

SABINO JULIO SOTELO CÓRDOVA

**ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DA *Chuquiraga*
Spinosa Subsp. *HUAMANPINTA* EM RATOS E
CAMUNDONGOS**

Campinas
1998

SABINO JULIO SOTELO CÓRDOVA

**ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DA *Chuquiraga*
Spinosa Subsp. *HUAMANPINTA* EM RATOS E
CAMUNDONGOS**

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

Orientação
Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho
CPQBA/UNICAMP

Campinas
1998

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA :	
V.	Ex.
TOMBO BC/	35118
PROC.	395/98
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	35/03/98
N.º CPD	

CM-00107386-7

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

So76a

Sotelo Córdova, Sabino Júlio

Atividade antiinflamatória da *Chuquiraga spinosa* Subsp.
HUAMANPINTA em ratos e camundongos / Sabino Júlio Sotelo
Córdova. Campinas, SP : [s.n.], 1998.

Orientador : João Ernesto de Carvalho

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Inflamação. 2. Compostos aromáticos. 3. Cromatografia
gasosa. I. João Ernesto de Carvalho. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Membros:

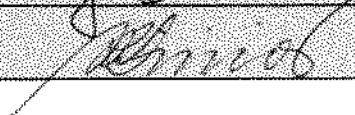
1. Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "J. Carvalho", is written over the first name.

2. Prof. Dr. José Artur da Silva Emim

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "J. Emim", is written over the second name.

3. Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "L. Simioni", is written over the third name.

Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 29/01/98

DEDICO ESTE TRABALHO COM AMOR A MINHA FAMÍLIA
ETERNA

A minha esposa Francis; pela sua colaboração,
sacrifício, paciência e apoio incondicional.

A meus filhos:

Alexander	Júlio
Susan	Carol
Katherine	Jannet
Cynthia	Juliana
Joseph	Isrrael
e	
Dyana	Carolina

Pelos seus intensos carinhos que compartilhamos
juntos no dia a dia nesta luta temporal.

E em memória de meus pais
César e Rosalía.

Ao professor Dr.
João Ernesto de Carvalho, pela sua orientação
decisiva por conseguir os objetivos traçados, e
pela sua compreensão e apoio em momentos difíceis
que passamos no desenvolvimento deste trabalho.
"Eternamente Grato"

Oh! Quão astuto é o plano
do maligno! Oh!
A vaidade e a fraqueza e a
insensatez dos homens!
Quando são instruídos pensam
que são sábios e não dão
ouvidos aos conselhos de Deus,
pondo-os de lado, supondo que
sabem por si mesmos; portanto
sua sabedoria é insensatez
e não lhes traz proveito.
E eles perecerão.
Mas é bom ser instruído,
quando se dá ouvidos
aos conselhos de Deus.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Estou convencido que a melhor maneira de agradecer, é resaltar aqui e agora a decisiva contribuição de cada pessoa, que colaborou de uma forma ou de outra para a realização deste trabalho, por isto agradeço a meus colaboradores da pesquisa :

À Dra. Elen Landucci, pela sua co-orientação e participação em vários ensaios experimentais.

Ao Dr. Edson Antunes, pela sua co-orientação e discussões nos diferentes modelos experimentais utilizados.

À Dra. Mary Ann Boglio, no isolamento do princípio ativo e trabalhos químicos feitos com nossa planta pesquisada.

Ao Dr. Angel Cabrera, pela identificação botânica de nossa planta pesquisada.

À Ing. Agrônoma Kátia Calago pela bibliografia e orientação na classificação botânica .

A meu colega do mestrado Rogério Castro, pela sua participação nos diferentes experimentos.

A minha colega do mestrado Patrícia Correia, pela sua amizade e dedicação nos trabalhos realizados juntos.

A todos eles eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS GERAIS

**A Alexander Júlio Jorge Sotelo Gordillo
pela tradução e realização escrita desta tese.**

**À professora Dra. Lea Rodrigues Simioni
e FAEP pelo apoio financeiro na realização da coleta da planta
no Perú.**

**A CAPES pela ajuda financeira que permitiu a realização do
presente trabalho.**

**A todos os colegas e amigos da pós - graduação de farmacologia da
UNICAMP. Pela amizade e colaboração .**

**Aos professores e funcionários do departamento de Farmacologia da
UNICAMP. Eterna gratidão**

**Aos professores, funcionários e amigos do CPQBA - UNICAMP pela suas
amizades e colaborações em todos os momentos que precisei de vocês,
obrigado**

**A Sandra da biblioteca da Faculdade de Medicina - UNICAMP pela
ajuda bibliográfica proporcionada.**

**À Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas
pela oportunidade de realizar esta pós - graduação**

LISTA DE ABREVIACÕES

AA.	<i>Ácido Araquidônico.</i>
AMPc	<i>Adenosina monofosfato cíclico.</i>
AINHS	<i>Antiinflamatórios não esteroides</i>
BK	<i>Bradicinina</i>
CCD	<i>Cromatografia de Camada Delgada</i>
COX-1	<i>Ciclooxigenase-1</i>
DAG	<i>Diacilglicerol</i>
EBH	<i>Extrato bruto hidroalcoólico</i>
GMPc	<i>Guanosina monofosfato cíclico</i>
GC/MS	<i>Cromatografia / gasosa com detetor de massas</i>
IL-1	<i>Interleucina-1</i>
IP₃	<i>Trifosfato de Inositol</i>
LTB₄	<i>Leucotrieno B₄</i>
L-NMMA	<i>LN^G Monometil - Arginina</i>
L-NOarg	<i>LN^G Nitro Argenina</i>
L-NAME	<i>LN^G Nitro ArgininaMetil Ester</i>
LISO-FAP	<i>Liso glicerofosfocolina</i>
MAIC-1	<i>Molécula de adesão intra celular-1</i>
MACV-1	<i>Molécula de adesão das células vasculares</i>
NO	<i>Óxido Nítrico</i>
NOS	<i>Óxido Nítrico sintase</i>
NOS_c	<i>Óxido Nítrico sintase constitutiva</i>
NOS_i	<i>Óxido Nítrico sintase induzível</i>
PLA₂	<i>Fosfolipase A₂</i>
PAF	<i>Fator ativador plaquetário</i>
PGI₂	<i>Prostaciclina</i>
PGE	<i>Prostaglandina E</i>
PMN	<i>Polimorfonuclear</i>
RF	<i>Fator de retenção</i>
RMN¹H	<i>Ressonância Magnética Nuclear de próton</i>
RMN¹³C	<i>Ressonância Magnética Nuclear deCarbono-treze</i>
Subsp	<i>Sub espécie</i>
TNF	<i>Fator de necrose tumoral</i>
Tr.	<i>Tempo de retenção</i>

Sumário

	Página
1. Resumo.	1
2. Introdução.	4
3. Objetivos.	19
4. Materiais e métodos.	21
5. Resultados	
5.1. Avaliação da atividade geral em camundongos.	33
5.2. Edema de pata	
5.2.1. Edema de pata induzido por carragenina.	33
5.2.2. Edema de pata induzido por composto 48/80 e bradicinina.	35
5.2.3. Edema de pata induzido pela PLA ₂	35
5.2.4. Edema de pata induzido pela carragenina em ratos adrenalectomizados.	37
5.3. Pleurisia induzida por carragenina em ratos.	39
5.4. Estudo comparativo do EBH e suas frações no edema de pata induzido pela carragenina.	40
5.5. Edema de Orelha em Camundongos.	41
5.6. Avaliação da Atividade ulcerogênica do EBH.	42
5.7. Análise fitoquímica	
5.7.1. Cromatografia em camada delgada.	42

5.7.2 Cromatografia gasosa acoplada ao detector de espectrometria de massas	43
5.7.3 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)	43
5.7.4 Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13 (RMN ¹³ C)	44
6. Discussão	46
7. Conclusões	57
8. Abstract	60
9. Referências bibliográficas	62

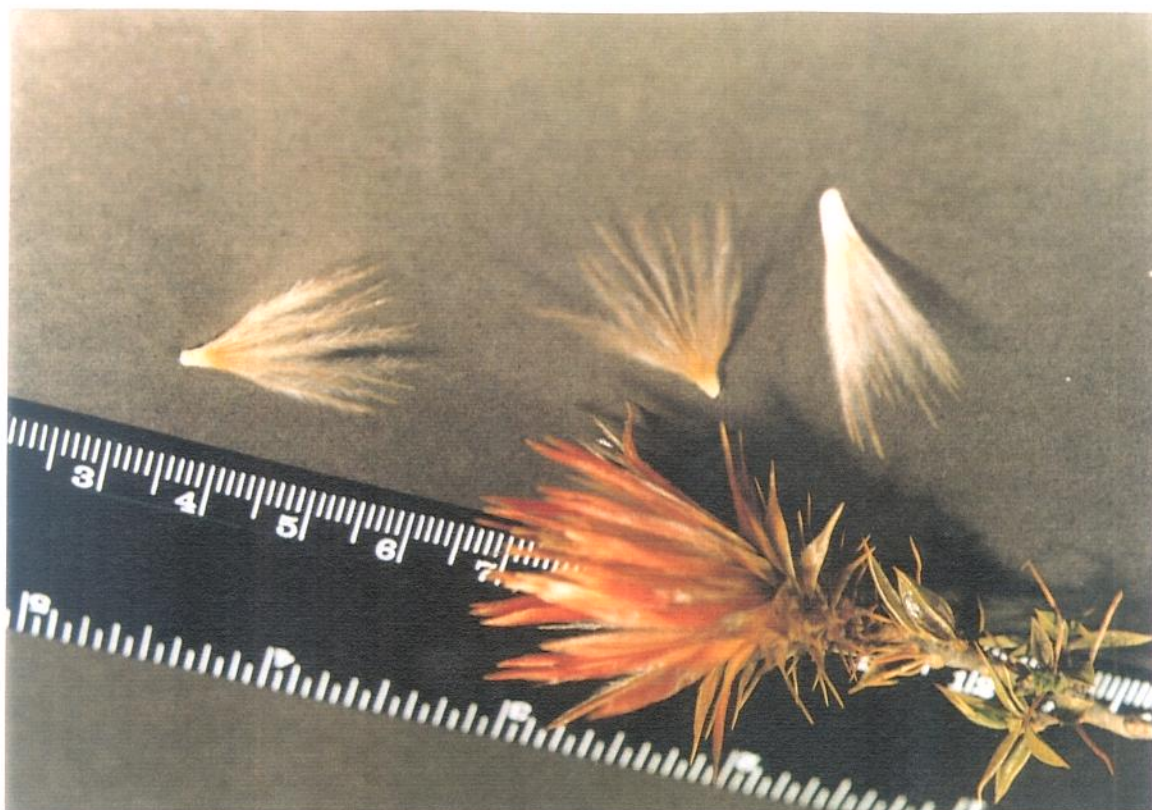


Fig. A₁ FLOR DA HUAMANPINTA EZCURRA sub-sp.nova DA ESPECIE CHUQUIRAGA SPINOSA LESSING, LINNAEA, gên. CHUQUIRAGA, tribo MUTISIEAE



Fig. A₂ : COLETA DA HUAMANPINTA EZCURRA NA CORDILHEIRA DOS ANDES DO PERU
PELO AUTOR, MAIO- 1996 .



¹ Fig. B (sup) "Huamanpinta Ezcurra em estado seco, (inf.) estado fresco"

1. RESUMO

A *Chuquiraga spinosa* Lessing subsp. *Huamanpinta* Ezcurrea, conhecida no Peru como “**Huamanpinta**” é utilizada na medicina popular como diurético, antiinflamatório e antirreumático.

Neste trabalho foi avaliada a atividade antiinflamatória do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) e suas frações (orgânica e aquosa) em modelos experimentais de inflamação aguda em ratos e camundongos.

O EBH da Huamanpinta (250, 500 e 1000 mg/kg, v.o.), quando administrado uma hora antes da indução de inflamação por carragenina (1 mg/pata), inibiu de modo dose dependente o edema de pata durante todo o tempo de avaliação experimental.

Nos modelos de edema de pata induzido pelo composto 48/80 (10 µg/pata) e bradicinina (50 µg/pata), o EBH da Huamanpinta (1000 mg/kg, v.o.), administrado 60 minutos antes da injeção dos agentes flogísticos, também reduziu o desenvolvimento do edema.

O estudo comparativo entre o EBH e suas frações em modelo de edema de pata induzido pela carragenina (1 mg/pata), demonstrou que as duas frações possuem atividade antiedematogênica. No entanto a fração orgânica foi mais ativa do que a fração aquosa.

Em ratos adrenalectomizados o EBH da huamanpinta (1000 mg/kg, v.o.) manteve a atividade antiedematogênica, no modelo do edema de pata induzido por carragenina (1 mg/pata) em ratos.

No teste da pleurisia induzido por carragenina (2.5 mg/pleura) os animais tratados com EBH de Huamanpinta (500, 1000 e 2000 mg/kg, v.o.) apresentaram de modo dose dependente redução do volume do exsudato pleural e da migração de leucócitos para a cavidade pleural.

No modelo de edema de orelha em camundongos induzido pelo óleo de cróton o tratamento prévio (60 min. antes da aplicação do agente flogístico) com EBH da Huamanpinta (1000 mg/kg, v.o.) reduziu significativamente a formação de edema. Mas o tratamento tópico com EBH não alterou o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton.

A administração do EBH (2000 mg/kg, s.c.) de peso produziu lesões da mucosa gástrica semelhantes às produzidas pela indometacina, sugerindo dessa forma mecanismo de ação antiinflamatória por inibição da síntese de prostaglandinas.

A análise química por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear de prótons e carbono 13, revelou como composto majoritário da fração orgânica a 4-hidroxi-acetofenona.

2. INTRODUÇÃO

2.1. Introdução geral

Desde os primórdios da nossa civilização as plantas medicinais têm sido fonte de drogas de grande utilidade na terapêutica. Atualmente, cerca de 20% dos medicamentos utilizados na medicina moderna são isolados de plantas ou sintetizados a partir de precursores de origem vegetal. Estima-se que o número de espécies vegetais encontradas no planeta é de 600 mil e no entanto, menos de 10% delas foram estudadas química e ou farmacologicamente (Who; 1985).

Por ter uma das floras mais ricas do mundo, a América Latina está em posição bastante privilegiada na pesquisa de plantas medicinais. Mas, apesar dessa riqueza, até agora muito pouco foi feito para aproveitar todo esse potencial.

Nos últimos anos, a busca sistemática de novos medicamentos tem sido realizada por inúmeras abordagens de estudo (De Melo Amoroso, 1995 ; Hamburger, 1991).

