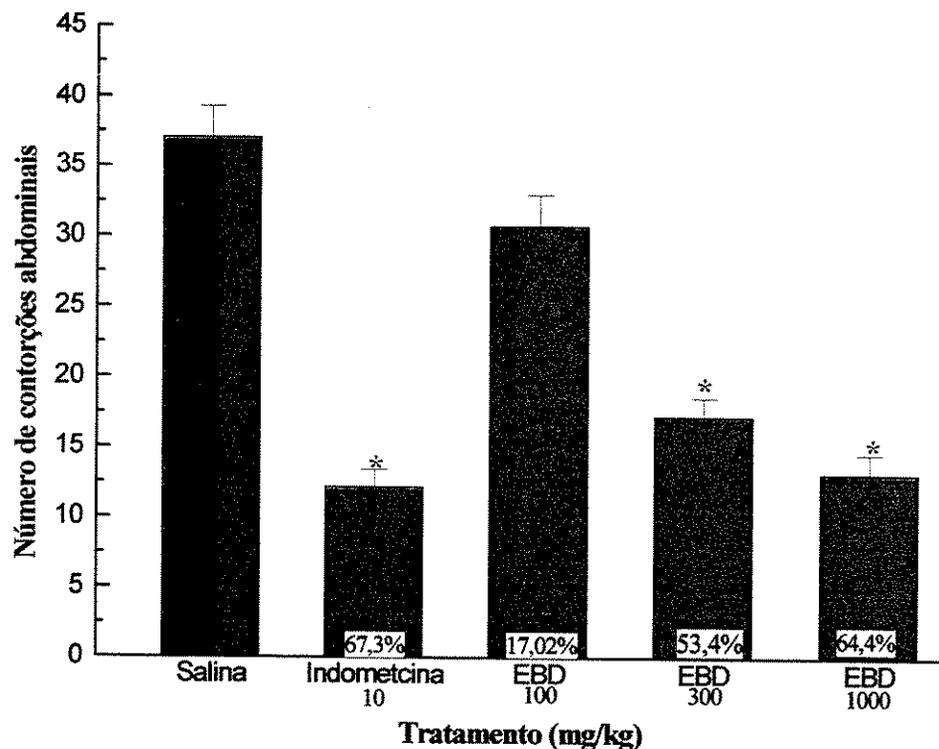
### **1.) TESTE GERAL DE ATIVIDADE**

O EBD nas doses (100, 300 e 1000 mg/kg, vo) não produziu sinais de toxicidade quando comparado aos animais controle, tratados com salina. Os animais tratados com os extratos pela via intraperitoneal não apresentaram alteração da coordenação motora, diminuição do tono muscular ou sedação, quando comparado com o grupo controle – morfina (20 mg/kg).

## **2.) ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA**

### **2.1.) Teste das Contorções Abdominais Induzidas pelo Ácido Acético**

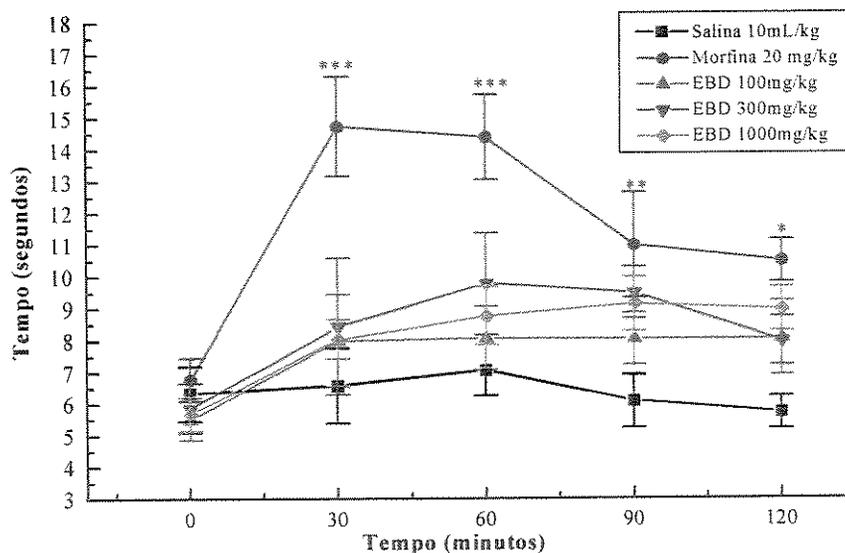
No grupo controle, previamente tratado com solução salina (10mL/kg, v.o.), a injeção de ácido acético (1,2% em salina 0,9%, i.p.) induziu  $37,12 \pm 2,28$  contorções durante os 15 minutos de avaliação experimental. O pré tratamento com o EBD (100, 300 e 1000 mg/kg v.o) de *C. curassavica* reduziu o número de contorções abdominais em 17% ( $30,8 \pm 2,26$ ); 53,4% ( $17,3 \pm 1,34$ ); 64,4% ( $13,2 \pm 1,44$ ) respectivamente. A indometacina (10 mg/kg, v.o.), controle positivo deste experimento, apresentou uma redução do número de contorções abdominais em 67% ( $12,2 \pm 1,27$ ). Os resultados estão representados no Gráfico 1.



**Gráfico 1:** Contorções abdominais induzidas por ácido acético (1,2% em salina) em camundongos previamente tratados com salina (10mL/kg, v.o.), com indometacina (10 mg/kg, v.o.) e com o EBD de *C. curassavica*. Os resultados são expressos em média ± erro padrão de 6 animais por grupo experimental. ANOVA:  $F(4,35) : 32,6 p < 0,001$ . Teste de Duncan:  $*p < 0,001$ .

## 2.2 ) Teste de Algesia Induzida por Calor (Placa Quente)

Nos grupos de camundongos tratados com o EBD de *C. curassavica* nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg, (i.p.), não aumentou o tempo de reação ao estímulo álgico térmico após 30, 60, 90 e 120 minutos respectivamente. A morfina (20 mg/kg i.p.), controle positivo deste experimento, aumentou o tempo de reação dos animais em 124%, 103%, 81% e 73% após 30, 60, 90 e 120 minutos do tratamento. Os resultados estão representados no Gráfico 2



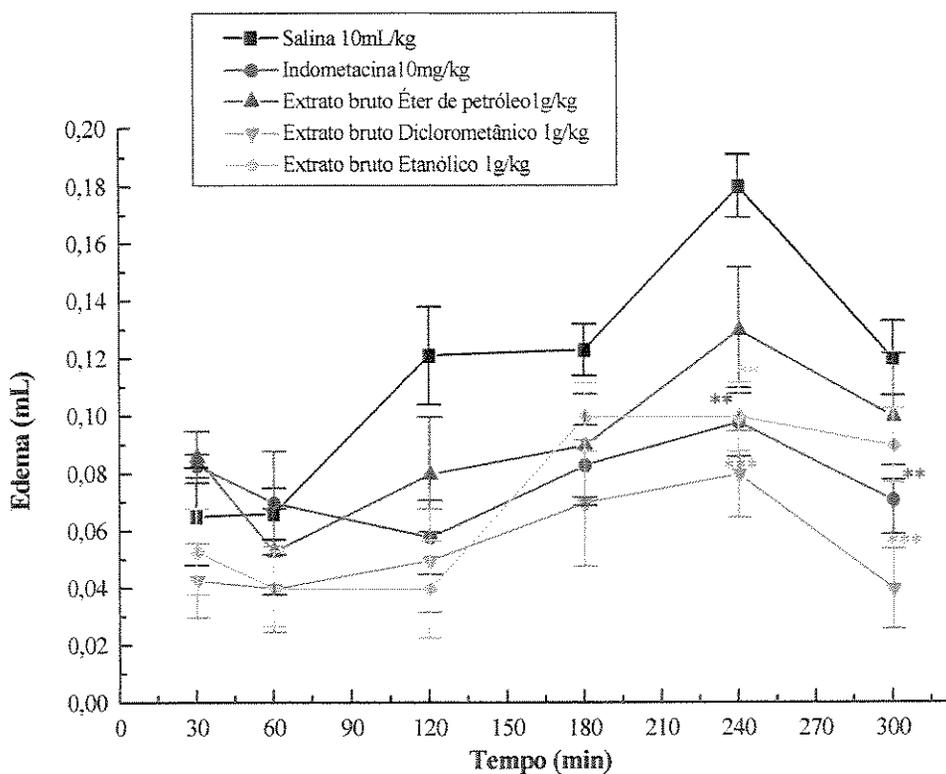
**Gráfico 2:** Reatividade ao estímulo térmico em camundongos previamente tratados pela via oral com salina (10mL/kg), morfina (20 mg/kg, v.o.) e com o EBD de *C. curassavica*. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão de 8 animais por grupo experimental ANOVA: F(4,35): Basal: 0,53  $p > 0,005$ ; 30min: 4,59  $p < 0,01$ ; 60min: 5,84  $p < 0,01$ ; 90min: 4,15  $p < 0,01$ ; 120min: 5,80  $p < 0,01$ . Teste de Duncan: \* $p < 0,01$  \*\* $p < 0,001$ .

### 3. ) ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA

#### 3.1 ) Edema de pata induzido por carragenina

##### 3.1.1.) Avaliação dos Extratos Brutos.

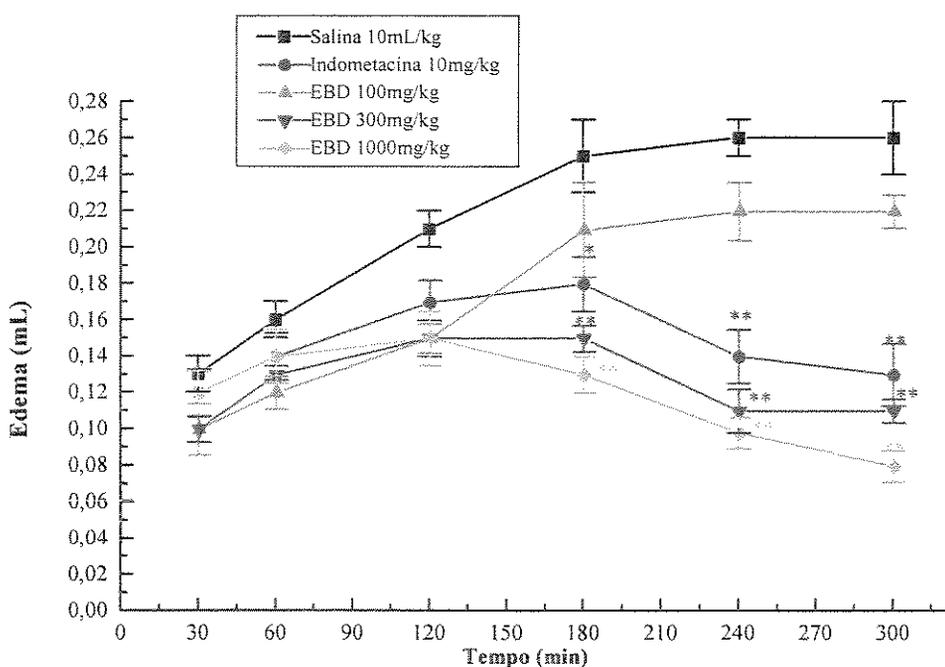
Neste ensaio foram avaliados os efeitos dos extratos brutos EBD, EBE, EBP de *C. curassavica* (1000 mg/kg v.o.); sobre o decurso temporal da resposta inflamatória, induzida pela carragenina. O EBD reduziu o edema em 59% e 38% após 4 e 5h da injeção subplantar de carragenina, respectivamente. O EBE reduziu o edema em 44% após 4 da administração do agente flogístico. O EBP, nas doses administradas, não reduziu o edema. A indometacina (10mg/kg, v.o.), controle positivo do teste, reduziu o edema em 45 e 44% após 4 e 5 horas da injeção do agente flogístico. Os resultados estão demonstrados no Gráfico 3.



**Gráfico 3:** Efeito da administração oral de indometacina e dos extratos: EBD, EBE e EBP, respectivamente de *C. curassavica* no modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão de 6 animais por grupo experimental. ANOVA: F(4,30): 30 min: 1,11  $p > 0,05$ ; 1h :0,7  $p > 0,05$ ; 2h: 3,36  $p < 0,05$ ; 3h:1,7  $p > 0,05$ ; 4h: 6,14  $p < 0,001$ ; 5h: 9,9  $p < 0,001$ . Teste de Duncan: \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

### 3.1.2) Curva dose-efeito do EBD de *C. curassavica*

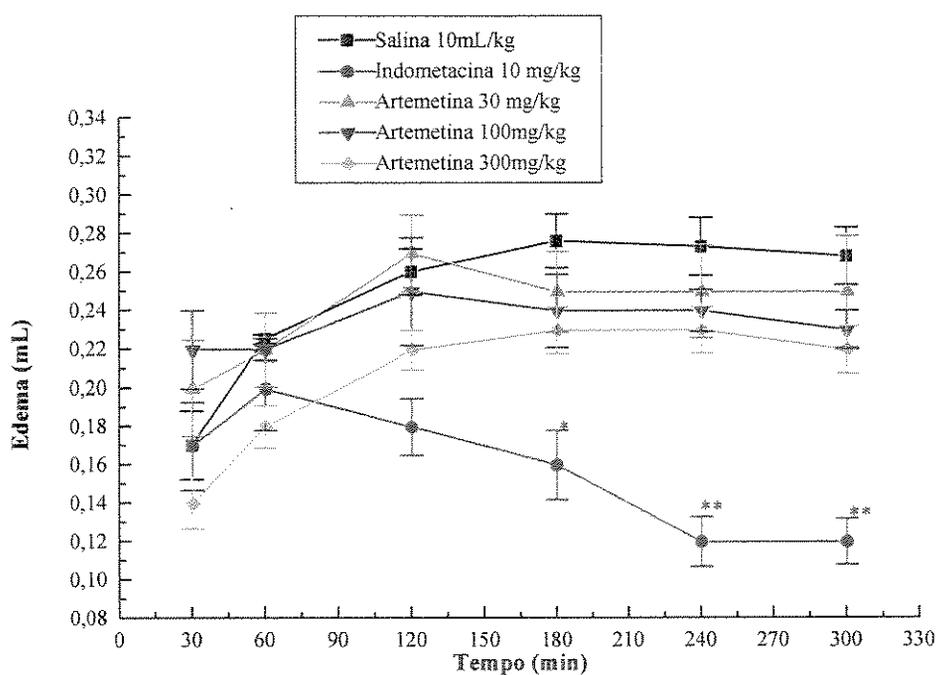
A curva dose – efeito do EBD de *C. curassavica* (100, 300, 1000 mg/kg, v.o.) revelou que o EBD de 300 mg/kg reduziu o edema em 57% e 45% após 4 e 5h da injeção subplantar de carragenina, respectivamente. O EBD de 1000 mg/kg reduziu o edema em em 62% e 69% após 4 e 5h da injeção subplantar de carragenina, respectivamente. A indometacina (10mg/kg, v.o.), controle positivo do teste, reduziu o edema em 45 e 48% após 4 e 5 horas respectivamente, da administração do agente flogístico.