Na atualidade, com o desenvolvimento da ciência e o aumento do número e da complexidade dos instrumentos científicos, o trabalho em equipe começou a ser uma necessidade dos pesquisadores para a abordagem dos temas de pesquisa de modo interdisciplinar. Um conglomerado de profissionais de diversas áreas, que promovem a troca de experiências, críticas e opiniões são responsáveis pela determinação dos objetivos e critérios de investigação científica.

Muitas vezes a falta de integração entre os diversos profissionais envolvidos nessa pesquisa interdisciplinar fez com que muitos trabalhos com plantas medicinais fossem publicados sem a correta identificação taxonômica das espécies utilizadas. Isto ocorria, na maioria dos casos, única e exclusivamente pelo fato do pesquisador não reconhecer a importância da botânica. Dessa forma para a realização deste trabalho, foi obrigatória a participação de botânicos, especialmente os taxonomistas, para correta identificação taxonômica da espécie estudada, químicos para a extração, isolamento e identificação dos princípios ativos e farmacologistas, para a avaliação da atividade farmacológica e mecanismo de ação dos produtos obtidos pelos químicos.

2.2 Descrição botânica

Chuquiraga Spinosa subsp. HUAMANPINTA nov. subsp.

A planta é um intrincado - ramoso , espinhoso, de 30 a 120 cm de altura, de córtex escuro; as folhas são subsésseis, opostas e decussadas, excepcionalmente sub alternas, oblongo - ovaladas a lanceoladas, fortemente coriáceas, levemente seríceas em sua juventude, totalmente glabras e lustrosas na maturidade, de 10 a 15 mm de comprimento por 3 a 6 mm de largura, atenuadas na base, agudas e espinhosas no ápice, engrossadas na margem, trinervadas, com a nervura mediana proeminente na epiderme inferior, as nervuras laterais, menos visíveis.

Espinhos axilares geminados, subhorizontais, divergentes, de 5 a 20 mm de comprimento,

O involúcro é cilíndrico - turbinado, de 35 a 50 mm de comprimento e 10 a 20 mm de diâmetro. Filarias em 6 a 8 séries, de coloração laranja. Os exteriores lanceoladas até 3,5 mm de largura. Os interiores lanceolados, de até 3 mm lateral, eretos e rígidos, escariosos e mais ou menos seríceo-pubescentes no dorso.

As flores são em número de 9 a 15, com corola de 19 a 23 mm de comprimento, exteriormente pubescente na base, interiormente serícea, por embaixo dos segmentos, isomorfas e hermafroditas.

As anteras apresentam de 17 a 19 mm de comprimento e os aquênios, 4 mm de comprimento, com *papus* aproximadamente na mesma altura da corola. A forma é turbinada, e a superfície está densamente coberta de pelos ascendentes, uniseriados, compostas por três células. O pé formado por uma célula epidérmica pouco diferenciada. O corpo formado por uma célula basal curta e uma apical muito comprida, não encontram-se pêlos gêmeos.

A corola é sempre cilíndrica e pentapartida no ápice, com segmento interno separado dos demais, por incisões mais profundas, e outros quatro estão unidos até uma maior altura. o androceu é formado por cinco estames sempre inseridos no extremo basal da corola (Ezcurra, 1985).

2.3. Aspectos fisiopatológicos da inflamação

A inflamação (do latim *inflamare* e do grego *phogos*, que significa “pegar fogo”), é uma reação complexa do tecido conjuntivo vascularizado a estímulos exógenos e endógenos que são capazes de gerar agressão celular. A resposta geralmente é acompanhada de sinais e sintomas clínicos como calor, rubor, edema e dor. O calor e o rubor estão relacionados com o aumento do fluxo sanguíneo local. O edema com o aumento da permeabilidade vascular e ou infiltração celular e a dor, induzida pela liberação de diversos mediadores químicos algésicos e hiperalgésicos no local da inflamação. Como resultado deste processo, muitas vezes pode ser observada a perda da função do tecido ou do órgão afetado (Lima Pereira, 1994.; Male , 1997).

O agente inflamatório atuando sobre os tecidos induz a liberação de mediadores químicos que, após interação com receptores existentes nas células da microcirculação e nos leucócitos, produzem alterações hemodinâmicas e exsudação de plasma e células sanguíneas para o interstício. A atividade do agente inflamatório e ou das células do exsudato, pode produzir lesões nos tecidos, inclusive levando a necrose. Cessada a ação do agente inflamatório, reduz-se a liberação dos mediadores, a microcirculação recupera o estado hemodinâmico original e o líquido e as células exsudadas voltam à circulação sanguínea geralmente pelos vasos linfáticos. Se há necrose, o tecido destruído é fagocitado e logo depois surgem os fenômenos de cicatrização ou regeneração. (Lima, 1994).

Na inflamação aguda, produz-se vários eventos induzidos pelos mediadores químicos, como resposta imediata a um agente agressor. As alterações no calibre vascular, conduzem a um aumento de fluxo sanguíneo na região agredida. Resultando em vasodilatação arteriolar e na abertura de leitos capilares, mediados entre outros pelas prostaglandinas (Coleman et al., 1994) e óxido nítrico (Moncada, 1991).

Alterações estruturais na microcirculação, conduzem ao acúmulo de um líquido extravascular rico em proteínas, que constitui o exsudato ou edema e que é resultado do

aumento da permeabilidade vascular, produzidos por vários mecanismos conhecidos, como a contração da célula endotelial, que leva à formação de junções intercelulares alongadas das vênulas, desencadeado pela histamina, bradicinina, leucotrienos e fator de agregação plaquetária (FAP) (Brett et al., 1989).- Os leucócitos ativados aderem ao endotélio e podem liberar substâncias tóxicas de oxigênio e enzimas proteolíticas, que levam à agressão desse endotélio, resultando num aumento da permeabilidade. - O aumento da transcitose através de vesículas e de vacúolos, que cruzam o citoplasma aumentam a permeabilidade (Fearon, 1997). A perda de continuidade endotelial é consequência da retração endotelial por reorganização estrutural do citoesqueleto, induzidos por: IL-1, FNT, e gama-interferon (Brett et al., 1989).

Além dos mediadores químicos diversos tipos celulares participam do processo inflamatório. Os leucócitos em resposta à inflamação são levados pela circulação à região agredida, destroem aos agentes injuriantes, degradam o tecido necrótico e os antígenos estranhos; e podem prolongar a inflamação induzindo lesão tecidual ao liberar enzimas, mediadores químicos e radicais tóxicos do oxigênio (Male, 1997). Os mastócitos, são as principais células teciduais envolvidas na inflamação aguda e se concentra no tecido conjuntivo, ao longo dos vasos sanguíneos, especialmente da derme. No seu interior os mastócitos armazenam em granulações citoplasmáticas a histamina (serotonina nos roedores), que é liberada entre outros, por venenos e imunoglobulinas (IgE) (Fearon, 1997).

O extravasamento dos leucócitos tem as seguintes etapas sequenciais:

- *Marginação Leucocitária local*, ao longo do endotélio da microcirculação, os leucócitos saem da coluna central e assumem uma posição periférica, passando a margear a superfície endotelial. Este processo é causado por alterações hemodinâmicas geradas pela lenta circulação sanguínea.

- *Aderência dos leucócitos ao endotélio*, é em grande parte, determinada pela função das diferentes moléculas de adesão celular como selectinas, molécula de adesão intracelular-1 endotelial (MAIC - 1), integrinas leucocitárias e molécula de adesão

das células vasculares-1 (MACV-1). A selectina E, expressa pelas células endoteliais, interage com a glicoproteína X sinalizada de Lewis e outras lipoproteínas existentes na superfície dos leucócitos. A selectina P, é expressa pelas plaquetas e células endoteliais sendo estimulada pelas citocinas. Já a selectina L, é expressa pelos leucócitos. Já a molécula de adesão intracelular -1 endotelial (MAIC-1), interage com as integrinas leucocitárias (Cotran, 1993). Os mediadores químicos que modulam estes fenômenos de adesão são: histamina, FAP, IL-1 e TNF (Ohno , 1997).

- *A Transmigração Leucocitária (diapedese)*, é determinada pela interação entre moléculas de adesão dos leucócitos e as superfícies endoteliais, também controlada por mediadores químicos (Ohno, 1997). O leucócito insere pseudópodos entre as células endoteliais, se posiciona através das junções endoteliais entre as células endoteliais e a membrana basal. Mediante a secreção de collagenases, que degradam a membrana basal, escapa para o espaço extravascular. Os neutrófilos, monócitos, linfócitos, eosinófilos e basófilos usam este mesmo trajeto (Muler et al, 1993).

- *Quimiotaxia*: Locomoção orientada através de um gradiente químico. Atuam como químio-atratores tanto substâncias exógenas (ex: produtos bacterianos), quanto endógenas (ex: C5a, LTB₄ , IL-8) (Male, 1997). A ligação de agentes quimiotáticos a receptores específicos nas membranas celulares leucocitárias resultam na ativação da fosfolipase C (mediada por proteína G) que conduz à hidrólise do fosfatidilinositol - 4 , 5 - bifosfato (PIP₂) até IP₃ e DAG e à liberação de cálcio, desencadeando a agregação de elementos contrateis responsáveis pelo movimento celular. O leucócito desloca-se através da projeção de um pseudópodo, que empurra o restante da célula na direção da projeção. O interior do pseudópodo consiste em uma rede ramificante de filamentos compostos de actina e miosina (Male, 1997).

- *Fagocitose*, e liberação de enzimas por macrófagos e neutrófilos em três etapas inter-relacionados: reconhecimento e acoplamento da partícula, seu englobamento, e destruição da partícula ingerida (Lydyard, 1997).

Liberação de produtos celulares e mediadores químicos responsáveis pelos eventos da inflamação

Histamina:

A histamina (β - aminoetilimidazol), sintetizada a partir da histidina pela L-histidina descarboxilase, é armazenada nos mastócitos, basófilos e plaquetas.. A histamina é liberada por traumatismos; reações imunes mediadas pela IgE., C3a - C5a, proteína liberadora de histamina derivado de leucócitos, neuropeptídeos, IL-1 e IL-8.

No processo inflamatório, a histamina, assim que liberada, produz vasodilatação, aumento de permeabilidade vascular, dor e prurido (Schwartz, 1994). A vasodilatação envolve a ativação dos receptores H_1 e H_2 os quais distribuídos pelos vasos de resistência na maior parte dos leitos vasculares. Os receptores H_2 estão localizados nas células da musculatura lisa vascular, e os efeitos vasodilatadores produzidos pela sua estimulação são mediados pelo AMP cíclico (Eckly , 1997). Os receptores H_1 se situam nas células endoteliais e sua estimulação leva à formação de substâncias vasodilatadoras. A participação da histamina no relaxamento vascular (vasodilatação) é parcialmente mediada via receptor H_1 , complementado pela produção de óxido nítrico e a participação de receptor H_2 associado às células musculares-lisas (Jansen-Olesen, 1997).

O aumento da permeabilidade vascular, principalmente das vênulas pós-capilares, é produzido pela contração das células endoteliais expondo, dessa forma, a membrana basal que é livremente permeável às proteínas plasmáticas e líquido plasmático (Caboury et al., 1995).

A dor e, principalmente o prurido produzidos pela histamina são consequência da estimulação de diversas terminações nervosas. Na periferia os receptores neuronais da histamina são geralmente do tipo H_1 (Jansen-Olesen, 1997).

Sistema calicreína - cinogênio - cinina:

As cininas, são ativadas por fator de Hageman e são liberadas por lesão tissular, venenos, reações alérgicas e infecções virais. As principais cininas são a bradicinina e a calidina, a calidina pode converter-se em bradicinina pela aminopeptidase plasmática. Essas cininas ligam-se seletivamente ao receptor B_2 , encontrado na maioria dos tecidos. O B_2 é acoplado às proteínas G e ativa a fosfolipase A_2 e a fosfolipase C. A ativação da fosfolipase C induzida pela cinina leva ao aumento do IP_3 (e, portanto, do cálcio citosólico) e do diacilglicerol (e portanto, da atividade da proteína C cinase). Foi demonstrado que a bradicinina ativa as isoformas de proteínas C cinase dependentes de cálcio, independentes de cálcio e as isoformas atípicas (Tippmer et al., 1994). A estimulação da PLA_2 libera o ácido araquidônico dos fosfolipídeos ligados à membrana e o ácido araquidônico é metabolizado em mediadores da inflamação (Willian, 1996).

O terminal carboxil dos metabólitos da bradicinina e da calidina ligam-se seletivamente aos receptores B_1 , encontrados na musculatura lisa vascular e são regulados crescentemente pela inflamação (Willian, 1996).

Nas vênulas as cininas aumentam a permeabilidade vascular (Lima, 1994) através da separação das junções entre as células endoteliais provocando edema. Os receptores B_1 nas células inflamatórias como os macrófagos podem desencadear a produção de IL-1 e FNT- α (Willian, 1996).

As cininas, além de potentes vasodilatadores, estimulam a liberação de histamina e outras substâncias vasoativas dos mastócitos. A vasodilatação induzida pelas cininas

provoca queda das pressões sistólica e diastólica e é mediada pelo óxido nítrico produzido pelas células endoteliais (Willian, 1996).

Sistema de complemento:

A fração C3a do complemento, quando liberada aumenta a permeabilidade vascular por liberar histamina dos mastócitos e plaquetas e por isso é conhecidos como anafilotoxinas (Lima, 1994). A fração C5a aumenta a permeabilidade vascular e ativa a via lipoxigenase do metabolismo do ácido araquidônico em neutrófilos e monócitos. É um poderoso agente quimiotático para neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos colaborando também com a adesão leucocitária ao endotélio (Foreman, 1996).

Eicoisanóides:

O ácido araquidônico liberado principalmente pela PLA_2 , dá origem a diversos eicosanóides que desempenham papéis fundamentais no processo inflamatório. As prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos são produzidos por células endoteliais (Hyshlop, 1993), leucócitos, plaquetas e mastócitos. A diminuição dos efeitos produzidos pelos eicosanóides, está relacionada à inibição da liberação de ácido araquidônico (Muller, 1997).

As prostaglandinas E_2 aumentam acentuadamente a formação de edema e infiltração leucocitária e potencializam a atividade algésica da bradicinina e outros autacóides. Nas plaquetas, a transformação do ácido araquidônico em tromboxano A_2 desencadeia a agregação plaquetária. Já a prostaciclina (PGI_2) produzida na parede vascular pode ser antagonista fisiológico deste sistema pois, inibe a agregação plaquetária e contribui para as propriedades não trombogênicas do endotélio. A PGE_2 e PGI_2 sensibilizam as terminações nervosas aferentes, reduzindo o limiar dos nociceptores. A

PGE₂ estimula a produção de esteróides pelas supra-renais, liberando corticóides que participam do controle do processo inflamatório.(Campbell, 1996).

Existe uma via não enzimática de conversão do ácido araquidônico, que dá origem a uma nova série de agentes denominados isoprostanos (Morrow et al., 1990). Os isoprostanos, com estrutura semelhante as prostaglandinas, originam-se in vivo a partir da peroxidação do ácido araquidônico catalisada por radicais livres independentes da ciclooxigenase. Os isoprostanos identificados até o momento são formados completamente “in situ” a partir dos fosfolipídeos e depois liberados em estados pré-formados. Portanto, sua produção não é bloqueada por qualquer agente antiinflamatório que suprima o metabolismo do ácido araquidônico livre, como os agentes não esteróides, ou pelos medicamentos antiinflamatórios não esteroidais que suprimem a expressão da enzima induzível Cox-2. Alguns pesquisadores acreditam que esses agentes poderiam contribuir para a fisiopatologia das respostas inflamatórias insensíveis aos medicamentos esteroidais e não esteroidais disponíveis hoje em dia. O importante é que essa via de formação dos eicosanóides está relacionada à lesão tecidual mediada pelos radicais livres, com produção de autacóides bioativos derivados dos lipídios (Campbell, 1996).

As lipoxigenases são enzimas citosólicas que catalisam a oxigenação dos ácidos graxos (ácido araquidônico) em hidroperóxidos lipídicos. O ácido araquidônico é metabolizado em metabólitos instáveis denominados ácidos hidroxiperoxieicosatetraenóicos (HPETE). Os tecidos variam quanto à lipoxigenase que contém pois, as plaquetas tem apenas 12-lipoxigenase e sintetizam 12-HPETE. Já os leucócitos contém 5-lipoxigenase e 12-lipoxigenase e produzem 5-HPETE e 12-HPETE . Os HPETE são intermediários instáveis análogos à PGG ou PGH e são metabolizados por várias enzimas. A 5-Lipoxigenase produz a síntese dos LT. Os leucotrienos são poderosos quimiotáticos, aumentam a permeabilidade vascular, produzem vasodilatação e contração da musculatura lisa intestinal e bronquial (Lima, 1994).

Citocinas:

As citocinas são também importantes na sinalização entre as células, à medida em que a reação inflamatória se desenvolve. Nas etapas iniciais, citocinas como IL-1 e IL-6 podem ser liberadas das células dos tecidos em que está ocorrendo a reação inflamatória. Os linfócitos e células mononucleares que chegam ao sítio da inflamação podem liberar suas próprias citocinas (IL-1, TNF, IL-4, IFN γ), que aumentam ainda mais a migração celular (Male, 1997).

A IL-8 produzida principalmente por macrófagos e células endoteliais, está envolvida na inflamação e quimiotaxia para neutrófilos. (Beverley, 1997). A IL-1 estimula as células T e B e induz respostas inflamatórias, por ex. : produção de prostaglandina e enzimas de degradação, como as collagenases. Acredita-se que isto seja de fundamental importância na destruição de cartilagem e ossos. A IL-1 migra para o cérebro onde induz a hipertermia (Dworski, 1997).

Fator de agregação plaquetária (FAP):

O FAP é um potente vasodilatador cuja atividade não depende de efeitos sobre a inervação simpática e metabolismo do ácido araquidônico. Aumenta a permeabilidade vascular por contração das células endoteliais venulares de forma semelhante à histamina e bradicinina, mais mil vezes maior. O FAP é um estimulador potente da agregação plaquetária, liberador do tromboxano A₂ e do conteúdo granular plaquetário. Estimula os PMN a se agregarem, liberarem leucotrienos, enzimas lisossômicas e a produzirem super óxidos (Beverley, 1997).

Endotélio e óxido nítrico:

As células endoteliais constituem um revestimento multifuncional em todo o sistema circulatório e estão separados entre si por junções intercelulares de dois tipos básicos: junções ocludentes (tight) e junções comunicantes (gap). Em resposta a determinados estímulos inflamatórios, o endotélio vascular da área lesada torna-se menos

restritivo que o normal à passagem de constituintes do plasma para o tecido, tornando-se visíveis os “gaps” intercelulares nas vênulas pós-capilares (Beverley 1997). As células endoteliais sintetizam heparina, IL-1, fator ativador do plasminogênio tecidual, endotelina, prostaciclina, FAP, NO e fatores angiogênicos (Lima, 1994).

O óxido nítrico (NO), é sintetizado a partir da L-arginina, catalizada pela enzima óxido-nítrico sintase(NOS). Essa reação é estereoespecífica pois a D-arginina não é substrato da NOS. A estimulação das células endoteliais com o ionóforo de cálcio A23187 libera NO, que é originado a partir de L-arginina, mas não D-arginina. Esta liberação é potencializada pela administração de L-arginina e L-citrulina, (Palmer et al., 1988).

Existem duas isoformas de NO sintase (NOS) : uma é constitutiva (NOSc), citosólica, dependente de cálcio (Whorton , 1997) e de calmodulina. A outra isoforma é induzível (NOSi), independente de cálcio, é estimulada imunologicamente liberando NO por longos períodos, e ativada por certas citocinas como IL-1 (Kuo, 1997), e endotoxinas. A ativação desta isoforma se dá através de transcrição genética, controlada pelos glicocorticóides.

Um terceiro tipo de NOS tem sido descrito e é dependente de cálcio mas não de calmodulina presente em neutrófilos (Hiki et al., 1991).

O NO atua no processo inflamatório modulando as seguintes reações:

Vasodilatação: o NO é liberado pelas células endoteliais e atinge a musculatura lisa vascular por difusão ou através dos canais comunicantes entre as células endoteliais, ativa a guanilil ciclase solúvel provocando acúmulo de GMPc (Guanosina 3,5-monofosfato cíclico). A estimulação da proteína cinase dependente de GMPc provoca diminuição de cálcio intracelular e com isso o relaxamento vascular. Acredita-se que a histamina, bradicinina (William, 1996) e polications (Antunes et al., 1990), induzem a liberação de NO, que estimula a síntese de prostaglandinas (Uno, 1997)

Modulador da permeabilidade vascular, recentemente tem sido sugerido que o NO modula a permeabilidade vascular em bochecha de hamster em resposta a adenosina - 5 - difosfato e bradicinina (Mayhan , 1992).

Migração celular: Os PMN e mono nucleares produzem NO e o próprio NO inibe a ativação de leucócitos in vivo e in vitro, podendo estar envolvido no fenômeno de adesão (Moncada , 1992) .

Células residentes: O NO é produzido por macrófagos , quando ativados, libera mediadores químicos pré-formados. O NO tem importante papel no controle da reatividade destas células, através da estimulação da guanilil ciclase solúvel que modula a liberação de histamina por estas células (Salvemine, 1991).

O NO é produzido por macrófagos, a partir da L-arginina. Alguns análogos da L-arginina agem como falso substrato para a enzima, bloqueando a formação de NO de modo reversível quando se acrescenta L-arginina (mas não D-arginina) alguns desses análogos descritos como inibidores da síntese de NO são : o LN^G Monometil-arginina (L-NMMA), que normaliza a hipotensão durante a endotoxemia ovina (Waurick René, 1997) e que inibe a liberação de NO em macrófagos, em fibroblastos de pulmão de rato (Ishii et al., 1990), e em mastócito (Salvemine, 1991). Esta inibição é revertida pela L-arginina.

O NO está envolvido na formação do edema induzido por vários mediadores como a substância P , bradicinina, histamina, carragenina e dextrana (Ialenti et al., 1992). O L-NMMA e o L-NAME, inibiam o edema em pele de ratos induzido pela substância P. Esta inibição foi revertida pelo precursor do NO, a L-arginina, e , portanto, o NO tem um papel no edema causado por outros mediadores. A co-administração de inibidores da síntese de NO inibe o edema e o acumulação de leucócitos em resposta a injeções de histamina e de bradicinina em pele de cobaias (Texeira et al., 1993). O L-NAME

inibiu o edema de pata e a pleurisia em ratos induzidos pela carragenina (Medeiros, 1995).

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- Avaliar a atividade antiinflamatória de extrato bruto hidroalcoólico e frações semipurificadas - isoladas da *Chuquiraga spinosa*
- Identificar os princípios ativos majoritários responsáveis pela atividade farmacológica da planta
- Estudar o provável mecanismo envolvido na ação antiinflamatória

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção do material vegetal

A espécie vegetal *Chuquiraga spinosa* Lessing, subespécie *Huamanpinta escurra* (Asteraceae), foi coletada em junho de 1993 e maio de 1996, no ecossistema Altiplano Andino Peruano (Cordilheira Ocidental dos Andes). Em junho de 1993 foi utilizado método de prensagem do material entre folhas de papel e em maio de 1996, foi utilizado um segundo método, onde o material coletado foi armazenado em sacos de ráfia e transportado até o CPQBA/UNICAMP. As amostras coletadas, (ramos, caule, folhas e flores) foram secas à sombra e posteriormente separadas em suas respectivas partes. A seguir, estas partes foram trituradas em moedores de martelos.

4.2. Identificação Botânica

A exsicata obtida durante a coleta foi enviada ao Instituto de Botânica DARWINION, C. C. 22-1642, San Isidro-Argentina para sua identificação botânica, pelo Dr. Angel L. Cabrera. A classificação obtida foi: família Asteraceae, tribo Muticeae, gênero *Chuquiraga*, espécie *Chuquiraga Spinosa* Lessing, subespécie *Huamanpinta* Ezcurra.

4.3. Obtenção dos extratos brutos

Para obtenção do extrato bruto hidroalcoólico, 50 g. do pó da *Huamanpinta* foram agitadas em 500 ml. de álcool etílico a 70 % durante 12 h. Após decantação, os 500 ml de solvente foram renovados e seguiu-se mais um período de 12 h de extração por agitação. Esse procedimento foi repetido mais uma vez, sendo que no final das 36 h. de extração contávamos com um volume de 1,5 L. Após filtração, todo volume extraído foi concentrado sob vácuo e baixa temperatura até a remoção completa do solvente.

4.4. Purificação parcial do extrato bruto hidroalcoólico

O EBH (7 g) foi ressuspensos em uma mistura de 11,3 ml de etanol e 113 ml de água. A seguir foram adicionados 1,3 g de acetato de chumbo. Após agitação e repouso de meia hora todo material foi filtrado em celite (10 g). O extrato resultante da filtração foi extraído por três vezes com diclorometano (100 ml). A fração orgânica resultante foi, então, analisada por cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS), ressonância magnética nuclear de prótons (RMN¹H) e ressonância magnética de carbono 13 (RMN¹³C), pela Dra. Mary Ann Foglio da Área de Fitoquímica do CPQBA-Unicamp.

4.4.1. Drogas e Reagentes

Indometacina (indocid - MSD), kappa - carragenina (Cialgas), Dextrana (Sigma Chem. Co.), Heparina (Roche), Dexametasona (Decadron, Prodome), Cloreto de Sódio (Merk), Éter Sulfúrico (Technion) e Óleo de Cróton (Boticário ao Veado d'Ouro).

4.5. Avaliação farmacológica

4.5.1. Animais

Para a realização dos experimentos, foram utilizados ratos *Wistar* machos e camundongos *Swiss* machos, com peso corporal entre 100 e 250 g e 25 a 30 g, respectivamente. Estas espécies foram fornecidas pelo Centro de Bioterismo (CEMIB) da UNICAMP. Os animais foram utilizados nos experimentos, após período mínimo de sete dias de adaptação em biotério, com ciclo de claro-escuro de 12 horas e temperatura ambiente de 20°C.

4.5.2. Avaliação da atividade geral

Cinco camundongos albinos adultos, pesando de 25 a 40 gramas, foram injetados com o extrato bruto hidroalcoólico da Huamanpinta nas doses de 500 e 1000 mg/kg, por via oral. Para a administração, este extrato bruto foi diluído em solução salina, contendo Tween 80 a 0,5% e um animal em cada grupo, foi injetado com este veículo somente, para servir de controle. Os efeitos gerais foram observados mantendo-se os animais em deambulação livre em superfície plana.

4.5.3. Edema de pata induzido por carragenina

A atividade antiinflamatória no modelo de edema de pata foi avaliada através do método descrito por Winter et al., 1962. Neste ensaio, foram utilizados 5 ratos machos *Wistar* (100 - 150 g, em jejum de 12 h) por grupo. Os animais foram tratados pela via oral, com o veículo (solução fisiológica, 1ml) grupo controle, com o extrato bruto hidroalcoólico (EBH) da *Huamanpinta* (250; 500; 1000 e 2000 mg/kg) e com indometacina (10 mg/kg), utilizada como controle positivo. Após 60 minutos, os animais foram anestesiados superficialmente com éter etílico e submetidos a uma injeção sub-plantar de 0,1 ml de carragenina 1% como agente edematogênico (dissolvido em solução fisiológica) na pata traseira esquerda. O volume da pata do rato foi medido imediatamente antes e após a injeção do agente edematogênico e em intervalos pré-estabelecidos, utilizando um hidropletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália) submergindo as patas esquerdas posteriores dos animais, até o maléolo lateral, em um recipiente contendo uma solução de extrato neutro 2,5 % em salina 0.9%, conectado por um sistema de vasos comunicantes a um outro menor, contendo um transdutor de volume ligado a um multímetro digital. As variações de volumes mediante a imersão das patas no recipiente maior foram numericamente registrados no multímetro digital nos tempos zero (imediatamente após as injeções de carragenina) 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos após a injeção do agente flogístico.

As respostas inflamatórias foram expressas como aumento do 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.

4.5.4. Edema de pata induzido por bradicinina

Ratos machos *Wistar* (120 - 150 g), mantidos em período de jejum de 12 horas, foram tratados, por via oral, com solução salina 0,9% (10 ml/kg), como controle negativo

receberam uma injeção subplantar de 50 ug de bradicinina (dissolvida em solução fisiológica) na pata traseira esquerda. O volume da pata do rato foi medido imediatamente antes e após a injeção do agente edematogênico, em intervalos pré-estabelecidos: 0; 15; 30; 60; 90 e 120 minutos, utilizando um hidropletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália).

As respostas inflamatórias foram expressas como aumento de volume da pata (ml), calculado por subtração do volume basal. Os resultados foram apresentados como médias $\pm$ erro padrão das médias.