**Gráfico 4:** A Curva dose-efeito do EBD de *C. curassavica* no edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão de 6 animais por grupo experimental. ANOVA: F(4,25) = 30min:1,12  $p > 0,05$ ; 1h:2,01  $p > 0,05$ ; 2h: 4,46  $p > 0,05$ ; 3h:6,8  $p < 0,001$ ; 4h:22,07  $p < 0,001$ ; 5h: 27,8  $p < 0,001$  Teste de Duncan: \*\*  $p < 0,01$  \*\*  $p < 0,001$ .

### 3.1.3.) Avaliação da fração rica em artemetina.

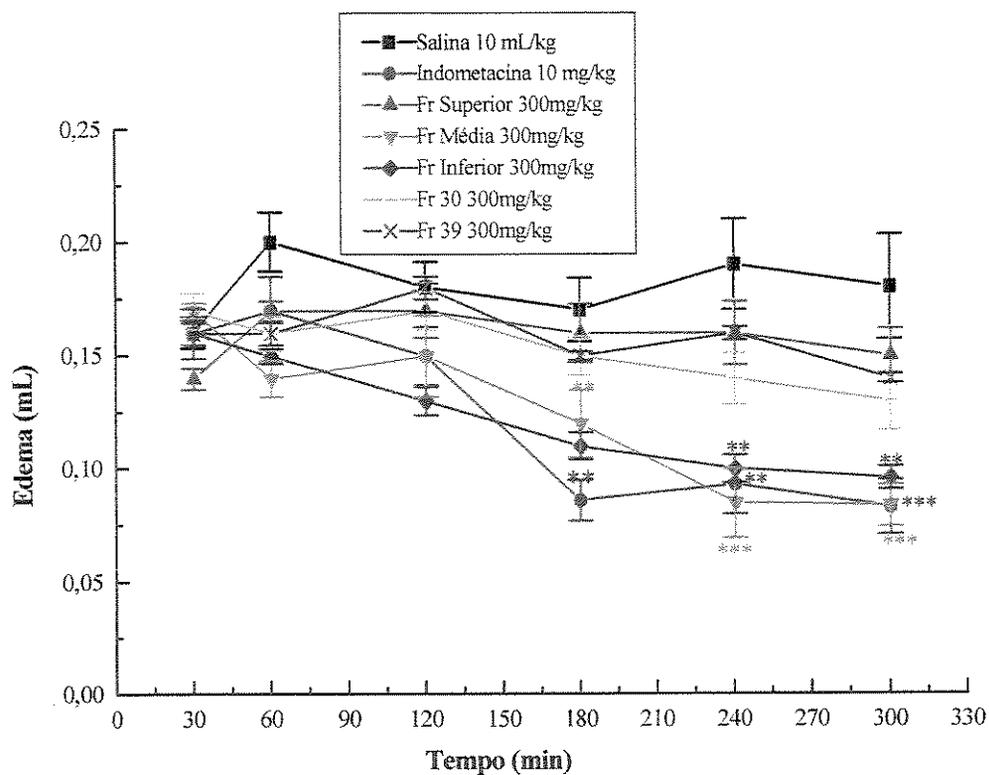
Nesse experimento a fração rica em artemetina de *C. curassavica* (30, 100 e 300 mg/kg ,v.o.) não produziu inibição do edema de pata induzido pela carragenina. A indometacina, utilizada como controle positivo, reduziu o edema em 41, 56 e 63% após 3, 4 e 5 horas da injeção de carragenina, respectivamente (gráfico 5).



**Gráfico 5:** Efeito da administração oral de indometacina e da fração rica em artemetina de *Cordia curassavica* no modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão de 6 animais por grupo experimental. ANOVA: F(4,25): 30min: 1,85  $p > 0,05$ ; 1h: 0,79  $p > 0,05$ ; 2h: 2,73  $p > 0,05$ ; 3h: 6,27  $p < 0,01$ ; 4h: 13,7  $p < 0,001$ ; 5h: 15,73  $p < 0,001$ . Teste de Duncan: \* $p < 0,01$  \*\* $p < 0,001$ .

#### 3.1.4.) Avaliação das frações obtidas do EBD.

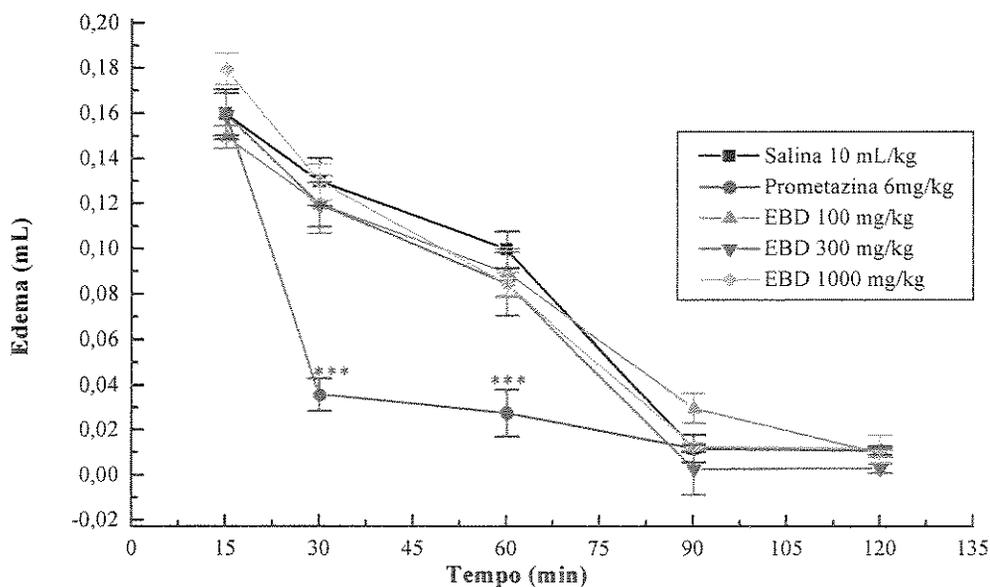
Neste ensaio foram avaliados os efeitos das frações obtidas do EBD de *C. curassavica*: fração superior, fração média, fração inferior, fração 30 e fração 39 (300 mg/kg v.o.) sobre o decurso temporal da resposta inflamatória, induzida pela carragenina. A fração média reduziu o edema em 41%, 49% e 38% após 3, 4 e 5 hs da injeção subplantar de carragenina, respectivamente. A fração inferior reduziu o edema em 36% e 48% após 4 e 5 hs da administração do agente flogístico, respectivamente. A fração superior, 30 e 39, nas doses administradas, não reduziram o edema. A indometacina (10mg/kg, v.<sup>o</sup>), controle positivo do teste, reduziu o edema em 40%, 42% e 55% após 3, 4 e 5 horas da injeção do agente flogístico, respectivamente. Os resultados estão demonstrados na Gráfico 6.



**Gráfico 6:** Efeito da administração oral de indometacina e das frações: FS, FM, FI, F30 e F39 de *C. curassavica* no modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão de 6 animais por grupo experimental. ANOVA:F(6,35): 30min: 0,44  $p>0,05$ ; 1h: 2,20  $p>0,05$ ; 2h: 1,87  $p>0,05$ ; 3h: 3,96  $p<0,01$ ; 4h: 4,01  $p<0,01$ ; 5h: 4,42  $p<0,01$ . Teste de Duncan: \* $p<0,05$  \*\* $p<0,01$  \*\*\* $p<0,001$ .

### 3.2) Edema de Pata Induzido pelo Composto 48/80.

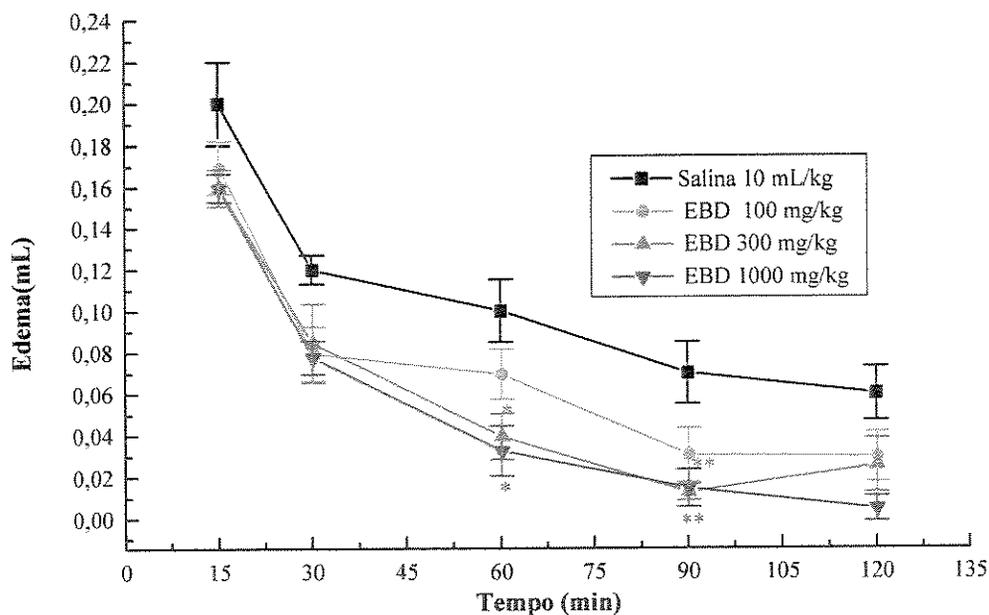
Neste modelo experimental, o EBD (100, 300 e 1000mg/kg,v.o.) de *C. curassavica* não inibiu o edema de pata induzido pelo composto 48/80. A prometazina (6 mg/kg,v.o.) utilizada como controle positivo, reduziu o edema em 72% e 71% após 30 e 60 minutos da administração do composto 48/80, respectivamente. Os resultados estão demonstrados na gráfico 7.



**Gráfico 7:** Efeito da administração oral do EBD de *C. curassavica* no modelo de edema de pata induzido pelo composto 48/80 em camundongos, nas doses de 100, 300 e 1000mg/kg. Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão de 6 animais por grupo experimental ANOVA: F(4,25): 15 min: 2,19  $p > 0,005$ ; 30min: 39,35  $p < 0,001$ ; 60min: 12,76  $p < 0,001$ ; 90min 2,24  $p > 0,005$ ; 120 min: 1,3  $p > 0,05$ . Teste de Duncan: \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ .

### 3.3) Edema de Pata induzido por Bradicinina.

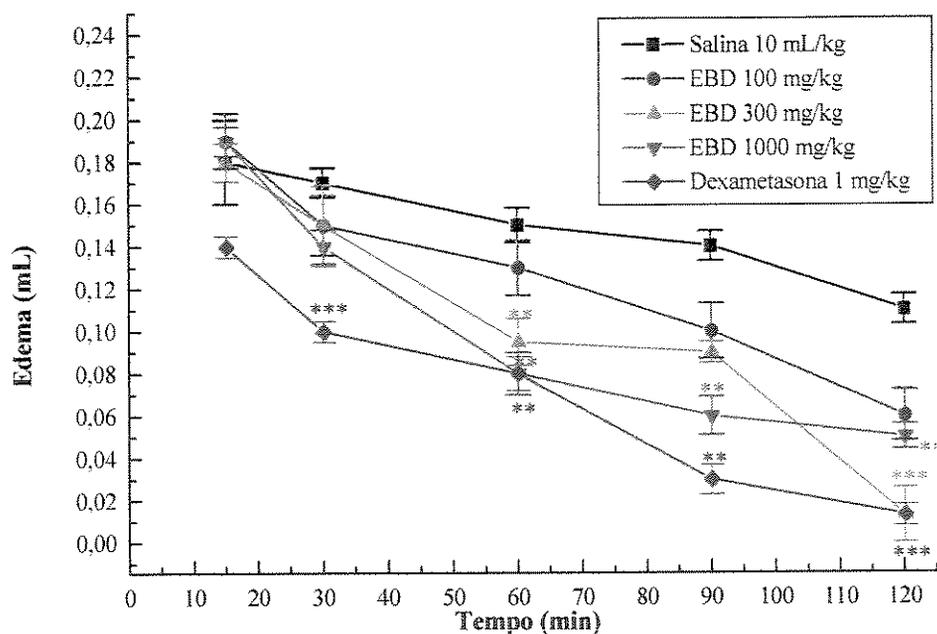
Neste modelo experimental, o EBD de *C. curassavica* (nas doses de 100, 300 e 1000mg/kg) reduziu o edema induzido por bradicinina em 60 % e 66% nas doses de 300 e 1000 mg/kg após 60 minutos da aplicação do agente, respectivamente. Os resultados estão demonstrados no gráfico 8.



**Gráfico 8:** Efeito da administração oral do EBD de *C. curassavica* no modelo de edema de pata induzido por bradicinina em camundongos, nas doses de 100, 300 e 1000mg/kg, via oral. Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão de 6 animais por grupo experimental. ANOVA: F(3,20): 15min: 1,84p>0,05; 30min: 1,82 p>0,05; 60min: 4,01p<0,05; 90min: 5,28 p<0,01; 120min: 3,10p>0,05. Teste de Duncan: \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001.

**3.4) Edema de Pata induzido pela fosfolipase A<sub>2</sub> do veneno da *Naja Naja*.**

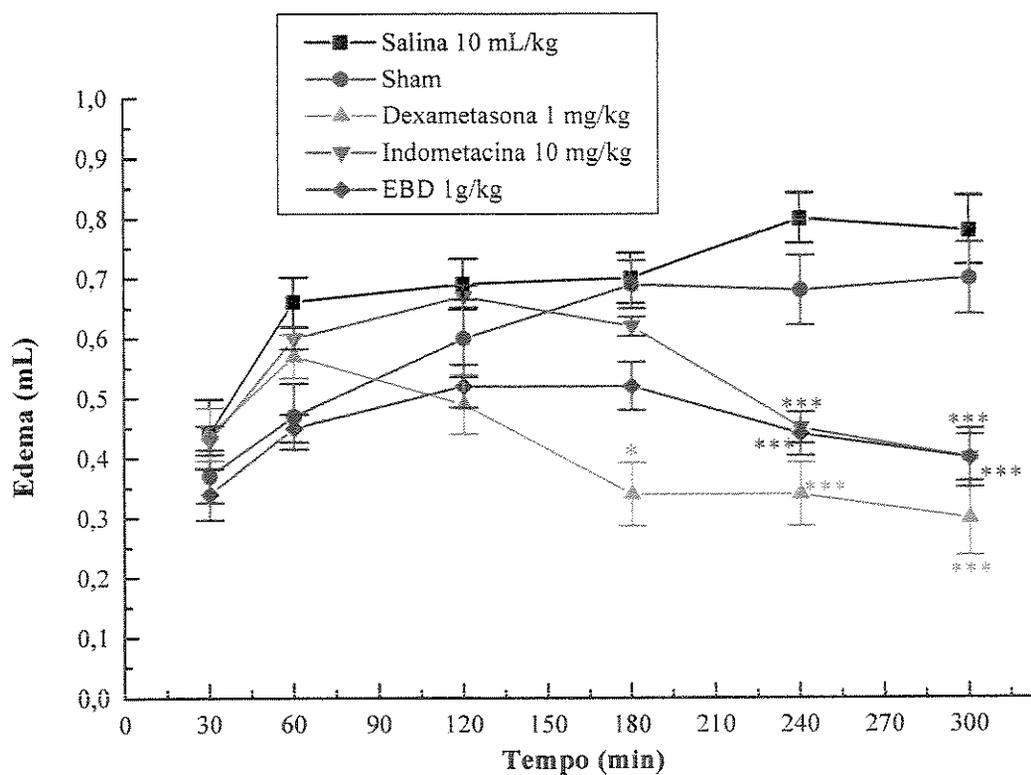
Neste modelo experimental, o EBD (100, 300 e 1000 mg/kg,v.o.) de *C. curassavica* reduziu o edema induzido pela fosfolipase A<sub>2</sub> do veneno da *Naja Naja* em 37 % e 45% nas doses de 300 e 1000 mg/kg após 60 minutos da aplicação do agente; e a dexametasona inibiu em 42% e 47% após 30 e 60 minutos respectivamente. Os resultados estão demonstrados na gráfico 9.



**Gráfico 9:** Efeito da administração oral do EBD de *C. curassavica* (doses de 100, 300 e 1000 mg/kg, v.o.) e da dexametasona no modelo de edema de pata induzido pela fosfolipase A<sub>2</sub> do veneno de *Naja Naja* (0,5 ug/pata) em camundongos. Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão de 6 animais por grupo experimental. ANOVA: F(4,25): 15 min: 8,9  $p < 0,05$ ; 30 min: 6,6  $p < 0,001$ ; 60 min: 6,2  $p < 0,01$ ; 120 min: 14,4  $p < 0,001$ . Teste de Duncan: \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ .

### 3.5 ) Efeito do EBD de *Cordia curassavica* em ratos Adrenalectomizados

Neste modelo experimental, foram avaliados os efeitos do EBD de *C. curassavica* (1000 mg/kg v.o.) sobre o decurso temporal da resposta inflamatória, induzida pela carragenina, em ratos adrenalectomizados. O EBD reduziu o edema em 45% e 50% após 4 e 5h da injeção subplantar de carragenina, respectivamente. A indometacina (10mg/kg, vo), controle positivo do teste, reduziu o edema em 43 e 48% após 4 e 5 hs da injeção do agente flogístico. A dexametasona (1 mg/kg), reduziu o edema em 50%, 57% e 60% após 3, 4 e 5 horas da injeção do agente flogístico. Os resultados estão demonstrados na Gráfico10.

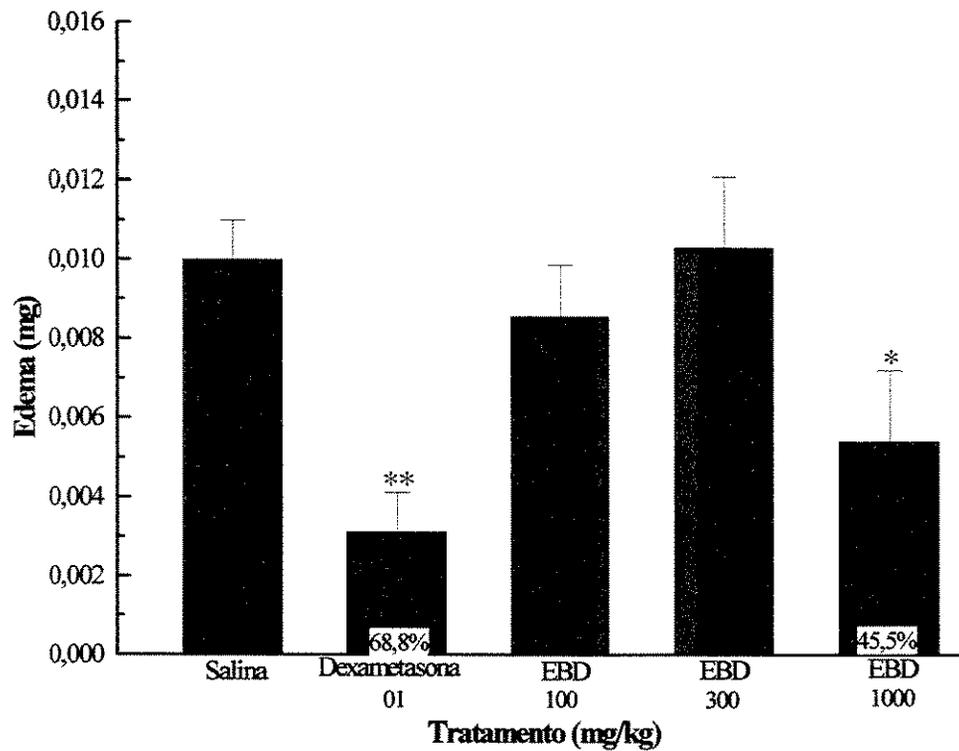


**Gráfico 10:** Efeito da administração oral da indometacina, da dexametasona e do EBD de *C. curassavica* no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos adrenalectomizados. Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão de 5 animais por grupo experimental. ANOVA:F(4,20): 30min: 1,10 $p$ >0,05; 1h: 2,84 $p$ >0,05; 2h: 2,08 $p$ >0,05; 3h: 4,35 $p$ <0,05; 4h: 11,57 $p$ <0,001; 5h: 11,29 $p$ <0,001. Teste de Duncan: \* $p$ <0,05 \*\* $p$ <0,01 \*\*\* $p$ <0,001.

### 3.6) Edema de orelha induzido por óleo de cróton

#### 3.6.1) Efeito do EBD de *Cordia curassavica* e da dexametasona( via oral)

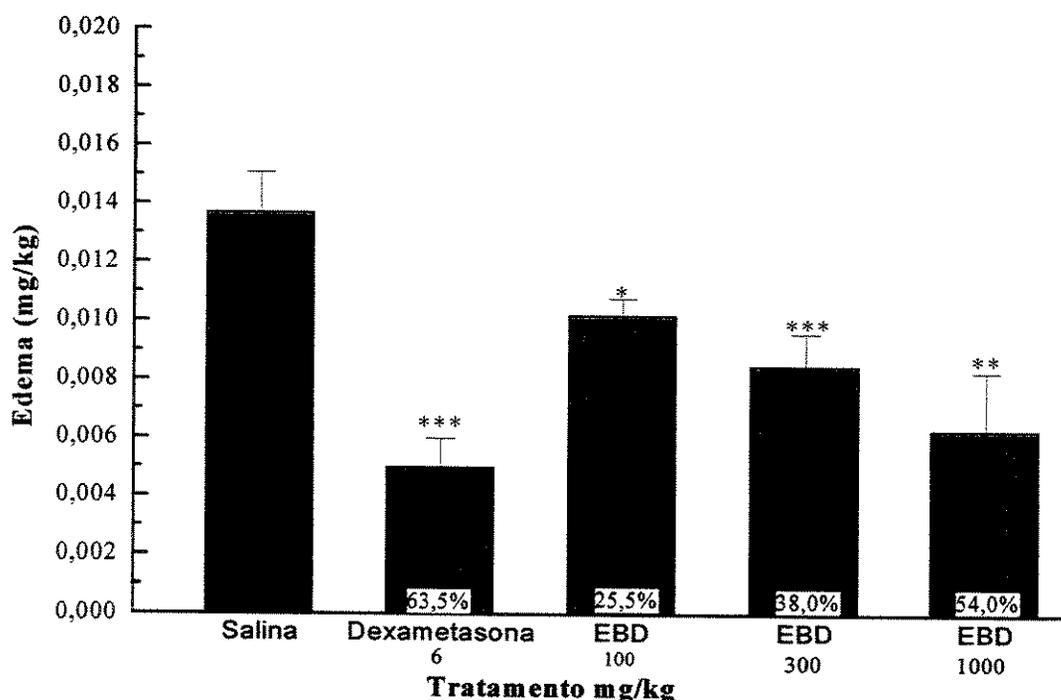
Neste modelo experimental, o EBD (100, 300 e 1000 mg/kg,v.o.) de *C. curassavica* reduziu o edema em 45,5%, somente com a dose mais eleva. A dexametasona (1 mg/kg,vo) utilizada como controle positivo, reduziu o edema em 68,8% após 4 horas da administração do agente flogístico. Os resultados estão demonstrados no gráfico 11.



**Gráfico 11:** Efeito da administração oral de dexametasona e do EBD de *C. curassavica* no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos. Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão de 8 animais por grupo experimental. ANOVA:  $F(4,35) = 10,10$   $p < 0,001$ . Teste de Duncan: \* $p < 0,01$  \*\* $p < 0,001$ .

### 3.6.2) Efeito do EBD de *Cordia curassavica* e da dexametasona (via tópica)

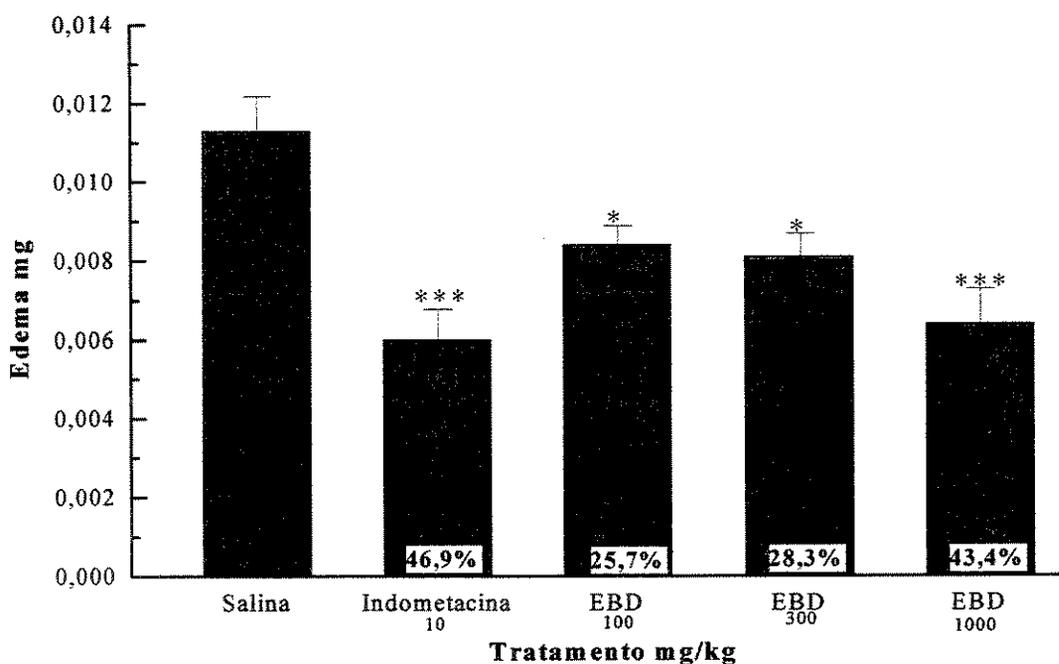
Neste modelo experimental, o EBD (1%, 3% e 10%, via tópica) reduziu o edema em 25,5% (volume de 1%); 38% (volume de 3%) e 54% (volume de 3%). A dexametasona (1 mg/kg, via tópica) utilizada como controle positivo, reduziu o edema em 63,5% após 4 horas da administração do agente flogístico. Os resultados estão demonstrados no gráfico 12.



**Gráfico 12:** Efeito da administração tópica de dexametasona e do EBD de *C. curassavica* no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos. Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão de 8 animais por grupo experimental. ANOVA:  $F(4,35): 10,87 p < 0,001$ . Teste de Duncan: \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$

### 3.6.3) Efeito do EBD de *Cordia curassavica* e da indometacina( via tópica)

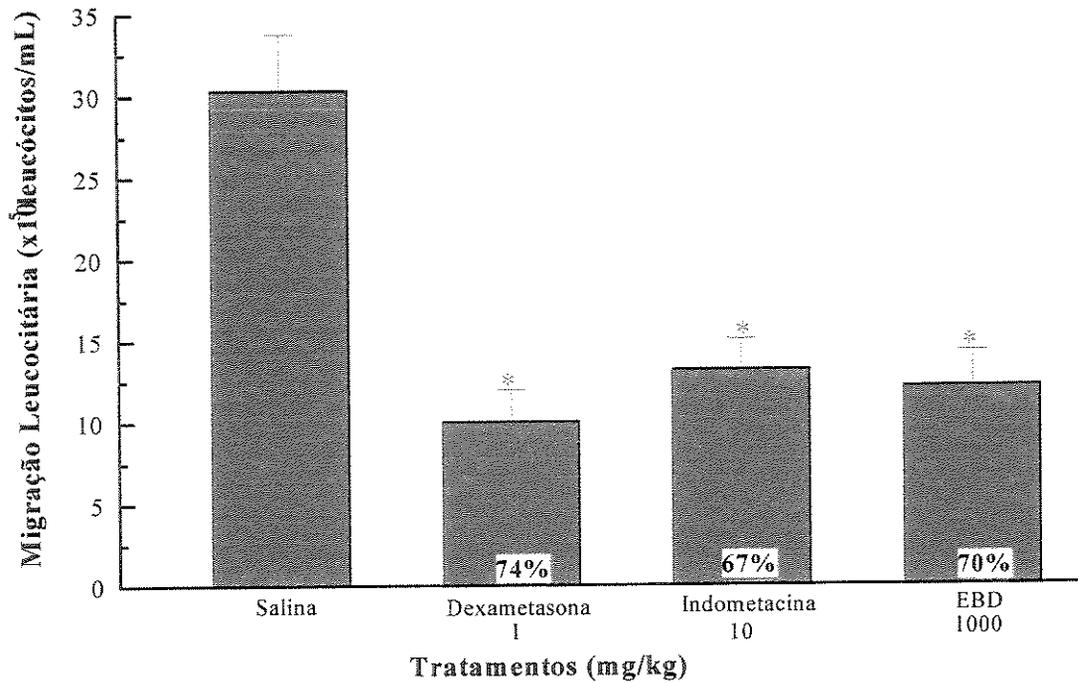
Neste modelo experimental, o EBD (1%, 3% e 10%, via tópica) de *C. curassavica* reduziu o edema em 25,7%, na dose de 100 mg/kg; 28,3% na dose de 300 mg/kg e 43,4% na dose de 1000 mg/kg. A indometacina (10 mg/kg) utilizada como controle positivo, reduziu o edema em 46,9% após 4 horas da administração do agente flogístico. Os resultados estão demonstrados no gráfico 13.