4.5.5. Edema de pata induzido pelo composto 48/80

Grupos de 5 ratos machos *Wistar* com peso de 135 - 150 g., mantidos em 12 horas de jejum, foram tratados, por via oral, com solução salina 0,9% (10 ml/kg) e com o EBH da Huamanpinta na dose de 1000 mg/kg. Após de 60 minutos, os animais foram anestesiados superficialmente com éter etílico e submetidos a uma injeção subplantar de 10 ug de composto 48/80, dissolvido em solução fisiológica . O volume da pata do rato 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).

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

4.5.6. Edema de pata induzido por PLA₂ purificada do veneno de *Naja naja*.

Para este ensaio foram utilizados 5 ratos machos wistar de 130 a 160 g por grupo experimental os animais foram administrados pela via oral, com o veículo água destilada, os extratos brutos hidroalcoólico das amostras de Huamanpinta (1000 mg/kg). Após 60

minutos dos tratamentos os animais foram injetados na região subplantar das patas traseiras esquerdas com 0.10 ml/pata de PLA₂. A formação do edema foi avaliada por pletismografia (Plethysmometer 7150, Ugo Basile, biological Reseach Appatarus), medindo o volume de pata imediatamente antes e após a injeção do agente edematogênico, em intervalos pré-estabelecidos: 15; 30; 60; 90 e 120 minutos.

As respostas inflamatórias foram expressas como aumento do volume da pata (ml), calculado por subtração do volume basal. Os resultados foram apresentados como a média da diferença de volume das patas injetadas com PLA₂ entre os grupos da amostra e controle $\pm$ erro padrão das médias.

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

Ratos machos Wistar (150-200 g) foram anestesiados com éter. Os animais foram tricotomizados na parte dorsal e uma pequena incisão (1 cm) foi realizada nessa região, para a retirada das glândulas adrenais. Em seguida, os animais foram suturados e, durante uma semana após a cirurgia, permaneceram ingerindo salina em substituição à água de torneira.

Animais controle (falso operados) sofreram os mesmos procedimentos cirúrgicos, exceto a retirada das glândulas adrenais (Sham). Após a cirurgia, estes animais receberam água de torneira em substituição à salina dos animais ADX.

No edema de pata induzido por carragenina em ratos adrenalectomizados, os animais foram administrados pela via oral, com o veículo (solução fisiológica, 1 ml) grupo controle, com o EBH da Huamanpinta (1000 mg/kg) e com indometacina (10 mg/kg) utilizada como control positivo. Após de 60 min., os animais foram submetidos a uma injeção subplantar de 0.1 ml de carragenina 1% (dissolvido em solução fisiológica) na pata traseira esquerda. O volume da pata do rato foi medido imediatamente antes e após à injeção do agente edematogênico, em intervalos pré-estabelecidos, utilizando um hidropletismômetro (modelo 7550, Ugo Basile, Itália).

4.5.8. Pleurisia induzida pela carragenina

Indução da pleurisia

Para este ensaio foram utilizados grupos experimentais de 5 ratos machos Wistar (150-200 g), tratados com EBH Huamanpinta (250, 500, 1000 mg/kg, v.o.). O grupo controle positivo foi tratado com indometacina (10 mg/kg, v.o.), o grupo controle negativo recebeu água destilada (0.8 ml v.o.). Após uma hora dos tratamentos, os animais previamente anestesiados, a pleurisia foi induzida através de injeção intrapleural (direita) com 0.25 ml de carragenina (1%) (Vinegar et al., 1973).

Foi utilizada agulha número 10x5 adaptada, medindo aproximadamente 3 mm de comprimento, sendo esta introduzida do lado direito da caixa torácica de ratos anestesiados levemente. O grupo controle recebeu injeção igual volume de salina estéril.

Medida do Volume

Após três horas, os animais foram anestesiados com éter e exsanguinados por secção dos vasos cervicais, com o cuidado de não lesar a traquéia para que não ocorresse refluxo de sangue para dentro da cavidade.

Expôs-se a caixa torácica e 5,0 ml de solução salina contendo PBS (pH 7,4) e heparina (10 UI/ml) foram injetados na cavidade, que foi aberta em seguida por uma pequena incisão lateral (terceiro espaço intercostal).

O lavado pleural (PBS + exsudato) foi então coletado e medido seu volume com auxílio de pipeta automática.

Contagem total de leucócitos:

Para a contagem de leucócitos totais, 10 µl do lavado pleural foram diluídos na proporção de 1:20 em PBS corado com cristal violeta, tendo as hemácias sido hemolisadas pela adição de ZAP-OGLOBIN. A contagem do número de leucócitos totais migrados foi realizada em câmara de Neubauer, com utilização de microscópio óptico (aumento 10x). Os resultados foram expressos como médias dos volumes dos exsudatos pleurais (ml) e do número de leucócitos totais (número de leucócitos por número de campos lidos) de cada grupo experimental (Emim e col, 1994).

4.5.9. Edema de orelha de camundongos induzido por aplicação tópica de óleo de cróton

Para este ensaio foram utilizados 6 camundongos por grupo experimental. Após tratamento prévio (60 minutos) dos animais pela via oral, com EBH da Huamanpinta (1000 g/kg), utilizando como veículo a solução fisiológica; ou dexametasona (1 mg/kg), os animais receberam 10 ul de uma solução recém preparada de óleo de cróton (2,5 %, v/v em acetona) sobre a superfície interna da orelha direita. Alternativamente, 10 ul do EBH da Hamanpinta (1000 mg/ml) ou dexametasona (0,8 mg/10 ul) foram aplicados nas orelhas direitas uma hora antes do agente edematogênico (Schiantareli et al.,, 1982).

A orelha esquerda recebeu o mesmo volume de acetona. Após três horas da administração do óleo de cróton, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, discos de 6 mm de diâmetro das orelhas foram removidos e pesados em balança analítica.

Os resultados foram expressos como a média da diferença de peso das orelhas administradas com óleo de cróton e das orelhas esquerdas tratadas com o veículo.

4.5.10. Indução de lesões ulcerativas na mucosa gástrica

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com peso entre 200-300 g, submetidos a jejum de 24 h com água *ad libitum* divididos em grupos de sete animais.

Um dos grupos foi tratado com o veículo no volume de 10 ml/kg (sc), outro com indometacina 10 mg/kg (sc) e outro com o extrato bruto hidroalcoólico da huamanpinta nas doses de 1000 e 2000 mg/kg (sc).

Após uma latência de 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo seus estômagos retirados e abertos ao longo da curvatura maior para a realização de análise e contagem das lesões ulcerativas, de acordo com o esquema a seguir:

Até 10 petéquias	1 ponto
Até 20 petéquias.....	2 pontos
Até 30 petéquias.....	3 pontos
Úlceras de até 1 mm.....	*n x 2
Úlceras maiores que 1 mm.....	*n x 3
Hemorragia.....	1 ponto
Perda das pregas.....	1 ponto
Perda da coloração	1 ponto

* onde n refere-se ao número de lesões encontradas

O índice de lesões ulcerativas (ILU) de cada animal foi obtido através da soma dos parâmetros acima. Posteriormente foi feita uma média destes índices para cada grupo experimental.

4.6. Análise estatística

Os resultados foram expressos com médias $\pm$ erro padrão das médias para cada grupo de tratamento. A diferença entre os grupos experimentais e controles foi determinado pelo teste “t” de Student, considerando-se o valor de $p < 0,05$, para que fossem consideradas diferenças significativas entre os grupos tratados e o controle.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da atividade geral em camundongos

A administração oral do extrato bruto hidroalcoólico da Huamanpinta nas doses de 0,5 e 1,0 g/kg, produziu, em camundongos, uma diminuição da atividade motora geral e também ataxia, efeitos relacionados com a depressão do sistema nervoso central.

5.2. Edema de Pata

5.2.1. Edema de pata induzido por carragenina

No grupo controle (NaCl 0,9%, v.o.), os volumes das patas injetadas com carragenina aumentaram progressivamente : 0.30 ± 0.02 ; 0.45 ± 0.04 ; 0.76 ± 0.04 ; 1.1 ± 0.03 ; 1.3 ± 0.03 ml, após 60; 120; 180; 240 e 300 min., respectivamente.

O tratamento prévio (v.o.) dos grupos de ratos com doses crescentes do EBH de huamanpinta (250; 500 e 1000 mg/kg) reduziu, de modo dose-dependente, o edema de pata durante todo o tempo de avaliação alcançando o máximo após quatro horas da aplicação da carragenina: (250 mg/kg) 0.81 ± 0.03 ; (500 mg/kg) 0.58 ± 0.04 ; (1000 mg/kg) 0.32 ± 0.01 respectivamente (Figura 1).

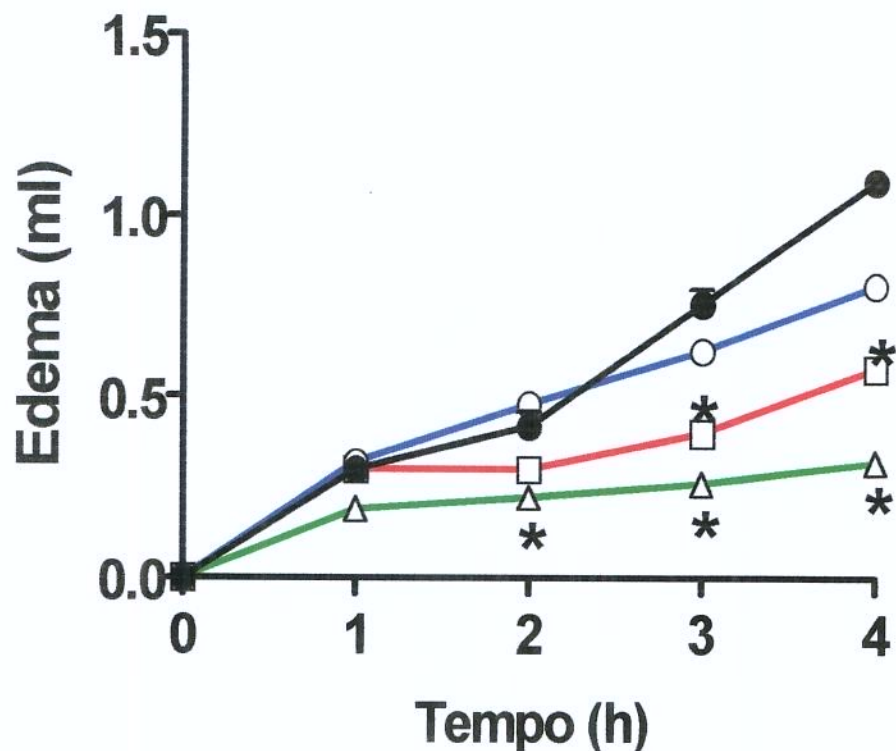


Figura 1: A administração oral do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) de Huamanpinta (60 minutos antes) inibe de modo dose-dependente o edema de pata induzido pela injeção subplantar de Carragenina (●; 1 mg/pata). O extrato bruto foi administrado (v.o.) nas doses de 250 (○), 500 (□) e 1000 (△) mg/kg. Animais controle (●) receberam salina (v.o.) e Cg. O edema foi expresso como aumento no volume da pata (ml) subtraído de seu volume basal. Cada ponto representa a média de 15 ratos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparando-se com os animais controle injetados com Cg.

5.2.2. Edema de pata induzido por composto 48/80 e bradicinina

No grupo controle (NaCl 0.9%) o edema de pata produzido pelo composto 48/80 (10 μ g/pata) produziu o efeito máximo após 30 minutos de sua aplicação (0.76 ± 0.01 ml). O tratamento prévio (60 min. antes) com o EBH da huamanpinta (1000 mg/kg, v.o.) reduziu o edema para 0.37 ± 0.02 ml ($p < 0.01$), 30 min. após a administração do 48/80 (fig. 2).

A bradicinina (50 μ g/pata) produziu no grupo controle um aumento de 0.63 ± 0.01 ml, após 30 min. de sua aplicação. O tratamento prévio (60 min. antes) com o EBH da huamanpinta (1000 mg/kg, v.o.) reduziu o edema para 0.28 ± 0.02 ($p < 0.01$) 30 min. após a aplicação da bradicinina (fig. 2).

5.2.3. Edema de pata induzido pela PLA₂

A administração de PLA₂ do veneno da *Naja naja* (5 μ g/pata) produziu no grupo controle um aumento máximo do volume das patas de 0.76 ± 0.01 ml, após 30 minutos. O tratamento prévio (60 min. antes) com o EBH da huamanpinta (1000 mg/kg, v.o.) reduziu o edema para 0.26 ± 0.02 ml, após 30 min. da administração do veneno (PLA₂) (fig. 3).

O edema foi expresso como aumento no volume de pata (ml) subtraído de seu volume basal .

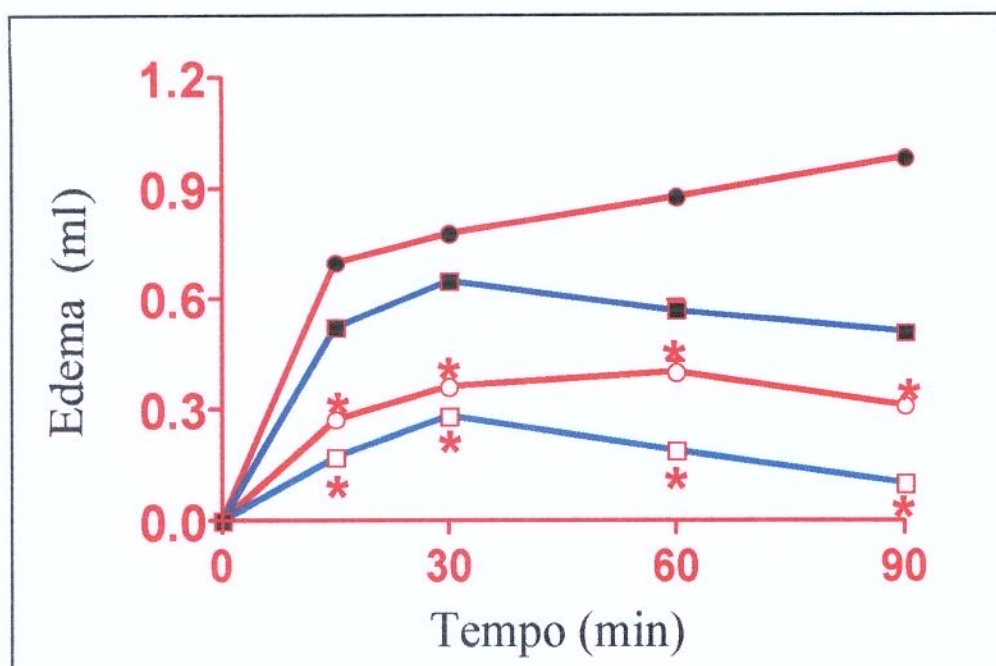


Figura 2: O extrato bruto hidroalcoólico (EBH) de Huamanpinta (1000 mg/kg, v.o., 60 minutos antes) inibe o edema de pata induzido pelo composto 48/80 (10 µg/pata; ○) e pela bradycinina (50 µg/pata; □). Animais controle foram injetados com composto 48/80 e salina (●) ou bradycinina e salina (■). O edema foi expresso como aumento no volume da pata (ml) subtraído de seu volume basal. Cada ponto representa a média de 5 ratos. * $p < 0,01$, comparando-se com os animais controle.