**Gráfico 13 :** Efeito da administração tópica da indometacina e do EBD de *C. curassavica* no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos. Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão de 8 animais por grupo experimental. ANOVA: F(4,35): 6,83  $p < 0,001$ . Teste de Duncan: \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$

### 3.7) Modelo de peritonite induzida por carragenina

A injeção intraperitoneal de carragenina (2,5 mg) nos animais previamente tratados com a salina (10 mL/kg, v.o.) induziu a migração de  $30,4 \pm 3,4 \times 10^5$  leucócitos/mL. O tratamento prévio com o EBD (1000 mg/kg, v.o.) de *C. curassavica* reduziu a migração leucocitária para a cavidade peritoneal em 70% ( $16,12 \pm 2,6 \times 10^5$  leucócitos/mL). A dexametasona (1 mg/kg, v.o.) e a indometacina (10 mg/kg, v.o.), utilizadas como controle positivo, reduziram a migração leucocitária em 75% ( $10,12 \pm 1,9 \times 10^5$  leucócitos/mL) e 67% ( $13,24 \pm 1,8 \times 10^5$  leucócitos/mL), respectivamente. Os resultados estão demonstrados no gráfico 14.



**Gráfico 14:** Migração leucocitária induzida pela carragenina (1%) injetada na cavidade intraperitoneal de camundongos previamente tratados pela via oral com salina (10 mL/kg), dexametasona, indometacina e com o EBD de *Cordia curassavica*. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão de 6 animais por grupo experimental. ANOVA: F(4,25): 25,45,  $p < 0,001$ . Teste de Duncan:  $*p < 0,001$ .

#### 4.) ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

##### 4.1.) Curva concentração-resposta do EBD de *Cordia curassavica*.

O gráfico 15 representa a curva concentração-resposta do EBD sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração de extrato utilizado. A curva demonstrou que o EBD apresentou efeito citocida sobre a MCF.7 (mama); NCI.ADR (mama) e sobre o UACC.62 (melanoma) e efeito citostático sobre o NCI.460 (pulmão).

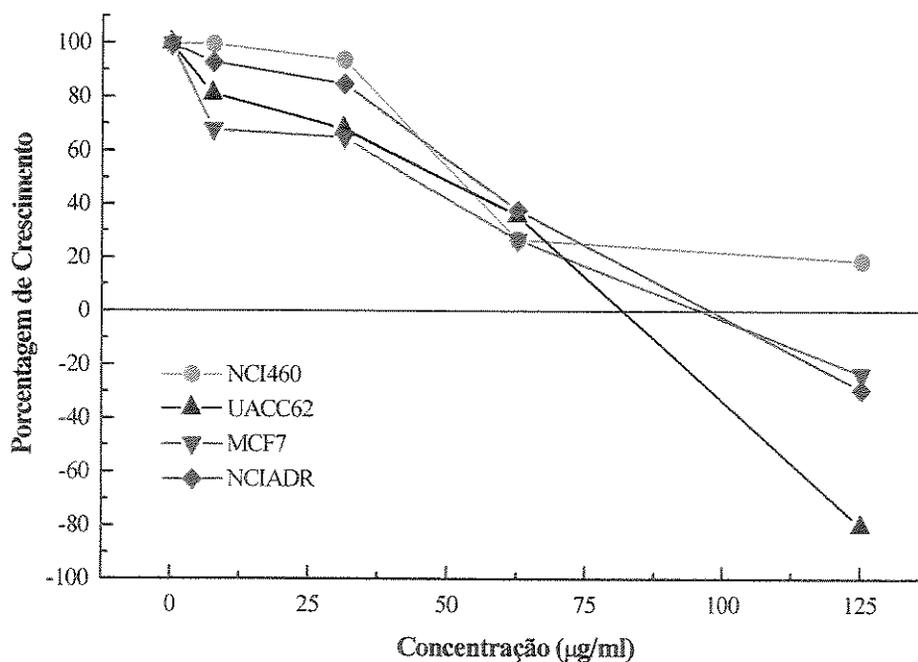


Gráfico 15: Curva concentração-atividade do EBD de *Cordia curassavica* sobre as linhagens celulares tumorais humanas

#### 4.2.) Curva concentração-resposta da fração 01 (F1) obtida da fração de média polaridade de *Cordia curassavica*

O gráfico 16 representa a curva concentração-resposta da F1 sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração de extrato utilizado. A curva demonstrou que F1 não inibiu o crescimento das linhagens celulares utilizadas neste experimento.

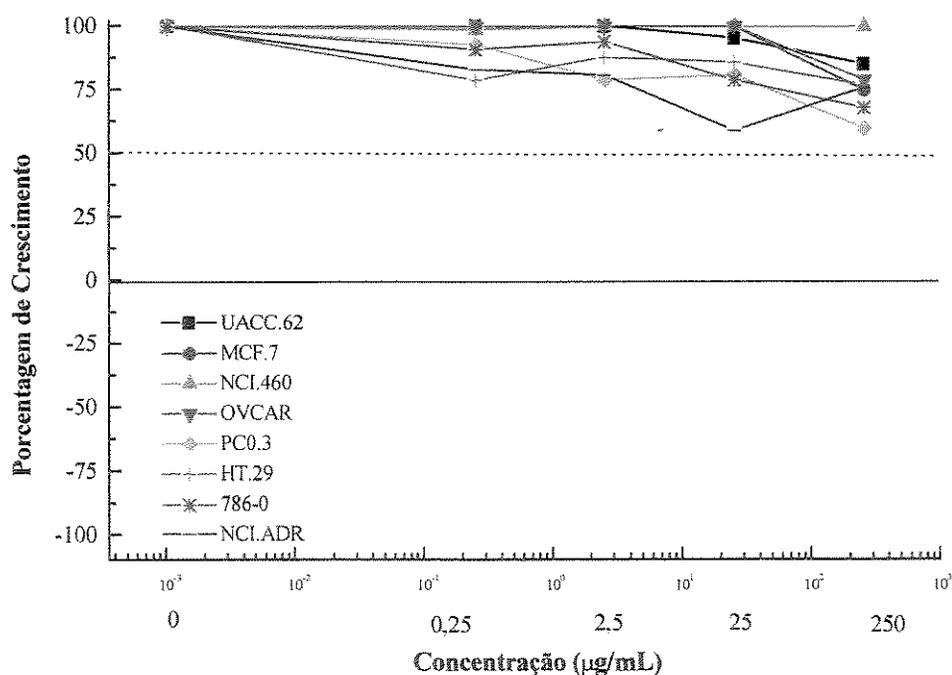


Gráfico 16: Curva concentração-atividade da fração 01 (F1) de *Cordia curassavica* sobre as linhagens celulares tumorais humanas.

#### 4.3) Curva concentração-resposta da fração 03 (F3) obtida do fracionamento da fração de média polaridade de *Cordia curassavica*

O gráfico 17 representa a curva concentração-resposta da F3 sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração de extrato utilizado. A curva demonstrou que F3 possui atividade concentração dependente, efeito citostático e citocida sobre todas as linhagens celulares.

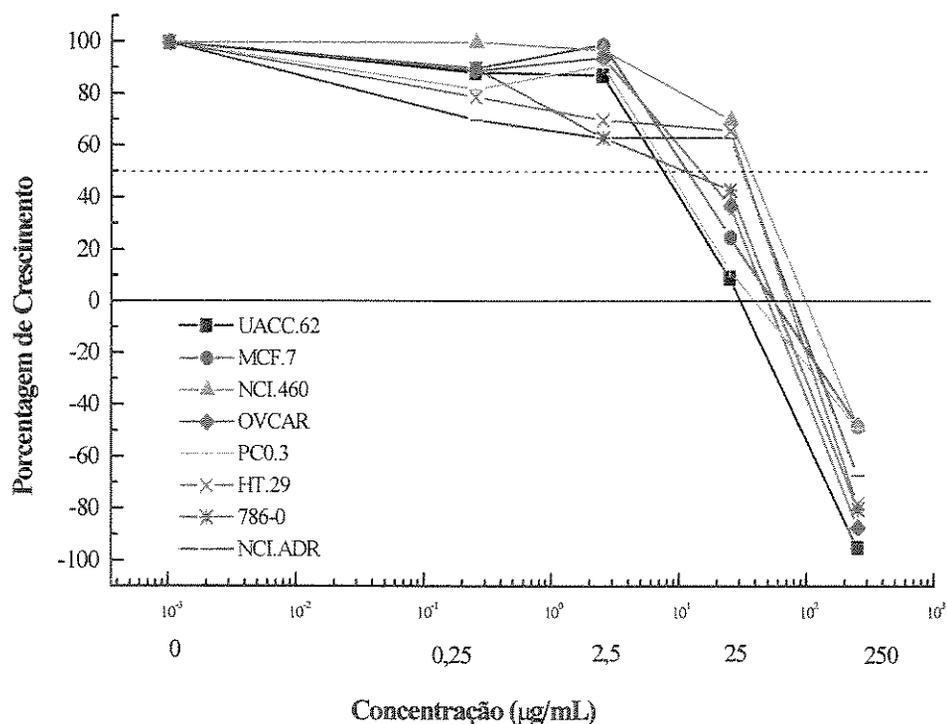


Gráfico 17: Curva concentração-atividade da fração 03 (F3) de *Cordia curassavica* sobre as linhagens celulares tumorais humanas.

#### 4.4) Curva concentração-resposta da fração 04 (F4) obtida do fracionamento da fração de média polaridade de *Cordia curassavica*

O gráfico 18 representa a curva concentração-resposta da F4 sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração de extrato utilizado. A curva demonstrou que F4 possui atividade antiproliferativa não seletiva, concentração dependente, efeito citostático e citocida sobre todas as linhagens celulares.

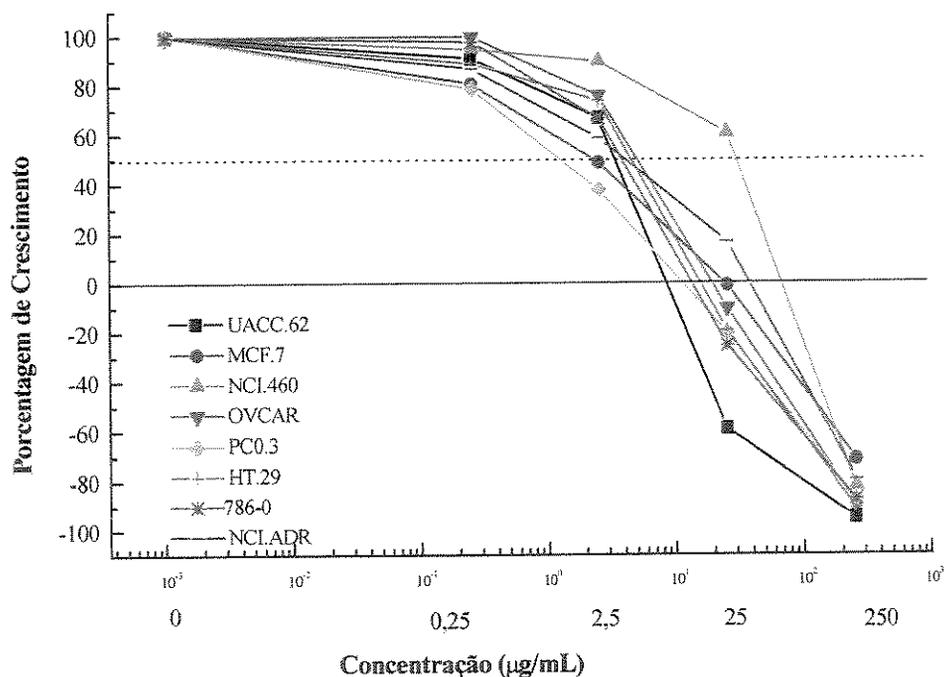
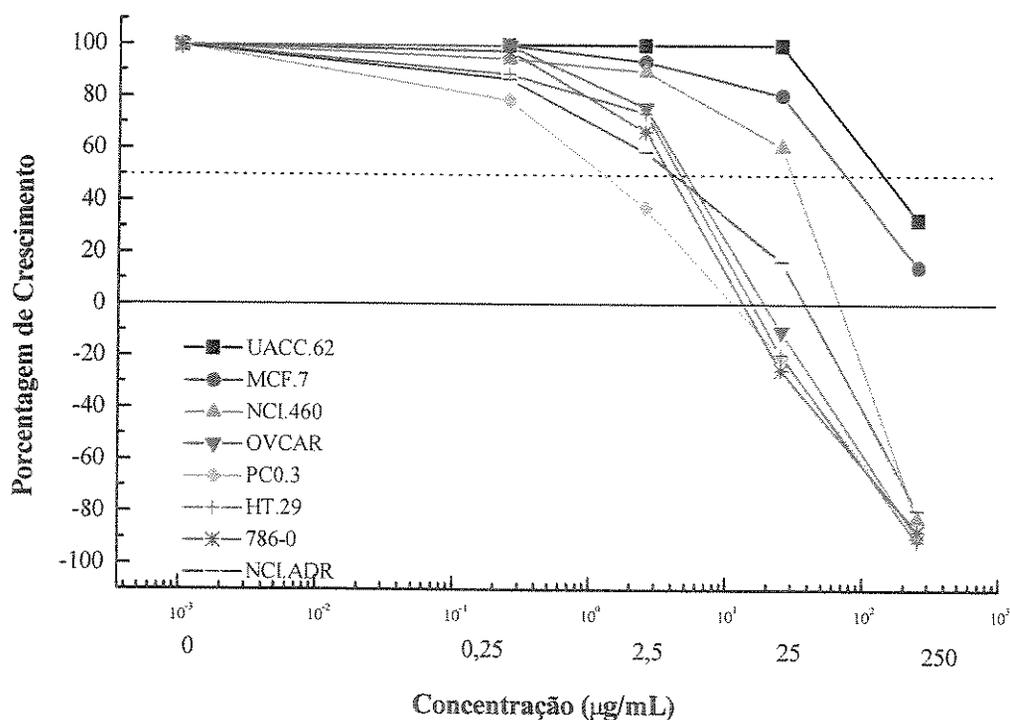


Gráfico 18: Curva concentração-atividade da fração 04 (F4) de *Cordia curassavica* sobre as linhagens celulares tumorais humanas.

#### 4.5) Curva concentração-resposta da fração 06 (F6) obtida do fracionamento da fração de média polaridade de *Cordia curassavica*

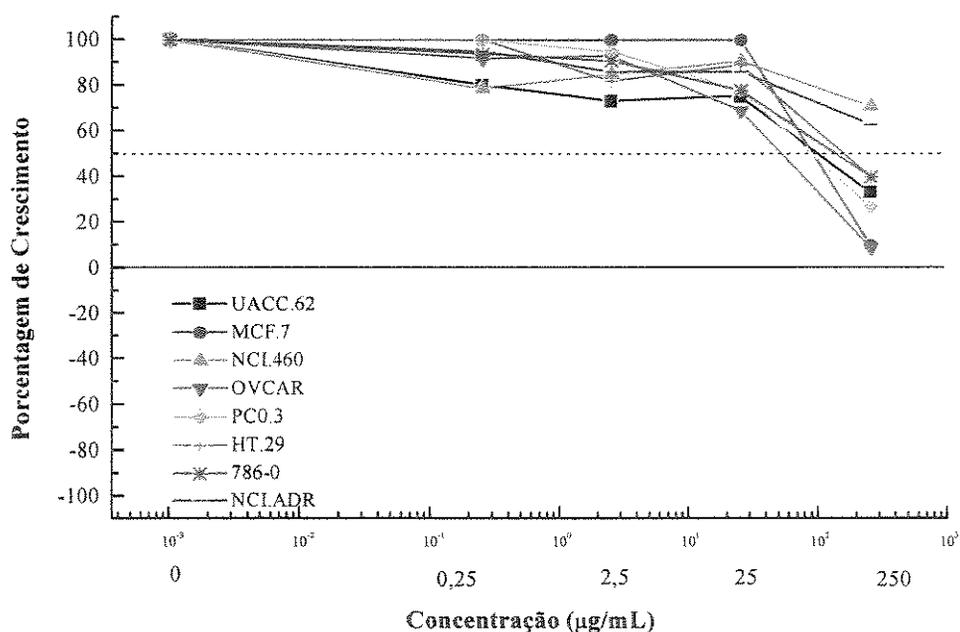
O gráfico 19 representa a curva concentração-resposta da F6 sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração de extrato utilizado. A atividade antiproliferativa desta fração apresentou efeito citostático para as linhagens UACC-62 (melanoma) e MCF-7 (mama) e efeito citostático e citocida para as demais linhagens.



**Gráfico 19:** Curva concentração-atividade da fração 06 (F6) de *Cordia curassavica* sobre as linhagens celulares tumorais humanas.

#### 4.6) Curva concentração-resposta da fração 08 (F8) obtida do fracionamento da fração de média polaridade de *Cordia curassavica*

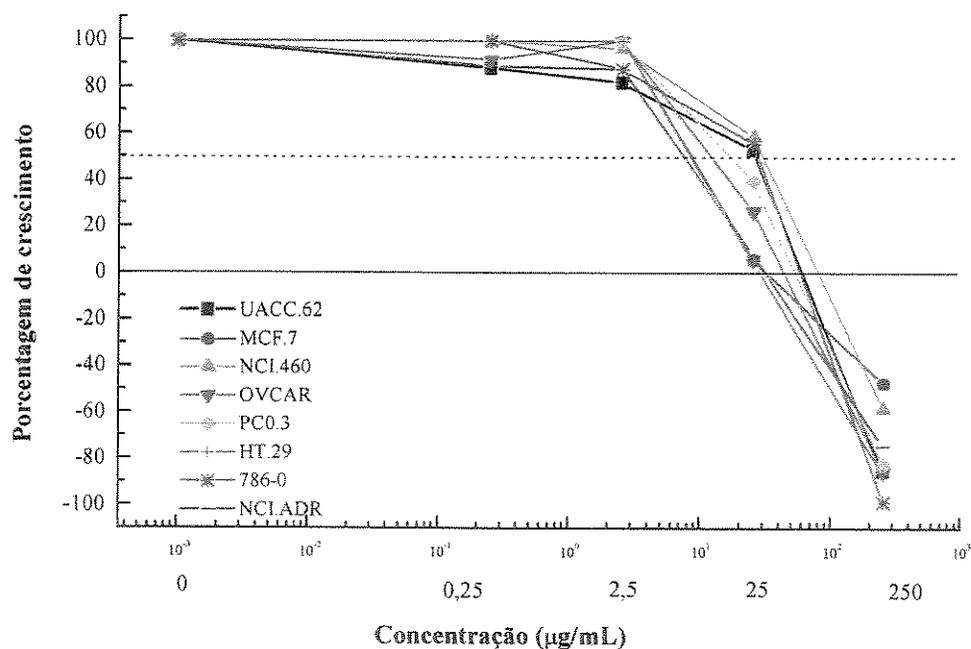
O gráfico 20 representa a curva concentração-resposta da F8 sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração de extrato utilizado. A curva demonstrou que F8 apresentou atividade antiproliferativa seletiva apenas na maior concentração, com efeito citostático sobre as linhagens UACC-62 (melanoma), OVCAR-03 (ovário), MCF-7 (mama), PCO-3 (próstata), 786-0 (renal) e HT-29 (cólon).



**Gráfico 20:** Curva concentração-atividade da fração 08 (F8) de *Cordia curassavica* sobre as linhagens celulares tumorais humanas.

#### 4.7) Curva concentração-resposta da fração 11 (F11) obtida do fracionamento da fração de média polaridade de *Cordia curassavica*

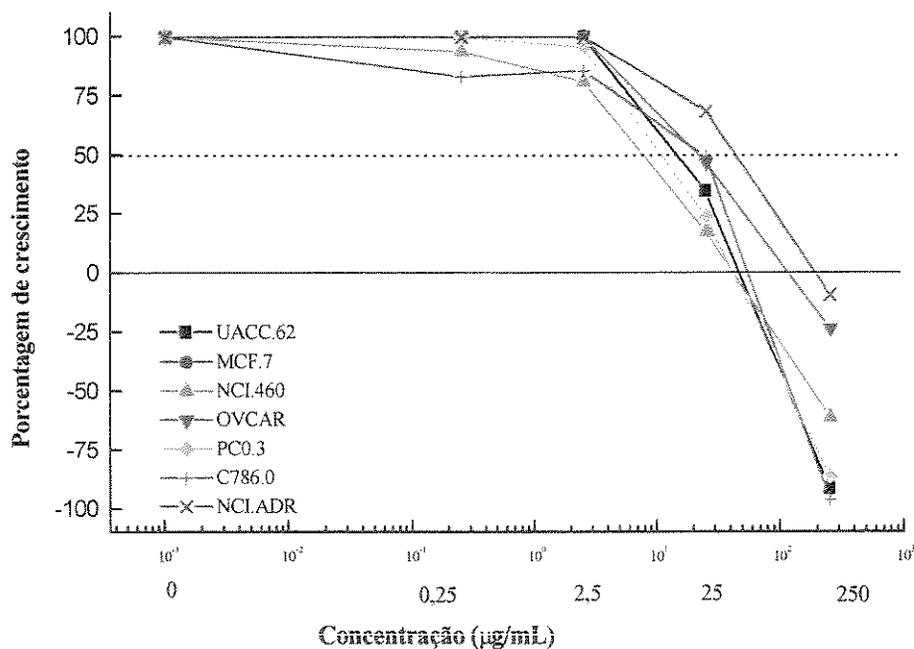
O gráfico 21 representa a curva concentração-resposta da F11 sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração de extrato utilizado. A curva demonstrou que F11 possui atividade concentração dependente, efeito citostático e citocida sobre todas as linhagens celulares.



**Gráfico 21:** Curva concentração-atividade da fração 11 (F11) de *Cordia curassavica* sobre as linhagens celulares tumorais humanas.

#### 4.8) Curva concentração-resposta da indometacina

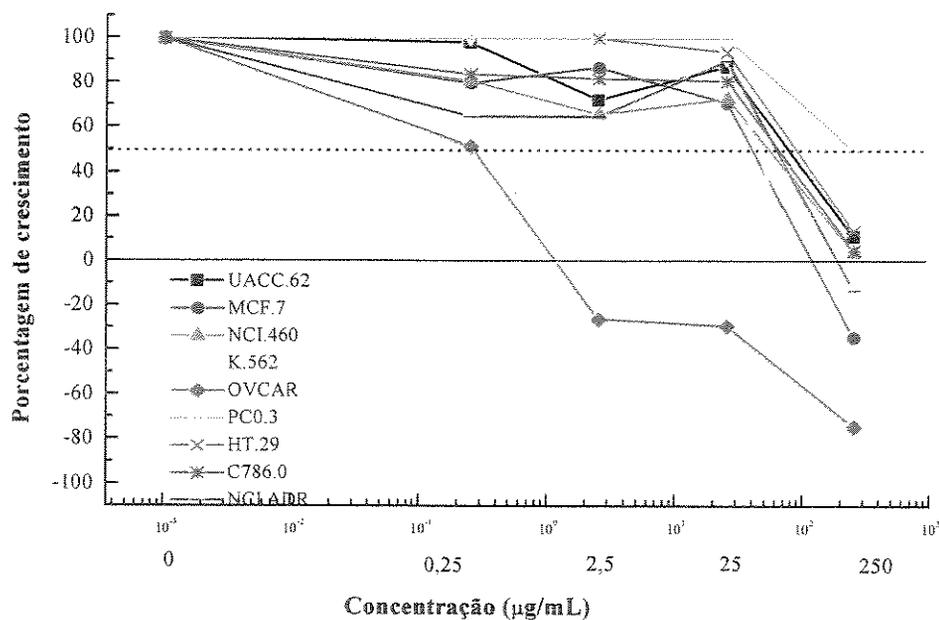
O gráfico 22 representa a curva concentração-resposta da indometacina sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração utilizada. A curva demonstrou que a indometacina possui atividade antiproliferativa, com efeito citostático e citocida sobre todas as linhagens.



**Gráfico 22:** Curva concentração-atividade da indometacina sobre as linhagens celulares tumorais humanas .

#### 4.9) Curva concentração-resposta da fração $\alpha$ obtida do fracionamento da fração 6 de *Cordia curassavica*

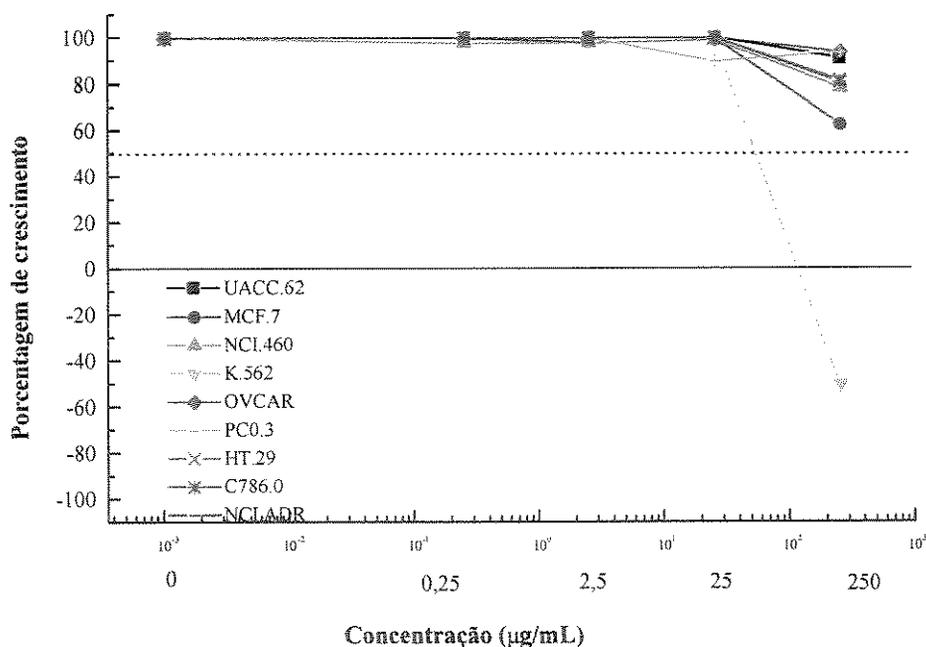
O gráfico 23 representa a curva concentração-resposta da F $\alpha$  sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração utilizada. A curva demonstrou que a F $\alpha$  possui atividade antiproliferativa, com efeito citostático sobre a UACC.62 (melanoma), NCI.460 (pulmão), PCO.3 (próstata), HT.29 (cólon), C786.0 e citocida sobre a OVCAR (ovário) e a NCIADR (mama) MCF.7 (mama) e K.562 (leucemia). Essa fração foi seletiva para a linhagem de câncer ovariano.



**Gráfico 23:** Curva concentração-atividade da fração  $\alpha$  (F $\alpha$ ) de *Cordia curassavica* sobre as linhagens celulares tumorais humanas.

#### 4.10) Curva concentração-resposta da fração $\gamma$ obtida do fracionamento da fração 6 de *Cordia curassavica*

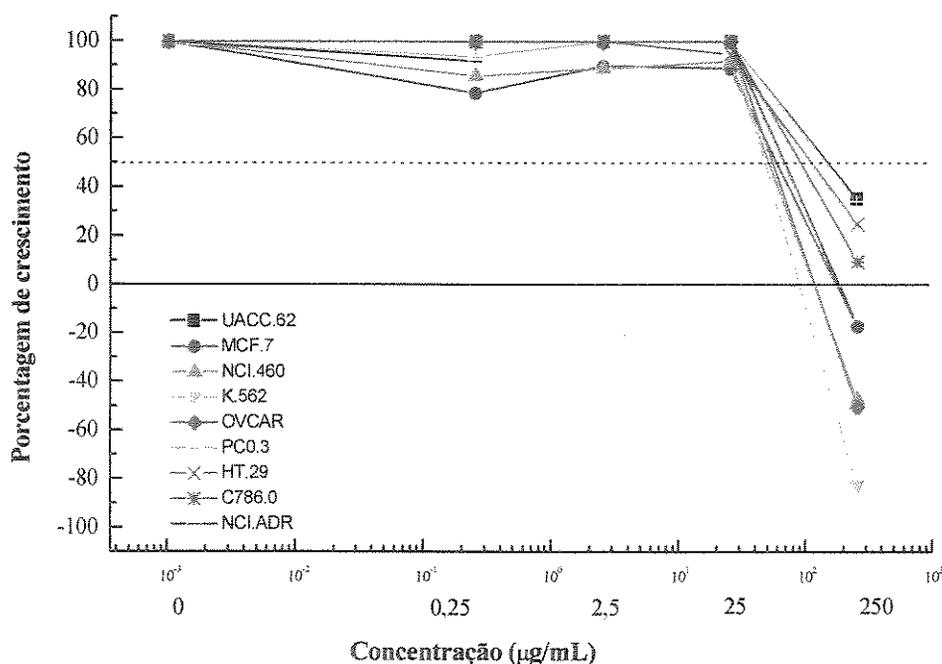
O gráfico 24 representa a curva concentração-resposta da sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração utilizada. A curva demonstrou que a F $\gamma$  possui atividade antiproliferativa, com efeito citocida somente na concentração mais elevada, para K.562 (leucemia).



**Gráfico 24:** Curva concentração-atividade da fração  $\gamma$  (F $\gamma$ ) de *Cordia curassavica* sobre as linhagens celulares tumorais humanas.

#### 4.11) Curva concentração-resposta da fração $\tau$ obtida do fracionamento da fração 6 de *Cordia curassavica*

O gráfico 25 representa a curva concentração-resposta da sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração utilizada. A curva demonstrou que a  $F\tau$  possui atividade antiproliferativa, somente na concentração mais elevada, com efeito citocida para K.562 (leucemia) OVCAR (ovário). NCI.460(pulmão), UACC.62(melanoma), MCF.7(mama) e citostático em PCO.3(próstata), HT.29(cólon), C786.0 (renal), NCIADR (mama).



**Gráfico 25:** Curva concentração-atividade da fração  $\tau$  ( $F\tau$ ) de *Cordia curassavica* sobre as linhagens celulares tumorais humanas.

# *Discussão*

## Discussão

Este trabalho teve como objetivo estudar a atividade antiinflamatória dos extratos obtidos da espécie vegetal *Cordia curassavica* DC, popularmente utilizada em processos inflamatórios. O Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Unicamp desenvolveu estudos agrônômicos e fitoquímicos dessa espécie, e atualmente possui uma área em seu campo experimental destinada ao seu cultivo. O material vegetal foi submetido a extrações com diversos solventes: éter de petróleo, diclorometano e etanólico, obtendo-se assim o extrato bruto éter de petróleo (EBP), o extrato bruto diclorometânico (EBD) e o extrato bruto etanólico (EBE).