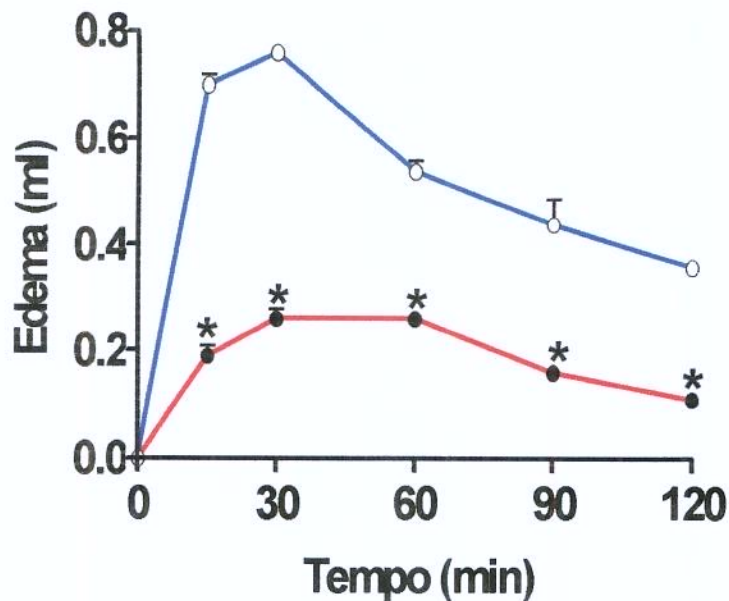


Figura 3: O extrato bruto hidroalcoólico (EBH) de Huamanpinta (●; 1000 mg/kg, v.o., 60 minutos antes) inibe o edema de pata induzido pela fosfolipase A₂ do veneno de *Naja naja* (○; 5 µg/pata). O edema foi expresso como aumento no volume da pata (ml) subtraído de seu volume basal. Cada ponto representa a média de 5 ratos. * $p < 0,01$, comparando-se com os animais controle.

5.2.4. Edema de pata induzido pela carragenina em ratos adrenalectomizados

A aplicação intraplantar de carragenina (1mg/pata) nos animais adrenalectomizados produziu, após três horas, um aumento de $0,70 \pm 0,03$ ml no volume das patas. Já no grupo falso operado a carragenina produziu um aumento médio de $0,62 \pm 0,06$ ml, no volume das patas.

O tratamento prévio dos animais adrenalectomizados com o EBH da huamanpinta (1000 mg/kg), 60 min. antes da administração de carragenina, reduziu o edema para $0,39 \pm 0,08$ ($p < 0,01$), após três horas. O grupo falso operado (Sham) tratados com EBH (1000 mg/kg), 60 min antes da administração de carragenina, reduziu o edema para $0,40 \pm 0,08$ ($p < 0,01$), após três horas.

O edema foi expresso como aumento no volume de pata (ml) subtraído de seu volume basal.

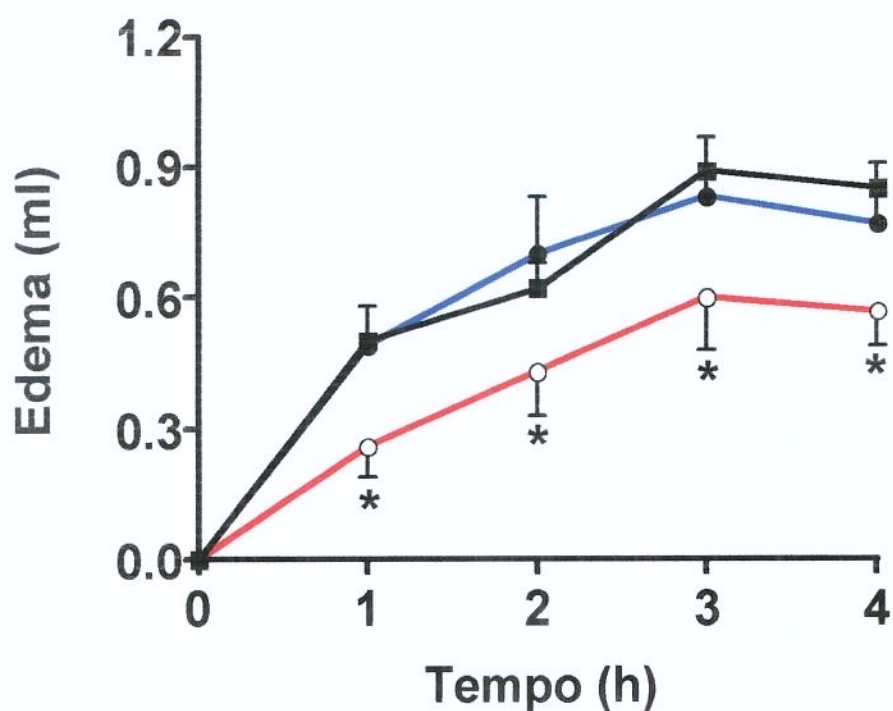


FIGURA 4: Extrato Bruto Hdroalcólico (EBH) de Huamanpinta inibiu o edema induzido pela Cg (1 mg/pata) em ratos adrenalectomizados. Os ratos adrenalectomizados (●) apresentaram um aumento de edema semelhante ao produzido nos ratos falso-operados (■). A administração oral do EBH (1000 mg/kg; 60 minutos antes) nos ratos adrenalectomizados inibe significativamente o edema induzido pela Cg (○). O edema foi expresso como aumento no volume da pata (ml) subtraído de seu volume basal. Cada ponto representa a média de 5 ratos. * $p < 0,01$, comparando-se os animais falso-operados com os grupos de ratos adrenalectomizados.

5.3. Pleurisia induzida por carragenina em ratos

A administração de carragenina (2.5 mg/pleura) no grupo controle produziu um volume médio de exudato pleural, após a lavagem da cavidade, de $5,35 \pm 0,02$ ml. A contagem total de leucócitos totais migrados foi de 86.5 ± 9 ($\times 10^6$).

Os tratamento com indometacina (10 mg/kg, v.o.), controle positivo do teste, reduziu o volume do exudato para $4,84 \pm 0,02$ ml e o número de leucócitos totais para 18 ± 2 ($\times 10^6$) $p < 0.01$.

O tratamento com EBH nas doses de 500, 1000 e 2000 mg/kg reduziu o volume total de exudato para $4,85 \pm 0,02$; $4,72 \pm 0,02$ e $4,72 \pm 0,02$, respectivamente. A migração de leucócitos totais para a cavidade pleural foi reduzida para: 28.5 ± 6 ($\times 10^6$); 15.3 ± 2 ($\times 10^6$) e 10 ± 0.8 ($\times 10^6$), respectivamente.

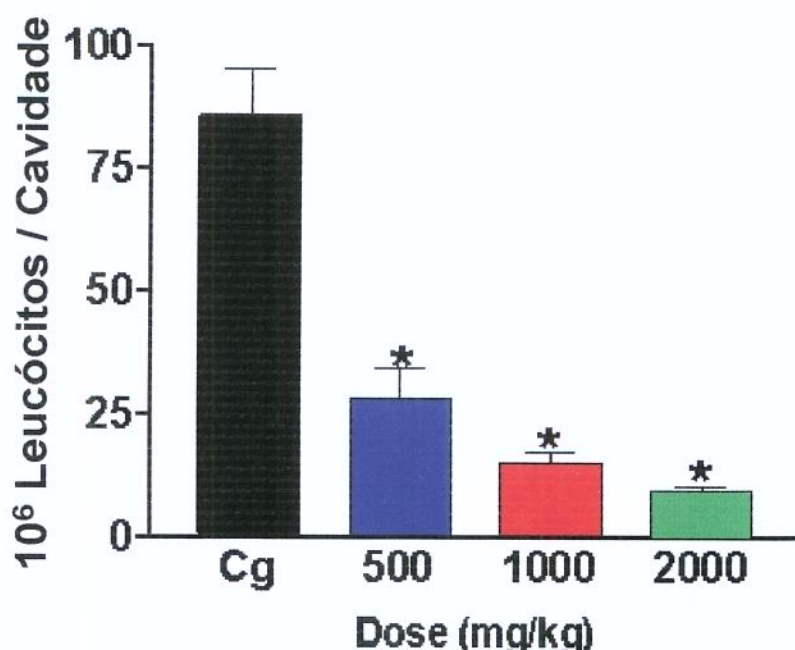


Figura 5: Curva dose-resposta da pleurisia induzida por carragenina (0.125 mg/pleura). A administração oral do extrato bruto (EBH) de Huamanpinta (60 minutos antes) nas doses de 500, 1000 e 2000 mg/kg reduziu significativamente (* $p < 0,01$; $n = 15$.) o número de leucócitos/cavidade no lavado pleural de ratos.

5.4. Estudo comparativo do EBH e suas frações no edema de pata induzido pela carragenina

A injeção intraplantar de carragenina (1mg/pata) nos animais do grupo controle produziu aumento linear do edema, com o pico máximo após quatro horas (0.71 ± 0.02 ml).

Os tratamentos 60 minutos antes do agente inflamatório com EBH (1000 mg/kg,vo, $n=5$), fração orgânica (100 mg/kg,vo, $n=5$) e fração aquosa (100 mg/kg,vo, $n=5$) reduziram o edema para 0.26 ± 0.01 ; 0.15 ± 0.01 e $0.28 \pm 0,01$ $p < 0.01$ respectivamente, três horas após a indução do edema.

O edema foi expresso como aumento no volume de pata (ml) subtraído de seu volume basal .

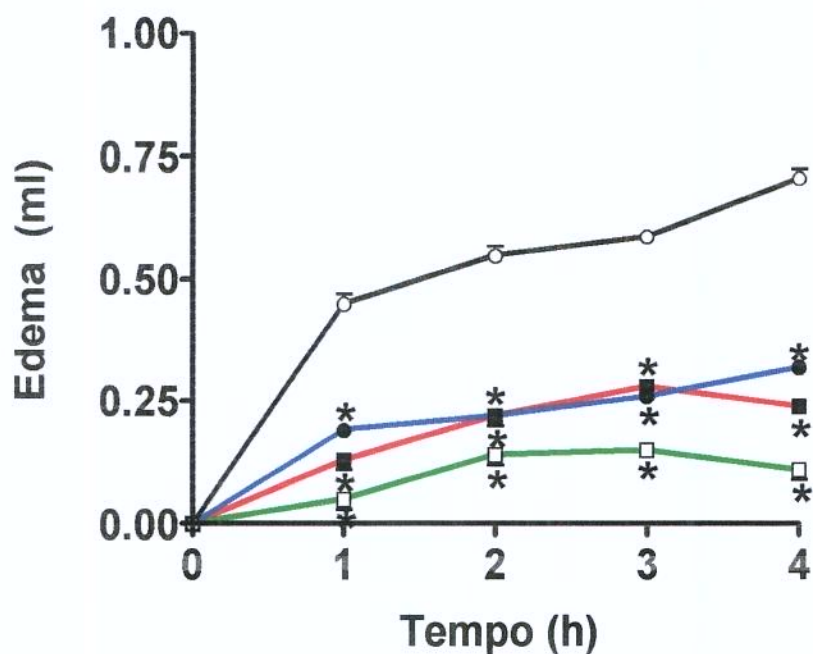


Figura 6: A administração oral do extrato bruto (EBH) de Huamanpinta (●; 1000 mg/kg; 60 minutos antes) e as frações orgânica (□; 100 mg/kg) e aquosa (■; 100 mg/kg) inibiram o edema de pata induzido pela injeção subplantar de Cg (1 mg/pata). Animais controle (O) receberam salina (v.o.) e Cg. O edema foi expresso como aumento no volume da pata (ml) subtraído de seu volume basal. Cada ponto representa a média de 5 ratos, ** $p < 0,01$ comparando-se com os animais controle injetados com Cg.

5.5. Edema de orelha em camundongos

A administração oral do extrato bruto hidroalcoólico na dose 1,0 g/kg, reduziu o edema de orelha produzido pelo óleo de cróton em 67,2%. A dexametasona, droga utilizada como padrão neste experimento, reduziu o edema em 81,2%.

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	Peso da orelha (mg)
Controle		8	93.12 ± 16.36
Dexametasona	1	7	17.70 ± 7.40
EBH	1000	7	30.40 ± 8.80

5.6. Avaliação da atividade ulcerogênica do extrato bruto hidroalcoólico

A avaliação da mucosa gástrica dos animais tratados com o extrato bruto hidroalcoólico na dose de 2000 mg/kg, pela via subcutânea revelou a presença de grande número de petéquias, ou pequenos pontos hemorrágicos em todos os animais. Foram observadas também, lesões ulcerativas de até 1 mm de comprimento em 4, de um total de 6 animais tratados, além de lesões maiores que 1 mm, em 2 deles.

No grupo tratado com o mesmo extrato bruto na mesma dose, porém por via intraperitoneal, foram observadas petéquias em todos os animais tratados e lesões ulcerativas de até 1 mm em 5 de um total de 6 animais tratados.

Todas as lesões ulcerativas observadas possuem características morfológicas semelhantes àquelas produzidas pela indometacina, utilizada como droga padrão de antiinflamatório não esteroideal.

5.7. Análise fitoquímica

5.7.1. Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada em sílica-gel da fração orgânica purificada do extrato bruto hidroalcoólico da huamanpinta diluída com uma mistura de clorofórmio/metanol 5% e revelada por lampada de UV em 366 nm apresentou uma mancha majoritária com RF de 0,4. A revelação desta placa com NP/PEG (solução metanólica a 1 % de difenilboriloxietilamina seguida de uma solução etanólica a 5% de polietilenoglicol) apresentou uma mancha amarelada indicativa de compostos aromáticos.