O “screening” hipocrático permite avaliar os efeitos das drogas sobre o estado de consciência e disposição, a atividade exploratória, coordenação motora, tônus muscular, reflexos e atividade sobre o sistema nervoso central e autônomo. Este teste possibilita a aquisição dos dados preliminares sobre os efeitos que um extrato bruto possa produzir, direcionando as investigações científicas posteriores (Malone, 1977). Nos primeiros 15 minutos é avaliada a atividade exploratória, ou seja, o animal explora a gaiola, um ambiente novo, o que é medido através da ambulação. Dos 15 aos 60 minutos, é avaliada a atividade motora do animal, isto é, ele já conhece o ambiente e não o explora mais, e sim se movimenta (Carlini e Burgos, 1979). Os camundongos tratados com o EBD, com o EBE e com o EBP da *Cordia curassavica* por via oral não apresentaram qualquer alteração comportamental ou motora. Os animais que receberam os extratos por via intraperitoneal nas mesmas doses também não apresentaram alterações da coordenação motora, do tônus muscular e também não apresentaram sedação.

Entre os métodos utilizados para selecionar e avaliar drogas antiinflamatórias, a técnica mais comum, avalia a inibição do edema produzido na pata de ratos pela injeção de um agente flogístico. Entre os diversos agentes, o mais utilizado é a carragenina (Winter, 1962). Em 1969 Levy, introduziu o uso de camundongos em estudos farmacológicos de

inflamação aguda e demonstrou que a evolução do edema de pata induzido por carragenina era semelhante ao do rato. A carragenina, é um polissacarídeo sulfatado derivado de algumas espécies de algas, que desencadeia uma inflamação aguda associada a hiperalgesia envolvendo liberação seqüencial de vários mediadores inflamatórios, como radicais livres do oxigênio, óxido nítrico entre outros. A injeção intraplantar de carragenina é seguida de um aumento imediato da permeabilidade vascular, levando à exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas (edema) com migração leucocitária predominante de neutrófilos (Giraldelo, 1994). Winter (1962), sugeriu que não havia liberação inicial de histamina e serotonina, pois o uso de antagonistas isolados deste últimos não inibia o edema induzido por carragenina. Estudos posteriores, sugeriram que havia a liberação de mediadores endógenos em três fases distintas. Na primeira fase ocorre uma liberação de histamina e 5-HT, ambas sendo liberadas ao mesmo tempo e desse modo exercem efeitos na permeabilidade vascular. A segunda fase da resposta inflamatória aguda ocorre liberação de bradicinina e por fim na última fase, a liberação de prostaglandinas (Di Rosa e col., 1970).

Os resultados obtidos com os extratos EBD, EBE e o EBP de *Cordia curassavica* no modelo edema de pata induzido por carragenina, demonstraram que as substâncias antiedematogênicas da *Cordia curassavica* são extraídas principalmente por solventes de média polaridade, pois a redução do edema foi obtida com os extratos diclorometânico e etanólico. O EBD de *Cordia curassavica* promoveu uma inibição do edema de pata após 4 e 5 horas da administração do agente flogístico já na dose de 300 mg/kg, sugerindo atividade sobre os mediadores tardios, como as prostaglandinas. O EBP não inibiu o edema de pata induzido pela carragenina. O EBD, foi escolhido para dar prosseguimento ao trabalho, em virtude de sua ação antiedematogênica e pelo diclometano extrair quantidade menor de substâncias.

A liberação de histamina e serotonina em consequência da degranulação de mastócitos é o primeiro evento ocorrido na formação do edema induzido pela carragenina. Afim de se avaliar se o provável mecanismo de ação é consequência do bloqueio da liberação de histamina ou de seus receptores, o EBD foi avaliado em modelo de edema de pata induzido

pelo composto 48/80. O composto 48/80 é uma substância constituída de uma mistura de polímeros de baixo peso molecular derivados da P-metoxi-N-metilfenetilamina. É um potente liberador de histamina através da mobilização das reservas de cálcio presentes no retículo endoplasmático (Landucci e col., 1995). O edema de pata induzido pela injeção do composto 48/80 atinge o pico máximo após 30 minutos. O EBD de *C. curassavica* (100mg/kg, 300mg/kg e 1000mg/kg, vo.) não inibiu o edema, quando comparado à prometazina, utilizada como controle positivo deste experimento, que inibiu o edema em 72% e 71% após 30 e 60 minutos, respectivamente, da administração do composto 48/80. Estes resultados sugerem que o provável mecanismo de ação do EBD de *C. curassavica* não é por impedimento da degranulação de mastócitos com conseqüente liberação de histamina, ou por bloqueio de seus receptores.

Outro mediador envolvido no processo inflamatório é a bradicinina. Esse autacóide quando administrado na pata de rato produz vasodilatação intensa, dor e aumento de permeabilidade vascular. Liga-se ao receptor  $B_2$ , acoplado à proteína G, e ativa a fosfolipase  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>), que libera ácido araquidônico dos fosfolípídeos ligados à membrana celular, que por sua vez dará origem às prostaglandinas e leucotrienos. Alguns autores sugerem que a ativação de receptores  $B_2$  estão presentes no início do processo inflamatório (Calixto e col., 2000; Tippmer e col., 1994). Embora o EBD tenha reduzido o edema de pata produzido pela bradicinina, não é possível ainda, concluir que os princípios ativos desse extrato bruto tenham interação direta com os receptores da bradicinina ou atuem numa segunda etapa, inibindo a síntese de prostaglandinas, iniciada pela liberação da PLA<sub>2</sub>.

Portanto a atividade do EBD foi avaliada em edema de pata induzido por fosfolipase  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>). O edema de pata induzido pelo veneno de *Naja Naja*, rico em PLA<sub>2</sub>, tem sido muito utilizado (Versani, 1997). A PLA<sub>2</sub> é uma enzima que hidrolisa fosfolípídios de membrana para produzir lisofosfolípídios (Liso-FAP) e ácidos graxos, principalmente ácido araquidônico (AA). O AA é metabolizado via ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX), produzindo os eicosanóides, como as prostaglandinas (PG) e Leucotrienos (LT), respectivamente, que medeiam o processo inflamatório. Por outro lado, o Liso-FAP é

precursor do PAF, que aumenta a permeabilidade vascular e induz quimiotaxia de granulócitos (Yedgar e col., 2000; Versani, 1997).

No modelo de inflamação induzido pela PLA<sub>2</sub> do veneno da *Naja naja*, o EBD de *C. curassavica* inibiu o edema já na dose de 300 mg/kg. Esse efeito sugere que o EBD interfere na síntese e/ou na atividade das prostaglandinas e/ou leucotrienos. No entanto, não é possível determinar em que nível da cascata de eventos relacionada com esses mediadores o EBD interfere.

Para descartar um possível efeito por liberação de corticóides endógenos, o EBD foi avaliado em edema de pata induzido por carragenina em ratos adrenalectomizados. Pois, na interpretação do edema como sinal de inflamação, limitações devem ser consideradas pois sua formação depende da perfusão vascular do tecido avaliado, da pressão sanguínea sistêmica e dos níveis de glicocorticóides circulantes, podendo também determinar o aparecimento de resultados falsos positivos (Rates e Barros, 1994). O efeito antiinflamatório dos corticosteróides endógenos, é em parte atribuído a síntese de lipocortina, proteína que inibe a atividade da PLA<sub>2</sub> impedindo a liberação de AA e liso-PAF e a conseqüente formação de PGs, Leucotrienos e PAF. (Landucci e col., 1995). A análise dos resultados nos mostraram que o EBD continuou inibindo o edema de pata induzido pela carragenina, mostrando que o efeito antiedematogênico é independente da liberação de corticóides endógenos.

O modelo de edema orelha induzido por óleo de cróton também foi utilizado para avaliar a atividade antiedematogênica do EBD de *C. curassavica*. Este modelo é utilizado primeiramente na pesquisa da atividade de agentes antiinflamatórios de uso tópico. O óleo de cróton é um agente flogístico altamente irritante que provoca uma dermatite intensa caracterizada por vasodilatação, edema e migração leucocitária. Esta reação é devida à liberação de mediadores inflamatórios como prostaglandinas, histamina e serotonina (Tubaro e col., 1985; Segura e col., 1998). Os resultados demonstraram que o EBD (aplicação tópica) nas doses de 300 mg/kg e 1000 mg/kg reduziu o edema de orelha

induzido pelo óleo de cróton em 38% e 54%, respectivamente. A dexametasona provocou uma redução de 63,5%. Repetindo o mesmo experimento, agora com a indometacina como controle positivo, constatamos que o EBD de *C. curassavica* inibiu o edema em 42%, de modo semelhante à indometacina que também inibiu o edema em 47%. Os dados obtidos no presente trabalho apontam para substâncias lipossolúveis, que podem, provavelmente, justificar o uso popular dos extratos dessa espécie, em administração pela via dérmica.

A migração de leucócitos para região inflamada é um aspecto importante do processo inflamatório (Carvalho e col., 1999). Por isso, a atividade do EBD de *C. curassavica* sobre a migração leucocitária foi avaliada em peritonite induzida por carragenina em camundongos. Este modelo de inflamação aguda permite a quantificação de leucócitos que migram para a cavidade peritoneal sob a ação de agentes quimiotáticos (Ferrándiz e Alcaraz, 1991). A administração oral do EBD (1000 mg/kg, vo) reduziu o número de leucócitos em 70% na cavidade peritoneal, seguindo perfil semelhante ao da dexametasona, que inibiu a migração em 74% e da indometacina com redução de 67%. Estes resultados confirmam a atividade antiinflamatória do EBD de *C. curassavica*.

Para a avaliação da atividade antinociceptiva, um dos modelos utilizados foi o “Writhing test”(método químico). O “Writhing” consiste em um conjunto de sinais que abrangem intermitentes contrações do abdômem, contorção e giro do tronco e extensão dos patas terseiras como respostas reflexas à irritação provocada pela injeção intraperitoneal de ácidos fracos ou outros agentes inflamatórios (Siegmund e col., 1957; Rates e Barros, 1994). A atividade antinociceptiva foi avaliada em termos de porcentagem de inibição das contorções induzidas pelo ácido acético. Este teste é utilizado na pesquisa de drogas analgésicas com ação antiinflamatória, e analgésicos de ação central (Siegmund e col., 1957; Ochi e col., 2000).

O ácido acético induz a liberação de mediadores álgicos endógenos como por exemplo: prostaglandinas, histamina, bradicinina, que estimulam as terminações nervosas

nociceptivas, desencadeando a sensação dolorosa (Matsumoto e col., 1998; Ribeiro e col., 2000; Bispo e col., 2001).

Os resultados obtidos demonstraram que o EBD de *C. curassavica* inibiu o número de contorções abdominais de maneira dose-dependente, seguindo perfil semelhante ao da indometacina, e nas mesmas doses que reduziram o edema de pata induzido por carragenina.

A atividade antinociceptiva, também foi estudada no teste da placa quente (hot plate) em camundongos. Este modelo mede o tempo de reação do animal a um estímulo térmico (Woolfe e McDonald, 1944). O teste de placa quente é adequado para a detecção de analgésicos de ação central como os opióides. Drogas do tipo aspirina prolongam o tempo de reação ao estímulo térmico somente em doses tóxicas (Rates e Barros, 1994). O tratamento com o EBD de *C. curassavica* por via oral, não aumentou o tempo de reação ao estímulo térmico em comparação com a morfina, utilizada como controle positivo deste experimento. Os resultados da avaliação da atividade antinociceptiva, confirmam que a atividade antiinflamatória do EBD de *Cordia curassavica* é por bloqueio da reação inflamatória.

Os resultados obtidos incentivaram o processo de purificação, que teve início com a obtenção da fração rica em artemetina. A artemetina, um dos flavonóides presentes nessa espécie, foi detectada nesses extratos, e de acordo com os resultados obtidos por Sertie e col. (1990), a presença desse flavonóide justifica a atividade antiedematogênica obtida por esses extratos. No entanto a fração rica em artemetina, purificada dessa espécie, não apresentou atividade antiedematogênica no modelo experimental utilizado, quando administrada pela via oral.

Os flavonóides são substâncias amplamente distribuídas na natureza contribuindo para a coloração das flores, frutos e folhas das plantas. Existem muitos trabalhos que descrevem os efeitos farmacológicos dos flavonóides entre eles: atividade antiinflamatória,

imunomoduladora, antioxidante, diurética, antiespasmódica, antimicrobiana, anticancerígena e antioxidante. Se estima que em uma alimentação bem balanceada o homem consome cerca de um grama de flavonóides por dia (Alonso; 1998). No entanto a maior parte desses flavonóides são metabolizados no sistema digestivo e com isso reduzindo a biodisponibilidade dessas substâncias (Di Carlo, 1999; Middleton, 2000). Isto pode justificar a ausência de efeito antiedematogêncio observado com a artemetina, mesmo em dose de 300 mg/kg.

Um extrato bruto etanólico de qualquer espécie vegetal possui dezenas ou centenas de substâncias. Quando esse extrato apresenta atividade farmacológica, somente algumas substâncias são responsáveis pelas ações observadas. Alguns trabalhos publicados com o extrato etanólico de *Cordia* revelaram atividade antiinflamatória com doses de 0,6 a 3,0 mg/kg (Sertié e col., 1988) e inclusive por administração tópica (Basile e col., 1991). Essa potência antiinflamatória de um extrato bruto é comparada somente aos antiinflamatórios esteroidais puros como a dexametasona. Portanto é muito pouco provável que um extrato bruto contendo centenas de substâncias possa ter tanta potência. Nesse caso a presença de solventes e ou a liberação de corticóides endógenos devem ser investigados.

Para confirmar se a artemetina possui efeito antiinflamatório outras vias de administração devem ser exploradas. No entanto, essa não parece ser uma missão muito fácil pois a administração por via intraperitoneal, sub-cutânea ou intramuscular provoca um processo inflamatório local com a conseqüente liberação de corticóides endógenos, dificultando a avaliação da atividade do produto em teste. A presença de resíduos de solventes, como a acetona utilizada para extração da artemetina, pode também provocar a liberação de corticóides endógenos induzindo a obtenção de resultados falso-positivos.

Devido a ausência de efeito da fração rica em artemetina, o EBD foi fracionado para a obtenção de frações que se diferenciasssem pela presença de grupamentos químicos. Deste modo, por cromatografia, foram obtidas três frações que foram denominadas: Fração Superior (fração apolar FS), Fração Média (fração de média polaridade FM) e uma Fração

Inferior (Fração polar (F1); e duas frações intermediárias denominadas: fração 30 (F30) e fração 39 (F39). Essas frações foram avaliadas no modelo de edema de pata induzido por carragenina.