5.7.2. Cromatografia gasosa acoplada ao detector de espectrometria de massas

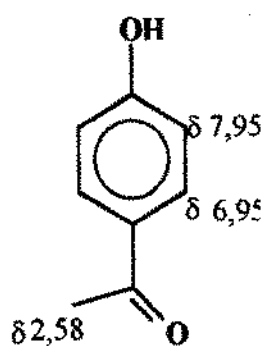
A análise por GC/MS foi realizada em cromatógrafo HP 5890 com detector de massas HP 5970, utilizando coluna marca HP-ULTRA 2 (5 % difenilpolisiloxano e 95 % dimetilpolisiloxano ; de 25m. de comprimento por 0,2 mm de diâmetro por 0,33 um de espessura do filme).

As injeções foram de 1 ul de solução etérea da amostra com “split ratio” de 10:1 e temperatura de 250° C do injetor e do detector. A temperatura inicial do forno foi de 110° C com acrescimo de temperatura de 5°C/min após 2 min da injeção até atingir 240°C, que foi mantida por 10 min.

O tempo de retenção (Tr) do composto majoritário foi de 10,45 min. com um ion molecular de 136 u.m.a..

5.7.3. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H)

Os espectros de RMN de hidrogênio foram obtidos em espectrômetro Varian Modelo Gemini (300 MHz), utilizando-se clorofôrmio deuterado como solvente, tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) são indicados em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em hertz (Hz).

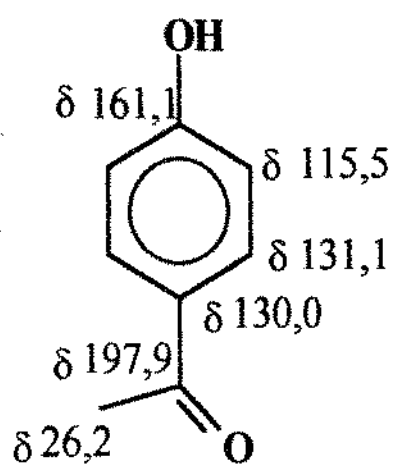


Experimental

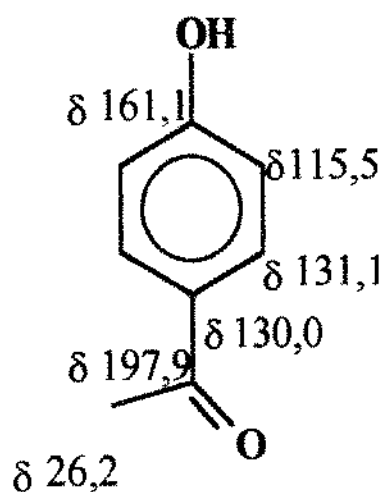
5.7.4. Ressonância magnética nuclear de carbono treze (RMN¹³C)

Os espectros de RMN¹³C foram obtidos em espectrômetro Varian Gemini 300 (75,5 MHz), utilizando-se clorofôrmio deuterado como solvente, tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) são indicados em ppm.

A interpretação dos dados de RMN¹³C foi realizada com ajuda da técnica DEPT 135° (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), onde CH₃/CH = sinal positivo (+), CH₂ = sinal (-), C (não ligado ao H) = sinal de C_{quart.} = sinal ausente, intensidade zero; e DEP. 90° que indicou os CH.



lit (BREITMAIER, 1987)



Experimental

Esses resultados sugerem que o composto majoritário se trata do 4-hidroxi-acetofenona.

6. DISCUSSÃO

O gênero *Chuquiraga* localiza-se na sub-tribo *Barnadesiinae* da tribo *Mutisieae*. Em 1977, o Dr. Angel Cabrera expôs as possíveis relações entre os gêneros desta sub-tribo, considerando o *Dasyphyllum* um gênero primitivo e os gêneros *Arnaldoa* e *Barnadesia*, derivados de um antecessor similar a ele. A afinidade entre *Arnaldoa* e *Chuquiraga* é muito marcante. Tendo em conta como afirma Cabrera (1977) que o gênero *Chuquiraga* tem evoluído a partir de um antecessor pertencente ao *Arnaldoa* (caracterizado pelos capítulos grandes, corolas com vestígios de ser bilabiadas e as folhas com lâmina plana e espinhas geminadas em suas axilas), Cecília Ezcurra considera provável que a seção *Chuquiraga* seja a mais primitiva dentro do gênero *Chuquiraga* e, que a seção *Acantophylla* (que se caracteriza pelos capítulos sempre médios ou pequenos, as corolas tubulosas quase regularmente pentapartidas no ápice e as folhas marcadamente xeromorfas, involutas e sem espinhas axilares) seja um grupo derivado, altamente

especializado na adaptação aos ambientes áridos ou desérticos onde residem a maioria de suas espécies (Ezcurra, 1985).

A espécie *Chuquiraga* sp. Lessing, Linnaea apresenta quatro variantes morfológicas geralmente associadas a áreas de distribuição geográfica distintas como no centro do Peru, nas regiões limítrofes ao Equador, no extremo sul do Peru e norte do Chile e, ainda, no noroeste da Argentina e regiões limítrofes do Chile e Bolívia. Entre essas variantes existem tendências para que suas diferenças morfológicas sejam mantidas sendo que, a amplitude da variação morfológica no interior de cada um destes grupos resulta na frequente existência de exemplares intermediários.

Cecília Ezcurra (1985), considera no entanto, que se trata de uma só espécie politípica, com subespécies distintas, possivelmente resultantes de sua adaptação a distintos ambientes ao longo de sua área de distribuição. Essa classificação em subespécies tenta mostrar as tendências de aparecimento dessas diferenças morfológicas.

Até o momento, não existem evidências de cultivo das espécies deste gênero fora do ecossistema Andino, possivelmente pelas dificuldades de sobrevivência fora de sua área natural. No entanto, se os trabalhos farmacológicos e fitoquímicos revelarem princípios ativos novos com atividade farmacológica de grande interesse, a tentativa de cultivo deve ser estimulada.

Para esse trabalho a huamanpinta foi coletada no Altiplano Andino Peruano, em 1993 e 1996. As exsicatas dessa espécie foram enviadas ao Dr. Angel L. Cabrera, do Instituto de Botânica Darwinion de San Isidro, Argentina, que a classificou como *Chuquiraga spinosa*.

A utilização popular da Huamanpinta (*Chuquiraga spinosa* Lessing), no tratamento de processos inflamatórios é muito antiga e suas atividades antimicrobiana e diurética já foram avaliadas (Rossi, 1993).

Embora a população utilize essa espécie na forma de chá, neste trabalho a avaliação da atividade farmacológica nos diversos modelos de inflamação foi realizada com o extrato bruto hidroalcoólico (EBH). O solvente (etanol a 70%) utilizado, além de

extrair as substâncias polares presentes na infusão, extrai substâncias de baixa polaridade ausentes ou em baixas concentrações nos extratos aquosos.

Os testes de atividade do EBH da Huamanpinta foram iniciados em modelos de inflamação aguda de pata de ratos induzidos por carragenina. Esta substância tem sido usadas classicamente como agente flogístico. A carragenina é um polissacarídeo isolado das algas vermelhas *Chondrus crispus* e *Gigartina stellata* e sua ampla utilização é devida à intensa e reprodutível reação inflamatória que induz. A intensidade da reação obtida depende da dose de carragenina, do tipo de carragenina, e da cepa de ratos empregados no experimento (Medeiros, 1995).

A injeção intraplantar de carragenina (1 mg/pata) em ratos é seguida de um aumento imediato da permeabilidade vascular, levando à exudação de líquido e proteínas plasmáticas (edema) com migração leucocitária predominantemente de neutrófilos. Esse processo fisiopatológico envolve diferentes fases e liberação sequencial de diferentes mediadores da inflamação, como aminas biogênicas (histamina e serotonina), cininas, eicosanóides e óxido nítrico que apresentam evidente participação no processo da inflamação (Giraldelo, 1994; Medeiros, 1994). Esse processo inflamatório é reduzido pela administração prévia de corticóides e antiinflamatórios não-esteroidais (Medeiros, 1995).

Neste modelo de edema de pata de ratos, o EBH da Huamanpinta reduziu de forma dose dependente a formação do edema a partir dos 60 minutos da injeção da carragenina, alcançando a inibição máxima após três horas. A potência antiinflamatória do EBH foi semelhante à obtida com a indometacina, antiinflamatório não-esteroidal, utilizado como controle positivo. Esta substância entre outros eventos, inibe a biossíntese das prostaglandinas, que é sintetizada pelas cicloxigenases microsossomais a partir dos ácidos graxos (Maciel et al., 1995; Maciel, 1997).

Até o momento foram identificadas duas isoformas dessa enzima e classificadas como cicloxigenase-1 (COX-1) e cicloxigenase-2 (COX-2). A COX-1 também referida como PGH sintase-1 (PGHS-1) é expressa continuamente pela maioria das células, sua síntese é pouco ou nada influenciada por hormônios ou mediadores inflamatórios, como a

interleucina- 1 ou as endotoxinas. Seu gene é provavelmente responsável pelo controle das funções fisiológicas das prostaglandinas (Maciel et al,1995; Maciel, 1997). Esta isoforma é inibida pela maioria dos antiinflamatórios não esteroidais (Frölich, 1997).

A COX-2 em condições basais, não está presente na maioria das células. Entretanto, seu gene é de caracter induzível, de modo que sua expressão passa a ser significativamente aumentada por alguns fatores séricos como as citocinas (Arslan, 1996) e fatores de crescimento. Sabe-se ainda, que a rápida produção de COX-2 acaba gerando prostaglandinas que, por sua vez, exacerbam a dor e a própria reação inflamatória. (Ishihara, 1996)

Embora a atividade da COX-2 seja de grande importância para o desenvolvimento da resposta inflamatória aguda, o aumento de sua expressão nas enfermidades degenerativas crônicas contribui para o aparecimento de manifestações dolorosas e perda de função dos órgãos envolvidos (Futaki et al., 1993; De Brum et al., 1994 ; Maciel et al, 1995; Maciel, 1997).

Após a descoberta dessas isoformas da cicloxigenase, o alvo terapêutico mais promissor no campo dos antiinflamatórios passou a ser a inibição predominante da COX-2. Este conhecimento possibilitou redução dos efeitos colaterais dos antiinflamatórios tradicionais, cujos efeitos colaterais geralmente eram decorrentes da potente capacidade dos antiinflamatórios em inibir a COX-1 que participa dos processos de citoproteção no trato gastrointestinal, bem como no controle da irrigação renal. O meloxicam, da família dos oxicans, tem sido reputado como inibidor seletivo da COX-2 e os estudos clínicos comparativos com o piroxicam revelaram uma diminuição em 50% dos efeitos colaterais no sistema gastrintestinal. (Maciel, 1997). Outros inibidores seletivos são hoje alvo de estudos clínicos , entre eles o RWJ 63556 duplo inibidor seletivo da COX-2 e da 5 - lipoxigenase (Kirchner, 1997).

É possível que o EBH da huamanpinta esteja interferindo na síntese das prostaglandinas. No entanto, como diversos mediadores participam da resposta

inflamatória induzida pela carragenina, a atividade desse extrato foi avaliada em modelos experimentais onde outros agentes edematogênicos foram também utilizados.

O composto 48/80 é uma substância polibásica constituída de uma mistura de polímeros de baixo peso molecular derivados da P-metóxi-N-metilfenetilamina. O composto 48/80 é um potente liberador de histamina através da mobilização das reservas de cálcio presentes no retículo endoplasmático (William, 1996). Além disso, o aumento de cálcio no citosol ativa as fosfolipases e proteases dependentes de cálcio e de calmodulina (Lima P., 1994). O edema de pata de rato produzido pela injeção do composto 48/80 atinge o pico máximo após 30 minutos. Nessas condições o EBH da huamanpinta reduziu o edema em 50% sugerindo uma possível inibição da liberação de histamina ou ainda, um bloqueio dos receptores desse autacóide. No entanto como EBH da huamanpinta reduziu o edema produzido pela carragenina também em fases mais tardias, onde a histamina não desempenha um papel preponderante a interferência na ação de outros mediadores do processo inflamatório foi investigada.

A bradicinina é um autacóide nonapeptídico que quando administrado na pata de rato produz vasodilatação intensa, dor, aumento de permeabilidade vascular com liberação de prostaglandinas. A bradicinina liga-se seletivamente ao receptor B_2 (presente na maior parte dos tecidos normais) que é acoplado às proteínas G, e ativa a fosfolipase A_2 e a fosfolipase C. A fosfolipase C libera o trifosfato de inositol e consequentemente cálcio citosólico, e o diacilglicerol, que irá ativar a proteína quinase C. (Tippmer et. al., 1994). Já a fosfolipase A_2 libera ácido araquidônico dos fosfolipídeos ligados à membrana celular que poderá dar origem às prostaglandinas e leucotrienos (Lima P., 1994).

O efeito da bradicinina aumentando a permeabilidade vascular é exercido nas pequenas vênulas e envolve a separação das junções entre as células endoteliais que, juntamente com o aumento do gradiente de pressão hidrostática, provoca edema. A interação com receptores B_1 de células inflamatórias como os macrófagos, pode desencadear a produção e liberação de IL-1 e FNT- α (Mayhan, 1992).

Embora o EBH da humanpinta tenha reduzido o edema de pata de rato produzido pela bradicinina não é possível, ainda, concluir que os princípios ativos desse extrato tenham interação direta com os receptores da bradicinina ou atuem numa segunda etapa inibindo a síntese de prostaglandinas, iniciada pela liberação de PLA₂.

O veneno da *Naja naja*, por ser rico em PLA₂ tem sido muito utilizado para o desenvolvimento de reação inflamatória em pata de rato (Varsani, 1997). Esta enzima hidroliza a ligação éster Sn-2 dos fosfolipídeos de membrana celular (principalmente fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina) com liberação do araquidonato. Como a PLA₂ é ativada pelo cálcio e pela calmodulina, as drogas que reduzem a disponibilidade desse cátion podem inibir sua atividade (William, 1996).

A PLA₂ intervém na síntese da primeira etapa do FAP, transformando o precursor glicerofosfocolina em liso-FAP (lisoglicerofosfocolina) e AA (ácido araquidônico). Nos neutrófilos esta primeira etapa representa a principal fonte do araquidonato, que é metabolizado em prostaglandinas e leucotrienos. Na segunda etapa o liso-FAP é acetilado pela acetil-transferase em FAP. Como ocorre com a PLA₂, a atividade da acetil-transferase é dependente do cálcio. O FAP, sintetizado por plaquetas, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e endotélio vascular, produz aumento da permeabilidade vascular e, conseqüentemente, edema. O mecanismo dessas ações é semelhante ao descrito para a histamina e bradicinina, mas com potência mil vezes superior. Além do aumento da permeabilidade vascular o FAP é quimiotático para neutrófilos, eosinófilos e monócitos, contribuindo para a proliferação celular no local da inflamação. O FAP parece exercer suas ações estimulando receptores celulares ligados à proteína G (Chao e Olson, 1993) que podem ativar as fosfolipases C, D e A₂ resultando na formação de IP₃ (trifosfato de inositol), DAG (diacilglicerol) e AA. O FAP aumenta a concentração de cálcio citosólico por estimulação do influxo deste cátion através dos canais associados à membrana e também, pela mobilização do cálcio intracelular secundária à formação do IP₃. Além da produção de FAP, a PLA₂ libera ácido araquidônico que logo é transformado em prostaglandinas, tromboxano A₂ e leucotrienos.

Os glicocorticóides induzem a síntese de lipocortina que por sua vez inibe a atividade da PLA₂ impedindo a liberação do AA e liso-FAP e a conseqüente formação de prostaglandinas, leucotrienos e FAP. Entretanto, observações recentes indicam que a expressão da COX- 2 é regulada pelos glicocorticóides endógenos (Masferrer et al., 1994) sugerindo que a atividade antiinflamatória dos glicocorticóides pode estar relacionada à sua potência na supressão da expressão da COX-2 (William, 1996). Recentemente foi demonstrado que alguns flavonóides possuem atividade antiinflamatória através da inibição da PLA₂ (Lindahl, 1997).

O EBH da huamanpinta inibiu significativamente o edema de pata de rato induzido pela fosfolipase A₂ do veneno de *Naja naja*. Essa atividade sugere alguns prováveis mecanismos de ação. Um deles seria a inibição direta da atividade da PLA₂, pois testes fitoquímicos preliminares indicaram a presença de flavonóides no EBH. Outro provável mecanismo de ação, seria a inibição da atividade da ciclooxigenase diminuindo a síntese de prostaglandinas. Um terceiro mecanismo poderia envolver a inibição da atividade do FAP ou, ainda, estimular a síntese e ou liberação de corticóides endógenos.

Com a intenção de pesquisar se a huamanpinta está liberando glicocorticóides endógenos, a atividade do EBH foi avaliada em edema de pata induzido por carragenina em ratos pós-adrenalectomizados. Nesses animais, o EBH da huamanpinta manteve sua atividade antiedematogênica excluindo a possibilidade de liberação de corticóides da adrenal.

Após a comprovação da atividade antiinflamatória nos modelos de edema de pata com diferentes agentes edematogênicos, a ação do EBH da huamanpinta foi avaliada no modelo de pleurisia induzido por carragenina. Este modelo de inflamação é muito utilizado pois, possibilita a quantificação do exudato formado e a migração de leucócitos para a região inflamada. A indução de pleurisia pela carragenina é reduzida pelos antiinflamatórios não esteroidais e esteroidais (Vinegar et al., 1973).

Em ratos a injeção intrapleural de carragenina é seguida de um aumento imediato da permeabilidade vascular, evidenciado pela passagem de proteínas plasmáticas e

acúmulo de fluido (Majima, 1997). Após uma hora observa-se intensa infiltração de neutrófilos e alguns monócitos (Vinegar et al, 1973; Harada 1996), com um período de exudação muito acentuado até 3 horas após a injeção de carragenina. A mobilização máxima de neutrófilos ocorre após 2 horas e a de leucócitos mononucleares aumenta linearmente entre 2 a 6 horas após a injeção da carragenina (Vinegar et al., 1973). Além disso, concentrações significativas de diversos mediadores como bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos têm sido detectadas no exudato pleural (Harada, 1996).

Neste modelo de inflamação, o EBH da huamanpinta comprovou sua atividade antiinflamatória reduzindo tanto o exudato pleural, quanto o número de leucócitos totais.

Esses resultados foram semelhantes aos obtidos pela indometacina, que foi utilizada como controle positivo.

O edema de pata e a pleurisia são modelos que se complementam já que é possível ser feita uma analogia entre a formação do edema de pata e a análise quantitativa, qualitativa e temporal do acúmulo de exudato e da mobilização celular no sítio inflamatório (Vinegar, et al., 1973).

A atividade antiinflamatória da huamanpinta também foi avaliada no edema de orelha induzido pelo óleo de cróton. Esse modelo de inflamação é utilizado com frequência para demonstrar a ação tópica de novas drogas antiinflamatórias. O óleo de cróton é um agente flogístico altamente irritante que, na dependência da dose, pode produzir uma reação inflamatória franca com vasodilatação, edema, estase sangüínea e migração leucocitária. Em muitos casos pode ocasionar a degeneração da orelha com inchaço da cartilagem, necrose, infiltração granulocitária e hemorragia. Os estudos indicam que as drogas esteroidais são inibidores efetivos dessa reação inflamatória, mas o efeito dos antiinflamatórios não esteroidais não é evidente ou constante (Tubaro et al, 1986; Núñez, 1995)

Esses resultados aparentemente favorecem uma ação do tipo não esteroideal do EBH da huamanpinta, cujo mecanismo de ação é explicado pela inibição da cicloxigenase. No entanto é possível que no EBH exista um princípio ativo com atividade

do tipo esteroideal mas com pouca capacidade de absorção tópica. Além disso a enorme quantidade de substâncias presentes em extratos brutos pode dificultar a absorção do princípio ativo por via tópica.

Um dos efeitos colaterais mais frequentes produzido tanto pelos antiinflamatórios esteroidais como não esteroidais é a lesão gástrica, que pode variar desde uma irritação simples (gastrite) até ulceração grave com hemorragia e perfuração gástrica. Esse efeito colateral está diretamente relacionado ao mecanismo de ação destas classes de antiinflamatórios, que inibem a síntese de prostaglandinas (via Cox - 1). As prostaglandinas produzidas no estômago desempenham papel fundamental na citoproteção gástrica por induzirem a síntese de muco e bicarbonato (e por eles provocar a vasodilatação). Dessa forma, a avaliação da atividade ulcerogênica de extratos e princípios ativos com atividade antiinflamatória pode sugerir o provável mecanismo de ação dessas drogas. (Dias, 1997).

O EBH da huamanpinta administrado pelas vias subcutânea e intraperitoneal, produziu, após quatro horas, lesões gástricas anatomicamente semelhantes às induzidas pela indometacina, utilizada nesse experimento como padrão. Esses resultados confirmam a hipótese de inibição da síntese de prostaglandinas como mecanismo de ação desse extrato. No entanto, ainda não é possível concluir se esta atividade é resultante da inibição da PLA₂ ou da cicloxigenase.

A purificação parcial do EBH dividiu os princípios ativos com maior polaridade (fração aquosa) daqueles com menor polaridade (fração orgânica). O teste de atividade em edema de pata de rato produzido por carragenina, revelou que a fração orgânica reteve a maior parte dos princípios ativos. Dessa forma essa fração foi selecionada para as análises cromatográficas.

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, os espectros de ressonância magnética nuclear de prótons e de carbono 13, realizados e interpretados pela Dra. Mary Ann Foglio do CPQBA, revelaram a presença da 4-hidroxiacetofenona como componente majoritário da fração orgânica. No entanto, somente após a obtenção desse

princípio ativo em quantidade suficiente para a realização dos testes de atividade biológica, será possível esclarecer se esta substância está relacionada à atividade antiinflamatória do EBH da huamanpinta.

7. CONCLUSÃO

O extrato bruto hidroalcoólico da *Chuquiraga spinosa* reduziu o edema de pata produzido pela injeção de carragenina de forma dose dependente. Essa atividade foi mantida em ratos adrenalectomizados, sugerindo dessa forma ser independente da liberação de corticóides da adrenal.

A atividade antiedematogênica foi confirmada também nos modelos de edema de pata de ratos produzidos pelo composto 48/80, pela bradicinina e pela fosfolipase A2 do veneno de *Naja naja*. Essa atividade foi reproduzida no modelo de inflamação induzida pela aplicação tópica de óleo de cróton na orelha de camundongos.

No modelo de pleurisia produzido pela carragenina o EBH, também reduziu de modo dose-dependente a migração leucocitária, confirmando a atividade antiinflamatória.

O EBH da huamanpinta, administrado pelas vias oral e subcutânea, produziu após quatro horas lesões anatomicamente semelhantes às produzidas pela indometacina.

Os resultados obtidos sugerem que a atividade antiinflamatória do EBH da huamanpinta é consequência da inibição da síntese de prostaglandinas. No entanto, o mecanismo dessa inibição ainda não pôde ser confirmado.

A purificação parcial do EBH produziu uma fração orgânica que reproduziu o efeito antiedematogênico na inflamação produzida pela administração de carragenina na pata de rato.

Os estudos cromatográficos e espectrométricos dessa fração revelaram, como componente majoritário, a 4-hidroxiacetofenona. No entanto, somente a sequência desse trabalho poderá determinar se esta substância é um dos princípios ativos responsáveis pela atividade antiinflamatória do EBH da huamanpinta.

8. ABSTRACT

Peruvian folk medicine use *Chuquiraga spinosa* Lessing subsp *Huamapinta ezcurra*, also known as “**Huamanpinta**”, as diuretic, antiinflammatory and antireumatic. The antiinflammatory activity of crude hydroalcoholic extracts, as well as aqueous and organic fractions were tested on acute inflammatory experimental models using rats and mice.

When the crude extract (250, 500 and 1000mg/Kg.v.o) was administrated 1 hour previous to carrageenan inflammatory induction, paw edema was inhibited throughout the experiment exhibiting a dose dependent relation.

Animals previously treated with crude plant extract on experimental models that employed compound 48/80 (10 µg/ paw) and bradikinin (50 µg/ paw) to inflict edema, were also inhibited the flogistic agents.

The resulting aqueous and organic fractions as well as the crude extract were tested on carrageenan induced paw edema to seek the most efficient one. Although the organic fraction gave the best results, all three showed antiinflammatory activity.

In adrenalectomized rats the crude huamanpinta extract maintained the antiedematogenic activity.

On experimental pleurisy (carrageenan 2.5 mg/pleura) the crude extract of Huamanpinta (500, 1000 e 2000 mg/kg, v.o.) decreased pleurisy exudate volume and total leukocyte migration towards the pleural cavity, with dose dependence form.

Oral administration of crude extract lowered the ear edema induced by croton oil, in mice. Whereas topic treatment didn't show alterations.

The main compound of organic fraction was analyzed by gas chromatography with mass detection, RMN¹H and RMN¹³C indicating to be 4-hydroxi-acetophenone.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA A.P. ; BAGER B.M., HORAKOVA Z. and BEAVEN M.A. Influence of indomethacin and other antiinflammatory drugs on mobilization and production of neutrophils: studies with carrageenan-induced inflammation in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **214** (1): 74-79, 1980.

ANTUNES E., MARIANO M., CIRINO G., LEVI S. & de NUCCI G.; Pharmacological characterization of polycation-induced rat hind-paw oedema. **Br. J. Pharmacol**, **101**, 986-990, 1990.

BEVERLEY P., GOODING L., KARRE K., PICKER L., SHAW S., SPRENT J. Defesa do hospedeiro contra a infecção . Texto imunologia 2da. ed. por CHARLES A. JANEWAY Jr. - PAUL TRAVERS. p: 9:1 - 9:25, 1997.

BRETT J., GERLACH H., NAWROTH P., STEIMBERG S., GODMAN G., and STERN D.: Tumor Necrosis factor/cachectin increases Permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. **J. Exp. Med.** 169: 1977-1991, 1989.

CAMPBELL W.B., e HALUSHKA P.V. Autocóides derivados dos lipídios, eicosanóides e fator ativador plaquetário. As bases farmacológicas da terapêutica por Goodman & Gilman. 9na. ed. p: 438 - 449, 1996.

CAMPOS M.M., SOUZA G. E. P., & CALIXTO J. B. Upregulation of B₁ receptor mediating des-Arg⁹-BK-induced rat paw oedema systemic treatment with bacterial endotoxin. **British Journal** 117, 793-798, 1996.

CAMPOS M.M., SOUZA G. E. P., & CALIXTO J. B. Efeito modulatório da IL-1 e TNF sobre as respostas edematogênicas mediadas pelos receptores B₁ e B₂ das cininas. XII reunião anual da federação de sociedades de biologia experimental (FESBE) .Nº 14.043 p: 202, 1997.

CAPASSO F., DUMN C.J., YAMAMOTO S., WILLOUGHBY . D. A, and GIROU J.P.; further studies on carrageenan-induced pleurisy in rats. **J. Path.**, 116:117-124, 1975.

COLEMAN R. A . , SMITH W. L., AND NARUMIYA S. ,VIII International Union of Pharmacology Classification of prostanoid receptors : properties, Distribution and struture of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. R eviews.* 46 (2): 205-229. 1994.

COTRAN R. S, ENDOTHELIAL CELLS. IN KELLEY. W. N., et al .(eds) : textbook of rheumatology, 4th ed. Philadelphia, W. B Saunders Co, pp 327-336. , 1993

CHAO W. ., and OLSON, M. S. Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem. J.* 292: 617-629, 1993.

CHAVEZ SANTISTEBAN FABIOLA , Estudio Farmacológico de una espécie del género chuquiraga Jussieu,(monografia) trabajo y actitud para optar el título de químico farmacéutico, en la facultad de farmacia y bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. LIMA - PERÚ. Tesis No 253, p4 , 1994.

CHAVEZ M. H. Análise de extratos de plantas por CCD: uma metodologia aplicada à disciplina “Química Orgânica”. *Química Nova*, 20 (5), p: 560-561 1997.

DE MELO AMOROZO MARIA CHRISTINA. A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais . Texto, Plantas medicinais : arte e ciência 1 - ed. por Luís Claudio Di Stasi , p. 47 - 68, 1995.

DE BRUM-FERNANDES AJ., LAPORTE S., HEROUX M., LORA M., PATRY C., MENARD H.A., DUMAIS R., LEDUC R.: Expression of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and prostaglandin endoperoxide synthase-2 in Human Osteoblasts. *Bioch Bioph Res. Comum* ; 198 (3): 955 - 960.1994.

DIAS, PC. Atividade antiulcerogênica dos extratos brutos e das frações semipurificadas de *Artemisia annua* L. Tese de Mestrado, UNICAMP, 1997.

DWORSKI R., and SELLER J. R. Differential sensitivities of human blood monocytes and alveolar macrophages to the inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase - 2 by interleukin - 4. **Prostaglandins** **53**: 237 - 251, 1997.