Os resultados obtidos demonstraram que a FM reduziu o edema de pata induzido por carragenina em 41%, 49% e 38%, após 3, 4 e 5 após a administração do agente flogístico respectivamente. Este resultado foi semelhante a indometacina que inibiu em 40%, 42% e 55%, após 3, 4 e 5 após a administração do agente flogístico respectivamente. A fração inferior reduziu o edema em 36% e 48%, após 4 e 5 após a administração do agente flogístico. As demais frações não apresentaram atividade antiedematogênica neste modelo.

A fração FM por apresentar maior rendimento e atividade, foi selecionada para um novo fracionamento. Desse modo, foram obtidas 6 frações (F1, F3, F4, F6, F8 e F11). Como foram obtidas quantidades pequenas dessas frações, sendo insuficientes para testá-las em modelo animal, foram testadas *in vitro*, utilizando a metodologia que avalia a atividade antiproliferativa dos extratos em células tumorais humanas.

A metodologia de triagem antiproliferativa *in vitro*, preconizada pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos e utilizada neste trabalho, permite a avaliação das substâncias-teste em diversos tipos de células neoplásicas, possibilitando a descoberta de drogas com maior especificidade. Outras vantagens são a rapidez, eficiência e reprodutibilidade dos resultados e o baixo consumo de princípios ativos (Skehan e col, 1990).

Essa escolha foi baseada em alguns trabalhos que relacionam a enzima ciclooxigenase e câncer. De acordo com estes estudos, algumas células neoplásicas expressam a enzima COX-2 em grande quantidade, produzindo PGE<sub>2</sub>, que é responsável pelo crescimento e manutenção dos tumores (Takedo, 1998).

A ciclooxigenase, enzima responsável pelo metabolismo do ácido araquidônico e síntese de prostaglandinas, existe em duas formas: COX-1 e COX-2. A COX-1 é encontrada em

muitas células como enzima constitucional, regulando diversos processos fisiológicos. Já a COX-2 é induzida em células inflamatórias. Muitos estudos demonstram a participação da aspirina, e outros antiinflamatórios não esteroidais, na prevenção de câncer de cólon (Masferrer e col, 2000; Liu e col, 2000). Constatou-se que vários tumores, incluindo o câncer de cólon, contém concentrações elevadas de prostaglandinas e que o risco de pacientes com predisposição genética para esse câncer quando tratados com antiinflamatórios não-esteroidais (NSAIDs) diminuiu. A relação entre a neoplasia e o aumento no nível de prostaglandinas, deu base para o uso racional de NSAIDs como agentes preventivos de câncer (Takedo, 1998)

Diversas evidências apontam que a enzima COX- 2 também está relacionada com a progressão do tumor, pois está expressa em quantidade elevada em metástases de células cancerígenas humanas, além de se observar uma forte ligação entre a PGE<sub>2</sub> e o estímulo da angiogênese. Proliferação celular associada com inflamação crônica também está envolvida em diversos tipos de câncer, como o de pele, de bexiga, de fígado e de próstata. Na glândula prostática humana, foram observados níveis elevados de COX-2 e de PGs (Myers e Ghosh, 1999; Liu, e col., 2000; Kirschenbaum e col., 2001). Novos estudos *in vitro* e *in vivo* tentam relacionar a atividade dos inibidores específicos da COX-2, com a indução da apoptose e o bloqueio da produção de PGE<sub>2</sub>, mediador que induz a angiogênese, necessária para o suprimento de oxigênio e nutrientes às células neoplásicas (Masferrer e col, 2000; Liu e col, 2000; Sjö Dahl, 2001). Em câncer pulmonar, há aumento na produção de PGs e a inibição da COX-2 está associada com a indução da apoptose das células cancerígenas (Watkins e col., 1999).

Com o objetivo de avaliar a relação entre as substâncias que inibem a expressão da enzima ciclooxigenase e a atividade citocida ou citostática em células tumorais, as frações obtidas de *C. curassavica* foram avaliadas em cultura de células tumorais humanas. A indometacina, foi utilizada como controle positivo, e os resultados obtidos demonstraram boa correlação entre a atividade antiproliferativa e antiinflamatória. Desta forma, essa

metodologia foi utilizada para o monitoramento do processo de isolamento e identificação dos princípios ativos, pois não necessita de quantidades elevadas dos mesmos.

As frações F3, F4, F6 e F11 obtidas do EBD apresentaram efeito citostático e citocida para diversas linhagens celulares. Por apresentar maior seletividade a F6 foi selecionada para novo fracionamento. Esse novo processo deu origem a outras três frações. No entanto, os resultados obtidos demonstraram que os princípios ativos se distribuíram entre essas três frações. Esses resultados sugere que os princípios ativos da *Cordia curassavica* têm estrutura química muito semelhante e, portanto, métodos de separação específicos deverão ser utilizados.

# *Conclusões*

## Conclusões

A análise dos dados obtidos neste trabalho revelou que:

- ✓ O extrato bruto diclorometânico (EBD) de *Cordia curassavica* foi o que apresentou maior potência antiedematogênica em modelo de inflamação induzida por carragenina, indicando a presença de substâncias de média polaridade. Esse resultado foi reproduzido em animais adrenalectomizados, excluindo a participação de corticóides endógenos.
  
- ✓ A atividade desse extrato (EBD), foi confirmada em modelo de edema de pata induzido por bradicinina e fosfolipase A<sub>2</sub>, sugerindo atividade inibitória sobre a síntese e/ou atividade de prostanóides.
  
- ✓ A atividade desse extrato, foi confirmada em modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton e na peritonite induzida por carragenina.
  
- ✓ A atividade antinociceptiva observada somente no modelo de algesia induzida pela injeção de ácido acético no peritônio, reforça a ação antiinflamatória.

- ✓ O EBD e frações, a exemplo dos antiinflamatórios não-esteroidais, produziu efeito citostático e citocida em cultura de células tumorais humanas, que serão utilizadas para purificação dos princípios ativos.
  
- ✓ A fração rica em artemetina não reduziu o edema de pata produzido pela carragenina, excluindo a participação dessas substâncias nos efeitos antiinflamatórios observados.

# *Summary*

## Summary

The *Cordia curassavica* (Boraginaceae), known popularly as "erva baleeira", is used in folk medicine for treatment of several inflammatory processes and as healing agent. The scope of this work was to evaluate the antiedematogenic activity; the antinociceptive activity, and antiproliferative of crude as extracts from *Cordia curassavica* well as the artemetin enriched fraction.

The petroleum ether, dichloromethane, ethanol crude extracts and artemetin fraction were evaluated on paw edema model induced by carrageenin. The crude dichloromethane showed significant antiedematogenic activity, but artemetin enriched fraction extract did not show activity. The petroleum ether crude extract did not produce significant paw edema reduction. Therefore the dichloromethane crude extract was chosen to continue with this study.

The antinociceptive activity was demonstrated employed hot plate and acetic acid-induced abdominal constriction writhing model. The dichloromethane extract also showed antinociceptive activity by inhibition of acetic acid-induced writhing in mice. Nevertheless in hot plate model this extract did not reveal activity, suggesting a straight relationship of analgesic activity with inflammatory process inhibition .

The dichloromethane crude extract showed antiedematogenic activity in experimental models with paw edema induced by, bradykinin and naja naja, as well ear edema induced by croton oil. This extract inhibited too edema formation by carragenin induced in adrenalectomized rats, rejecting the anti-inflammatory activity by exclusively endogenous corticoids.

The antiproliferative activity was examined in human cell culture. The fraction F4 e F6 showed antiproliferative activity related to concentration, showing cytotoxicity in the

highest concentration tested. Based on these results, we suggest that the anti-inflammatory activity the extracts is due that interference in produced prostanoides.

# *Referências Bibliográficas*

## *Referências Bibliográficas*

- Alice, C.B.; Siqueira, N.C.S.; Mentz, L.A.; Silva, G.; José K.F.D. Plantas Mediciniais de Uso Popular. Atlas farmacognóstico: 1a ed, Canoas, Ulbra: 9, 1995.
- Alonso, J.R. **Tratado de Fitomedicina** 1a ed. ISIS Edicione S.R.S ,1998.
- Angely J. **Flora Analítica e Fitogeográfica do Estado de São Paulo.**, 4: 822, 1970.
- Bakker, R.A; Wieland, K; Timmerman, H; Leurs, R. Constitutive activity of the histamine H<sub>1</sub> receptor reveals inverse agonism of histamine H<sub>1</sub> receptor antagonists. **Europ J Pharmacol** 387: R5-R7, 2000.
- Basile, A.C.; Sertie, J.A.A.; Oshiro, T.; Caly, K.D.V.; Panizza, S. Topical Anti-Inflammatory Activity and Toxicity of *Cordia verbenacea*. **Fitoterapia** 1:260-262, 1998.
- Bedick, J.C.; Pardy, R.L.; Howard, R.W.; Stanley, D.W. Insect cellular reactions to the lipopolysaccharide component of the bacterium *Serratia marcescens* are mediated by eicosanoids. **Journal of Insect Physiology**, 46: 1481-1487, 2000.
- Beekhuizen, H; Gevel, J.S. Endothelial Cell Adhesion Molecules in Inflammation and Postischemic Reperfusion Injury. **Transpl Proc** 30: 4251-4256, 1998.
- Bellingan, G. Leukocytes: friend or foe. **Intensive Care Med.**26: 111-118, 2000.

- Bispo, M.D.; Mourão, R.H.V.; Franzotti, E.M.; Bomfim, K.B.R.; Arrigoni-Blank, M.F.; Moreno, M.P.N.; Marchioro, M.; Antonioli, A.R. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, 76: 81-86, 2001.
- Bodin, P.; Burnstock, G. Increased release of ATP from endothelial cells during acute Inflammation. **Inflammation. Res.**, 47:351-354, 1998.
- Brooks, P.M.; O Day, R. COX-2 inhibitors. **MJA**: 173: 433-436, 2000.
- Calixto, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**.33:179-189, 2000.
- Calixto, J.B.; Cabrini, D.A.; Ferreira, J.; Campos, M.M. Kinins in pain and inflammation. **Pain** 87:1:5, 2000.
- Carlini, E.A.; Burgos, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre diazepam e o clorobenzapam. **Rev. Assoc. bras. Psiq. São Paulo**, 1(3): 25-31, 1979.
- Carvalho, J.E. Fitoterápicos: Alimentos ou Medicamentos? III Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos. Campinas, SP, 16 a 19 de novembro de 1999.
- Carvalho, J.C.T.; Sertié, J.A.A.; Barbosa, M.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. **Journal of Ethnopharmacology**, 64: 127-133, 1999.

- Chang, J. Medicinal Herbs: Drugs or Dietary Supplements? **Biochemic Pharmacology** **59**: 211-219, 2000.
- Cicala, C.; Cirino, G. Linkage between inflammation and coagulation: an update on molecular basis of crosstalk. **Life Science** **62(20)**: 1817-1824, 1998.
- Cirino, G. Multiple controls in inflammation. **Biochemical Pharmacology**, **55**:105-111,1998.
- Cirino, G; Napoli, C.; Bucci, M.; Cicala, C. Inflammation-coagulation network: are serine Proteases receptors the knot? **TIPS** **20**:170-173, 2000.
- Cockaine, D.A. Urinary hiporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. **Nature**, **407**: 1015-1017, 2000.
- Cragg, G. M., Newman, D. J. Discovery and Development of Antineoplastic Agentes from Natural Sources. **Cancer Investigation**, **17(2)**: 153-163, 1999.
- Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A.A.; Capasso, F. Flavonoids: old new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, **65 (4)**: 337-353,1999.
- Di Rosa, M.; Giroud, J.P.; Willoughby, D.A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal. Path.**, 104: 15-27, 1970.
- Dunlop, R.J.; Campbell, C.W. Cytokines and Advanced Cancer. **Journal of Pain and Syntom Management**,**20(3)**: 214-227, 2000.
- Ferrándiz, M. L. and Alcaraz, M. J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents andactions** **32**: 283-288,1991.

- Ficarra, R.; Ficarra, P.; Tommasni, S. Leaf extracts of some cordia species Analgesic and anti-inflammatory activities as well as their chromatographic Analysis. **Fármaco:50(4)**, 245-256.,1995
- Filho, V.C.;Yunes, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceito sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova 21(1)**: 99-104, 1998.
- Foxwell, A; Kyd, J.M; Cripps, A.W. Programmed inflammatory process induced by mucosal immunisation. **Vaccine 19**: 2522-2526, 2001.
- Furchgott, R.F.; Zawadski, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial muscle by acetylcholine. **Nature 288**: 373-376, 1980.
- Gahmberg, C.G.; Valmu, L.; Fagerholm, S.; Kotovuori, P.; Ihanus, E.; Tian, L.; Morikawa P. Leukocyte integrins and inflammation. **Cellular and Molecular Life Science 80**:549-555, 1998.
- Giraldelo, M.M.; Zapellini, A.; Muscará, M.N.; De Lucca, I.; Hyslop, S.; Cirino, G.; De Nucci, G.; Antunes, E. Effect of arginine analogues on rat hind paw oedema and mast cell activation in vitro. **European Journal of Pharmacology, 257**: 87-93, 1994.
- Goumas, G; Tentolouris, C; Tousoulis, D; Stefanadis, C; Toutouzas, P. Therapeutic modification of the L-arginine –eNOS pathway in cardiovascular diseases. **Artherosclerosis 154**, 255-267, 2001.
- Hamburger,M.; Marston, A.; Hostettmann, K. Search for new drugs of plant origin.**Advances in Drug Research, 20**:167-169 , 1991.

- Hebert, M.K; Just, H; Schmidt, R.F. Histamine excites groups III and afferents from the cat knee joint depending on their resting activity. **Neuroscience Letters** **305**: 95-98, 2001.
- Hevko, J.M; Murphy, R.C. Electrospray Ionization and Tandem Mass Spectrometry of Cysteinyl Eicosanoids: Leukotriene C<sub>4</sub> and FOG<sub>7</sub>. **J Am Soc Mass Spectrom** **12**: 763-771, 2001.
- Hinsbergh, V.W,M. The endotelium: vascular control of haemostasis. **Europ J Obstetrics & Gynecology Reprod Biol** **95**: 198-201, 2001.
- Ikeda, Y.; Ueno, A.; Naraba, H.; Oh-ishi, S. Evidence for bradykinin mediation of carrageenin-induced inflammatory pain: a study using kininogen-deficient Brown Norway Katholiek rats. **Biochemical Pharmacology** **61**: 911-914, 2001.
- Ishii, S.; Shimizu, T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. **Progress in Lipid Research** **39**: 41-82, 2000.
- Izzo, A.A.; Costa M.; Mascolo, N.; Capasso, F. The role of histamine H1, H2 and H3 receptors on enteric ascending synaptic transmission in the guinea pig ileum. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.**, **287**:952-957,1998.
- Jagels, MA.; Daffern, P.J.; Hugli, T.E. C3a and C5a enhance granulocyte adhesion to Endothelial and epithelial cell monolayers: epithelial and endothelial priming is require for C3a-induced eosinophil adhesion. **Imunopharmacology** **46**: 209-222., 2000.
- Janero, D.R. Forum: Therapeutic Application of Reative Oxygen and Nitogen Species in Human Disease,. **Free Radical Biology & Medicine** **28(10)**: 1495-1506, 2000.
- Johnston, B; Kubes, P. The  $\alpha_4$  - integrin: na alternative pathway for neutrophil recruitment? **Immunology Today** :12, 1999.

- Junger, H.; Sorkin, L.S. Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNF $\alpha$ . **Pain** **85**:145-151, 2000.
- Kam, P.C.A.; See, A.U-L. Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role. **Anaesthesia** **55**:442-449, 2000.
- Kilgore, K.S.; Ward, P.A.; Warren, J.S. Neutrophil adhesion to human endothelial cells is induced by the membrane attack complex: The role of P-selectin and platelet activating factor. **Inflammation.**, **22**:583-597, 1998.
- Kirschenbaum, A.; Liu, X.; Yao, S.; Levine, A.C. The role of cyclooxygenase-2 in prostate cancer. **Urology**, **58(2<sup>A</sup>)**: 127-131, 2001.
- Lands, W.E. Actions of antiinflammatory drugs. **Trends Pharmacol Sci.**, **2**: 78-80, 1981.
- Landucci, E.C.T.; Antunes, E.; Donato, J.L.; Faro, R.; Hyslop, S.; Marangoni, S.; Oliveira, B.; Cirino, G.; Nucci, G. Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A<sub>2</sub>. **British Journal of Pharmacology.**, **114**: 578-583, 1995.
- Laskin, D.L.; Laskin, J.D. Role of macrophages and inflammatory mediators in chemically induced toxicity. **Toxicology** **160**: 111-118, 2001.
- Levy, L. Carrageenan paw oedema in the mouse. **Life Science**, **8**: 601-606, 1969.
- Lima Pereira, F.E.; Bogliolo, L. Inflamações. Etiopatogênese geral das doenças :20-45, 1994. Male D, Roitt I. Introdução ao sistema imune. Texto de imunologia 4ta ed. Por Roitt Brostoff, Male. Cap1.p:1.2-1.12, migração celular e inflamação. Cap 14p:14.2-14.8, 1994.

- Linardi, A.; Costa, S.K.P.; Silva, G.R.; Antunes, E. Involvement of Kinins, mast cells and sensory neurons in the plasma exudation and oedema induced by staphylococcal enterotoxin B in mouse. **European Journal of Pharmacology** 399: 235-242, 2000.
- Liu, X.H., Kirschenbaum, A., Yao, S., Lee, R., Holland, J.F., Levine, A.C. Inhibition of Cyclooxygenase-2 supresses angiogenesis and The Growth Of Protate Cancer In Vivo. **J. Urology** 164: 820-825, 2000.
- Malone, M. H. Pharmacological approaches to natural product, screening and evaluation. In: **New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity**, ed. By H. Wagner and P. Wolf, pp. 24-53, Springer-Verlag, Berlin, 1977.
- Marathe, G.K.; Harrison, K.A.; Murphy, R.C.; Prescott, S. M.; Zimmerman, G.A.; McIntyre, T.M. Bioactive phospholipid oxidation products. **Free Radical Biology & Medicine** 28 (12): 1762-1770, 2000.
- Masferrer, J.L., Leahy, K.M., Koki, A.T., Zweifel, B.S., Settle, S.L., Woerner, M., Edwards, D.A., Flickinger, A.G., Moore, R.J., Seibert, K. Antiangiogenic and Antitumor Activities of Cyclooxygenase-2 Inhibitor. **Cancer Research** 60: 1306-1311, 2000.
- Matsukawa, A.;Yoshinaga, M. Sequential generation of cytokines during the initiative phase of inflammation, with reference to neutrophils. **Inflammation res.**, 47(3): 7-144, 1998.
- Matsumoto, H.; Naraba, H.; Ueno, A.; Fujiyoshi, T.; Murakami, M.; Kudo, I.; Oh-ishi, S. Induction of cyclooxygenase-2 causes enhancement of writhing response in mice. **Europ. J. Pharmacol.** 352: 47-52, 1998.

- Mazario, J.; Gaitan, G.; Herrero, J.F. Cyclooxygenase-1 vs. cyclooxygenase-2 inhibitors in the induction of antinociception in rodent withdrawal reflexes. **Neuropharmacology** **40**: 937-946, 2001.
- Mayers, I.; Johnson, D. The nonspecific inflammatory response to injury. **Can J Anaesth.**,**45(9)**:871-879, 1998.
- Mayhan, W.G. Role of nitric oxide in modulating permeability of hamster cheek pouch in response to adenosine 5-diphosphate and bradykinin. **Inflammation**, **16(4)**: 295-305, 1992.
- Medeiros, R; Cabrini, D; Calixto, J.B. The “in vivo and “ex vivo” roles of cyclooxygenase-2, nuclear factor- $\kappa$ B and protein kinases pathways in the up-regulation of B<sub>1</sub> receptor-mediated contraction of the rabbit aorta. **Regulatory Peptides** **97**:121-130, 2001.
- Middleton, E.J.; Kandaswami, C.; Theoharides, T.C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian cells: Implication for Inflammation, Heart Disease and Cancer. **Pharmacology Reviews**:**52**: 673-751, 2000.
- Monsinjon, T; Gasque, P; Ischenko, A; Fontaine, M. C3A binds to the seven transmembrane anaphylatoxin receptor expressed by epithelial cells and triggers the production of IL-8. **FEBS Letters** **487**: 339-346, 2001.
- Myers, C; Koki, A; Pamukcu, R; Wechter, W; Padley, R. Proapoptotic Anti-Inflammatory Drugs. **Urology**, **57 (Suppl 4A)**: 73-76, 2001.
- Myers, C.E.; Ghosh, J. Lipoxygenase Inhibition in Prostate Cancer. **European Urology**,**35**: 395-398, 1999.

- Nemerson, Y. Tissue factor and hemostasis. **Journal of American Medical Society of Hematology**,71:1-8, 1988.
- Ochi, T.; Motoyama, Y.; Goto, T. The analgesic effect profile of FR122047, a selective cyclooxygenase-1 inhibitor, in chemical nociceptive models. **Euro. J. Pharmacol.** 391: 49-54, 2000.
- Okabe, T.; Hide, M; Koro, O.; Yamamoto, S. Substance P induces tumor necrosis factor-release from human skin via mitogen-activated protein Kinase. **European Journal of Pharmacology** 389: 309-315., 2000.
- Oketani, K.; Nagakura, N.; Harada, K.; Inoue, T. In vitro effects of E3040, a dual inhibitor of 5-lipoxygenase and thromboxane A<sub>2</sub> synthetase, on eicosanoid production. **European Journal of Pharmacology** 422: 209-216, 2001.
- Opal, S.M.; DePalo, V.A. Anti-inflammatory cytokines.. **Impact of Basic Research on Tomorrow's Medicine: 117:1162-1172.**, 2000.
- Phillipson, J.D. New Drugs from Nature - It could be Yew. **Phytotherapy Research** 3:2-9,1999.
- Phillipson J.D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry** 56: 237-243, 2001.
- Porter, D.G. Ethical scores for animal experiments. **Nature** 356: 101-102, 1992.
- Ramamurthi, A.; Robson, S.C.; Lewis, R.S. Effects of Nitric Oxide (NO) and Soluble Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase (NTPDase) on Inhibition of Platelet Deposition In Vitro. **Thrombosis Research** 102: 331-341, 2001.

Rates, S.M.K.; Barros, H.M.T. Modelos animais para avaliação da dor: métodos para triagem de novos analgésicos. **Ver. Bras. Farm.** **75(2)**:31-34, 1994.

Rates S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon** **39**: 603-613, 2001.

Ribeiro, R.A.; Vale, M.L.; Thomazzi, S.M.; Paschoalato, A.B.P.; Poole, S.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Europ. J. Pharmacol.** **287**: 111-118, 2000.

Rocha e Siva, M.; Beraldo, W.T.; Rosenfeld, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor release from plasma globulin by snake venoms and trypsin. **Am J Physiol.** **156**:261-273, 1949.

Romay, C. Ledón, N., González, R. Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation. **Inflamm. Res.**, **47**: 334-338, 1998.

Saleh, T.S.F.; Vianna R.M.J.; Creczynski-Pasa, T.B.; Chakravarty, S.; Mavunkel, B. J.; Kyle, D. J.; Calixto, J.B. Oral anti-inflammatory action of NPC 18884, a novel bradykinin B<sub>2</sub> receptor antagonist. **European Journal of Pharmacology** **363**: 179-187, 1998.

Schaefer, U.; Schneider, A.; Rixen, D.; Neugebauer, E. Neutrophil adhesion to histamine stimulated cultured endothelial cells is primarily mediate via activation of phospholipase C and nitric oxide synthase isozymes. **Inflammation Res.**, **47**:256-264, 1998.

- Schianterelli, P.; Cadel. S.; Acerbi, D.; Pavesi, L. Antiinflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. **Arzneim - rsch / Drug res.**, **32 (3)**: 230-235, 1982.
- Segura, L., Vila, R., Gupta, M.P., Avella, M.E., Adzet, T., Cañigüeral, S. Antiinflammatory activity of *Anthurium cerrocampanense* Croat in rats and mice. **J. Ethnopharmacol.** **61**: 243-248, 1998.
- Sertié, J.A.A. Pharmacological Assay of *Cordia verbenacea*; Anti-inflammatory Activity and Toxicity of the Crude Extract of Leaves. **Planta Médica.** 7-11., 1988.
- Sertié, J.A.A.; Basile, A.C.; Panizza, S.; Matida, A.K.; Zelnik, R. Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. **Planta Med**, **(56)**:1, 36-40, 1990.
- Shilin Y, Roberts MF, Philipson JD (1989). Methoxylated flavones and coumarins from *Artemisia-annua*. **Phytochemistry** **28(5)**: 1509-1511.
- Siegmund, E.; Cadmus, R.; Lu, G. Method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. **Proc. Soc. Exper. Biol. Med.** **95**: 729, 1957.
- Siqueira, J.F.; Dantas, C.J.S. Mecanismos celulares e moleculares da inflamação. In: *Inflamação aguda: mediadores químicos*. Ed MEDSI Ltda., São Paulo: 83-105, 2000.
- Sjödahl, R. Extent, Mode and Dose Dependence of Anticancer Effects. **Am J Med**, **110 (1A)**: 66S-69S, 2001.
- Skehan, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, **82(13)**: 1107-1112, 1990.

- Sugita, N.; Kimura, A.; Matsuki, Y.; Yamamoto, T.; Yoshie, H.; Hara, K. Activation of transcription factors and IL-8 expression in neutrophils stimulated with lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. **Inflammation** **22(3)**:253-260, 1998.
- Szelényi, J. Cytocines and the central nervous system. **Brain Research Bulletin** **54 (4)**: 329-338, 2001.
- Taylor, J.L.S.; Staden, J.V. COX-1 inhibitory activity in extracts from *Eucomis Lherit.* Species. **Journal of Ethnopharmacology**, **75**: 257-265, 2001.
- Takedo, M.M. Cyclooxygenase-2 Inhibitors in Tumorigenesis. **Journal of the National Cancer Institute**, **90 (21)**:1609-1620, 1998..
- Tiemann, U.; Tomek, W.; Schneider, F.; Wollenhaupt, K.; Kanitz, W.; Becker, F.; Pöhland, R.; Alm, H. Platelet-activating factor (PAF)-like activity, localization of PAF receptor (PAF-R) and PAF-acetylhydrolase (PAF-AH) activity in bovine endometrium at different stages of the estrous cycle and early pregnancy. **Prostaglandins & other Lipid Mediators** **65**: 125-141, 2001.
- Tippmer, S.; Qwitterer, U.; Kolin, V.; Faussner, A.; Roscher, A.; Mosthaf, L.; Muller-Esterl, W.; Haring, H. Bradykinin induces translocation of the protein kinase C isoforms  $\alpha$  e  $\zeta$ . **Eur. J. Biochem.**, **225**: 297-304, 1994.
- Tozer, M.J.; Buck, I.M.; Cooke, T.; Kalindjian, B.; MacDonald, I.M.; Pether, M.J.; Steel, K.L.M. 4-Chlorobenzyl sulfonamide and sulfamide derivatives of histamine homologues: The design of potent histamine H<sub>3</sub> receptor antagonist. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.**, **9**: 3103-3108, 1999.

- Tubaro, A.; Dri, P.; Delbello, G.; Zilli, C.; Loggia, R. D. The Croton oil ear tes revisited. **Agents and Actions** 17:347-349,1985.
- Vane, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biol.** 5: 231-235, 1971.
- Vane, JR.; Botting, R.M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Inflamm. Res.**, 44:1-10,1995.
- Vanhoenacker, P.; Haegeman, G.; Leysen, J.E. 5-HT<sub>7</sub> receptors: current knowledge and future prospects. **TIPS.**, 21: 70-77, 2000.
- Vidal, A.; Ferrándiz, M.L.; Ubeda, A.; Guillén, I.; Riguera, R.; Quintela, J.M.; Peinador, C.; Moreira, M.J.; Alcaraz, M.J. Effects of some isoxazolpyrimidine derivates on nitric oxide and eicosanoid biosynthesis. **Pharmacology letters.**,66(9):125-131, 2000.
- Vinegar, R.; Truax, J.F.; Selph, J.L. Quantitative studies of the pathway to acute carrageenan inflammation. **Federation Proceedings.**, 35 (13): 2447-2454, 1976.
- Voog, U.; Alstergren, P.; Leibur, E.; Kallikorm, R.; koop, S. Immediate effects of the serotonin antagonist granisetron on temporomandibular joint pain in patients with systemic inflammatory disorders. **Life Science** 68: 591-602, 2000.
- Watkins, D.N.; Lenzo, J.C.; Segal, A.; Garlepp, M.J.; Thompson, P.J. Expression and localization of non-small cell lung cancer. **European Respiratory Journal**, 14: 412-418, 1999.
- Whelton, A. Renal Aspects of Treatment with Conventional Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Versus Cyclooxygenasw-2-Specific Inhibitors. **Am J Med** 110 (3A): 33S-42S, 2001.

- Winter, C.A.; Risley, EA.; Nuss, G.W. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**: 111: 544-547, 1962.
- Woods, K.W.; McCroskey, K.W.; Michaelides, M.R.; Wada, C.K.; Hulkower, K.I.; Bell, R.L. Thiazole Analogues of the NSAID Indomethacin as Selective COX-2 Inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 11: 1325-1328, 2001.
- Woolfe, G.; MacDonald, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 80: 300-307, 1944.
- Xiong, Q.; Tezuka, Y.; Kaneko, T.; Li, H.; Tran, L.Q.; Hase, K.; Namba, T.; Shigetoshi, K. Inhibition of nitric oxide by phenylethanoids in activated macrophages. **European Journal of Pharmacology** 400:137-144, 2000.
- Yedgar, S.; Lichtenberg, D.; Schnitzer, E. Inhibition of phospholipase A<sub>2</sub> as a therapeutic target. **Biochimica et Biophysica Acta** 1488 182-187, 2000.