ECKLY A.M., MARTIN V., & LUGNIER C. Involvement of cyclic nucleotide-dependent protein kinases in cyclic AMP-mediated vasorelaxation. **British Journal of Pharmacology** **122**, 158-164, 1997.

EMIM J. A.S., OLIVEIRA, A.B.; LAPA, A.J. - Pharmacological evaluation of the antiinflammatory activity of a Citrus Bioflavonoid, hesperidin and the Isoflavonoids, Duartin e Claussequinone, in rats and mice. **J. Pham. Pharmacol.** **46** : 118-122, 1994.

EZCURRA CECILIA . Revision del género chuquiraga (compositae - mutisieae) . **Revista Del Instituto De Botánica Darwinion** **26 (1-4)** : 219 - 284, 1985.

FEARON D.T., GOULD H., KINET J-P., MACLENNAN I.C.M., MELLMAN I. A resposta imune humoral. Texto de imunobiologia **2da. ed.** por CHARLE A. JANEWAY Jr - PAUL TRAVERS. p: 8.28 - 8.45, 1997.

FOREMAN K.E., GLOVSKY M.M., WARNER R.L., HORVATH S.J., and WARD P.A. Comparative effect of C3a AND C5a ON NEUTRPHILS AND ENDOTHELIAL CELLS. **Inflammation**, vol. 20, Nº. 1, p: 1-9 1996.

FRÖLICH J.C., A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. **Trends in Pharmacological Sciences** vol. **18** (1) : 30-34, 1997.

FUTAKI N, ARAI I, HAMASAKA Y, TACAHASHI S, HIGUCHI S, OTOMO S: Selective inhibition of NS-398 on prostanoid production in inflamed tissue in rat carrageenan-air-pouch inflammation. **J. Pharm Pharmacol.**; **45**: 753-55. 1993.

GABOURY J.P., JOHNSTON B., NIU X., and KUBES P. Mechanisms Underlying Acute mast cell-induced leukocyte rolling and adhesion *in vivo*. **The Journal of Immunology**, **154**: 804-813, 1995.

GIRALDELO M.M., ZAPPELLINI A., MUSCARÁ M.N., DE LUCA I., HYSLOP S., CIRINO G., ZATZ R., 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.

GOPPELT - STRUEBE M., SCHAEFER D., & HABENICHT A.J.R. Differential regulation of cyclo-oxygenase-2 and 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) expression by glucocorticoids in monocytic cells. **British Journal of Pharmacology** **122**, 619-624, 1997.

HAMBURGER M., and HOSTETTMANN K. Bioactivity in plants the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, Vol. **30**, No. **12**, p. 3864 - 3874, 1991.

HARADA Y., HATANAKA K., KAWAMURA M., SAITO M., OGINO K., YAMAMOTO K., TAKETANI Y., YAMAMOTO S., and KATORI M. Role of prostaglandin H synthase-2 in prostaglandin E₂ formation in rat Carragenin-Induced Pleurisy. **Prostaglandins 51:** 19-33, 1996.

HIKI K., YUI Y., HATTORI R., EIZAWA H., KOSUGA K., and KAWAI C. Three regulation mechanisms of nitric oxide synthase. **European Journal of Pharmacology - Molecular Pharmacology Section**, 206, 163-164, 1991.

HYSLOP S., and DE NUCCI G. Prostaglandins Leukotrienes and essential fatty acids. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids 49**, 723-760, 1993.

IALENTI A., IANARO A., MONCADA S., and DI ROSA M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. **European Journal of Pharmacology**, 211, 177-182, 1992.

ISHIHARA O., NUMARI H., SAITOH M., ARAI Y., TAKANASHI H., KITAGAWA H., and KINOSHITA K. Prostaglandin E₂ production by endogenous secretion of interleukin-1 in decidual cells obtained before and after the labor. **Prostaglandins 52:** 199-208, 1996.

ISHII K., CHANG B., KERWIN J.F., Jr., HUANG Z., and MURAD F. N^o-Nitrito-L-arginine: a potent inhibitor of endothelium-derived relaxing factor formation. **European Journal of Pharmacology**, 176, 219-223, 1990.

JANSEN - OLESEN I., OTTOSSON A., CANTERA L., STRUNK S., LASSEN L.H., OLESEN J., MORTENSEN A., ENGEL U., & EDVINSSON L. Role of endothelium and nitric oxide in histamine-induced responses in human arteries and detection of mRNA encoding H₁- and H₂-receptors by RT-PCR. **British Journal of Pharmacology** 121, 41-48, 1997.

KIRCHNER T., ARGENTIERI D.C., BARBONE A.G., SINGER M., STEBER M., ANSELL J., BEERS S.A., WACHTER M.P., WU W., MALLOY E., STEWART A., and RITCHIE D.M. Evaluation of the antiinflammatory activity of a dual cyclooxygenase-2 selective/5-Lipoxygenase Inhibitor, RWJ 63556, in a canine model of inflammation. **The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** vol. 282 (2): 1094-1101, 1997.

KUO P.C., SCHROEDER R.A. and LOSCALZO J. Nitric oxide and acetaminophen-mediated oxidative injury: modulation of Interleukin-1-induced nitric oxide synthesis in cultured rat hepatocytes. **The Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**. vol . 282 (2): 1072-1083, 1997.

LANDUCCI, ELEN C. T.; ANTUNES EDSON; DONATO J. L.; FARO R.; HYSLOP S., MARANGONI, S.; OLIVEIRA B.; CIRINO G. & DE NUCCI G. Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A₂. **British Journal of Pharmacology** 114,p. 578 - 583, 1995.

LAU H.Y.A., and ROCHE C.M. Effect of secretory phospholipase A₂ enzymes on mast cells of rat guinea pig and human. **Inflamm. Res.** 46, suplement 1 S19-S20, 1997.

- LIMA PEREIRA F.E., e BOGLIOLO L.** Inflamações . Texto de patologia por BOGLIOLO .
cap. 7, p: 111 - 142, Etiopatogênese geral das doenças. **cap: 3**, p: 20-45, 1994.
- LINDAHL M., and TAGESSON CHRISTER.** Flavonoids as phospholipase A₂ Inhibitors:
Importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A₂.
Inflammation, vol. 21, Nº.3, 347 - 356, 1997.
- LYDYARD P., e GROSSI C.** Células envolvidas nas respostas imunes. Texto de imunologia 4ta.
ed. por ROITT, BROSTOFF, MALE. **cap: 2** , p: 2.2 - 2.15, 1997.
- MACIEL F. M. B., LORA M., MORISSET S., DUMAIS R., DE BRUM-FERNANDES Aj:**
Induction of Cox-2 expression by PTH in Human osteoblasts in culture. *Arth e Rheum.*; 38
(Suppl): S360. 1995.
- MACIEL F.M.B.,** Importância clínica da Cox-1 e da Cox-2 . *Cox News Série Ortopedia* . ano 2
, Nº1. p:13, 1997.
- MAJIMA M., KAWASHIMA N., HIROSHI I., & KATORI M.** Effects of an orally active non-
peptide bradykinin B₂ receptor antagonist, FR173657, on plasma exudation in rat carragenin-
induced pleurisy. *British Journal of Pharmacology* 121, 723-230,1997.
- MALE D., ROITT I.** Introdução ao sistema imune . Texto de imunologia 4ta. ed. por ROITT,
BROSTOFF, MALE. **Cap. 1**, p: 1.2 - 1.12, migração celular e inflamação **cap. 14**, p:14.2 -
14.8, 1997.

- MALONE M.H.** The pharmacological evaluation of natural products - general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. *J. Ethno Pharmacol.*, V. 8, p. 127 - 147 , 1983.
- MASFERRER J.L. , REDDY S.T., ZWEIFEL B. S., SEIBERT K., NEEDLEMAN P., GILBERT R.S., and HERSCHMAN H.R.** *In vivo* glucocorticoids regulate cyclooxygenase-2 but not cyclooxygenase-1 in peritoneal macrophages. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, , 270 (3) : 1340-1344 1994.
- 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 M.V., BINHARA I., MORENO H.Jr., ZATZ R., DE NUCCI G., ANTUNES E.** Effect of chronic nitric oxide synthetis inhibition on the inflammatory responses induced by carragenin in rats. *European J. of Pharmacol.* 285 : 109 - 114, 1995.
- MONCADA S.** The L-arginine: nitric oxide pathway . *Acta Physiol Scand*, 145, 201-227, 1992.
- MONCADA S., PALMER R.M.J.; and HIGGS E.A. .** Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43 (2): p : 109, 1991.

MONTEIRO FLÁVIO DE BARROS MACIEL. Simpósio Internacional "Cox-1e Cox-2" e seus Inibidores: da farmacologia à clínica. - **Revista COX News Vol. 2 (nº 1)**, p. 13-17, 1997.

MORLEY J., PAGE C.P., & PAUL W. Inflammatory action of platelet activating factor (Paf - acether) in guinea - pig skin. **Br. J. Pharmac.** **80**: 503 - 509 , 1983.

MORROW D.J., HILL K.E., BURK R.F., NAMMOUR T.M., BADR K.F., and ROBERTS L.J.II. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol.87**. pp.9383-9387, 1990.

MULLER, W. A . , WEIGL S.A, DENG X., and PHILIPS D. M., . Pecam-1 is required for transendothelial migration of **Leukocytes J. Exp. Med.** **178**:449-460, 1993.

NUÑEZ G. MARIA ELENA . Estudo comparativo das atividades antiinflamatórias e analgésicas das *plantago major* L.E *plantago lanceolata* L. cultivadas em diferentes ecossistemas. Tese de mestrado apresentado à Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo para a obtenção do Título de Mestre em Farmacologia, 82 p. , 1995.

OGINO M., MAJIMA M., KAWAMURA M., HATANAKA K., SAITO M., HARADA Y., and KATORI M. Increases migration of neutrophils to granulocyte-colony stimulating factor in rat carrageenin-induced pleurisy: roles of complement, bradykinin, and inducible cyclooxygenase-2. **Inflamm. res.** **45**: 335-346, 1996.

- OHNO N., ICHIKAWA H., COE L., KVIETYS P.R., GRANGER D.N., and STEVEN J.A.** Soluble selectins and icam-1 modulate neutrophil-endothelial adhesion and diapedesis in vitro. **Inflammation**, vol. 21, Nº 3, 313 - 324 1997.
- PALMER R.M.J., REES D.D., ASHTON D.S., and MONCADA S.** L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochemical and Biophysical Research Communications** vol.153, nº. 3, p:1251-1256, 1988.
- PECK M. J., PIPER P.J., and WILLIAMS T.J.** The Effect Of Leukotrienes C₄ and D₄ on the microvasculature of guinea - pig skin. **Prostaglandins** , Vol. 21, (2) , p. 315 - 321, 1981.
- ROSSI CORTEZ CESAR ABEL.** Determinación de la actividad antimicrobiana de 8 especies medicinales del Callejon de Huaylas .. Trabajo de Aptitud Profesional para optar el Título de Químico-Farmacéutico. Facultad de Farmacia de Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. LIMA - PERÚ. Tesis No 3692. 1993.
- SALVEMINI D., MASINI E., PISTELLI A., MANNAIONI P.F., and VANE J.** Nitric oxide: a regulatory mediator of mast cell reactivity. **Journal of Cardiovascular Pharmacology** , 17, (3) : S258-S264, 1991.
- SCHWARTZ L.B.** Mast cells: function and contents. **Current Opinion in Immunology** 6: 91-97, 1994.
- SOUKUP JAROSLAV.** Vocabulario de los nombres vulgares de la flora Peruana. Colegio Saleciano . LIMA - PERÚ; p: 10 - 15, 1980.

- TEIXEIRA M.M., WILLIAMS T.J., & HELLEWELL P.G. Role of prostaglandins and nitric oxide in acute inflammatory reactions in guinea-pig skin. **Br. J. Pharmacol.** **110**, 1515-1521, 1993.
- TIPPMER S., QUITTERER U., KOLIN V., FAUSSNER A., ROSCHER A., MOSTHAF L., MÜLLER-ESTERL W., AND HÄRING H. ,Bradykinin induces translocation of the protein kinase C isoforms α , ϵ , ζ . **Eur. J. Biochem.**, **225**:297-304, 1994.
- TUBARO A., DRI P., MELATO M., MULAS G., BIANCHI P., DEL NEGRO P., and DELLA LOGGIA R. In the croton oil ear test the effects of non steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) are dependent on the dose of the irritant. **Agents and Actions**, Vol. **19**, 5 / 6 (1986).
- UNO H., ARAKAWA T., FUKUDA T., YU H., FUJIWARA Y., HIGUCHI K., INOUE M., and KOBAYASHI K. **Prostaglandins** **53**: 153-162, 1997.
- VARSANI M., and PEARCE F.L. Role of phospholipase A₂ in mast cell activation. **Inflamm. res.** **46**, Supplement 1 S9-S10, 1997.
- VINEGAR R., TRUAX, J. F.; SELPH J. L.- Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in the rat. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **143**: 711-714, 1973.
- WAURICK R., BONE H-G., MEYER J., BOOKE M., MEIBNER A., PRIEN T., AKEN H.V. Haemodynamic effects of dopexamine and nitric oxide synthase inhibition in healthy and endotoxaemic sheep. **European Journal of Pharmacology** , **333**, 181-186, 1997.

- WHO** . Percentage distribution of the world health organization recommended drugs regarding ?
Their sources. **Who Tech . Rep. Ser.** **72**, 1985.
- WHORTON** A.R., **SIMONDS** D.B., and **PIANTADOSI** C.A. Regulation of nitric oxide synthesis by oxygen in vascular endothelial cells. **AM. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol** **.272**, p: 616 (L1161-L1166) 1997.
- WILLIAM** E., **SERAFIN** E., **KENNETH** S., **BABE** Jr. Autocoides; terapia medicamentosa da inflammation. Texto As bases farmacológicas da terapêutica. por Goodman & Gilman . **9na** ed. p: 421 - 437, 1996.
- WILLIAMS** T.J. Prostaglandin E₂ Prostaglandin I₂ and the vascular changes of inflammation. **Br. J. Pharmacol.** **65**, 517 - 524, (1979).
- WINTER** C.A., **RISLEY** E.A., **NUSS** G.W., Carrageenan - induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine.** **111**: 544 - 547, 1962.
- XUE** S., **SLATER** D.M., **BENNETT** P.R., **MYATT** L. Induction of both cytosolic phospholipase A₂ and prostaglandin H synthase-2 by interleukin-1 β in wish cells is inhibited by dexametasone. **Prostaglandins** **51**: 107-124, 1996.