

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

Celeste Heisecke Cabrera

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO ÁCIDO ARJUNÓLICO
EXTRAÍDO DE *Combretum leprosum* MART. & EICHER
(COMBRETACEAE) EM CAMUNDONGOS**

Trabalho apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a conclusão do curso.

Orientadores: Prof. Dr. Adair Roberto Soares Santos e MSc. Morgana Duarte da Silva.

Florianópolis
2011

Cabrera, Celeste Heisecke

Atividade anti-inflamatória do ácido arjunólico extraído de *Combretum leprosum* Mart. & Eicher (Combretaceae) em camundongos

Florianópolis, 2011.

Orientador: Prof. Adair Roberto Soares dos Santos, Ph.D.
Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal de Santa Catarina – Curso de Graduação em Ciências Biológicas

1. Inflamação 2. Produto natural 3. Triterpeno

Dedicado a toda minha família.
Sem vocês eu nunca teria chegado tão longe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Ernesto e Jazmín, que sempre me apoiaram e estiveram comigo mesmo na distância.

Às minhas irmãs, Lucero, Laurel e Violeta por serem, sobretudo, minhas amigas, estarem ao meu lado em todos os momentos e porque a ligação que temos é maior que qualquer diferença nossa.

Aos meus “abuelos”, Elida, Sara e Carlos, e tia Elvira que torceram por mim em todo momento.

A Babs e Dionei por abrirem os braços, me acolher e acompanharem no começo da minha trilha num mundo completamente novo, aos meus tios Sara e Sérgio por estar disponíveis sempre e ao Tomás, por esses sorrisos todos.

À Fá por me “introduzir” na sociedade de Floripa, pelas risadas, energia positiva e parceria nos maus feitos!

Às minhas irmãs, mães e filhas do coração, Mari, Iva e Angela por tudo que crescemos, rirmos, choramos, brigamos, festamos, conversas com o olhar... Em fim, por tudo que vivemos juntas! Principalmente, à Mari, amiga, confidente, companheira de estudos, pelas conversas à madrugada, danças na chuva... etc. etc... desde os começos da nossa história biológica.

Ao Rodrigo, namorado e companheiro de todas as horas, aos seus pais, pelo carinho e ao Toby, por nunca cansar de brincar comigo.

Ao professor Adair, dedicado, entusiasmado, conselheiro, amigo sempre disposto a ajudar e pelos puxões de orelha que me auxiliaram no meu crescimento profissional e pessoal.

À professora Elisa, pela disposição e me iniciar no mundo científico.

À tooooda a família LANDI, Ney, Dani, Leidi, Fran, Ari, Ana, Chico Murilo, Luana e Serginho, pelos papos científicos e não tão científicos, pela ajuda a qualquer hora, passes do RU, carinho e amizade. Um carinho especial para a Tati, por me ensinar a cuidar dos animais, para a Débora pelos ensinamentos laboratoriais, a Marina, representante do grupo dos caçadores de borboletas, para a Deise pela força e ajuda infinita, esse menino Gaúcho, pelos papos culturais dentro e fora do bar, e a Marci, pela parceria.

À Morgana, (não existem palavras suficientes para agradecer!) Muito obrigada por tuuuudo! Pela paciência, alegria, energia, repertório musical, carinho, conversas sérias e brincadeiras e, claro, pela orientação.

À professora Daniela Tagliari Longhi, por toda a ajuda e porque parte deste trabalho foi realizado por ela.

Ao CNPq pelo apoio financeiro e por abrir as portas para novas oportunidades.

Ao professor Valdir Alves Facundo, por isolar, purificar e identificar o ácido arjunólico.

Aos amigos da torcida paraguaia, que seguiram caminhos diferentes, mas sempre me acompanham.

Aos amigos, colegas e professores da biologia, por me ajudar a construir meu próprio caminho e a enxergar o mundo com outros olhos.

À Simbiosis, em especial ao MKT, pelas experiências inesquecíveis, por me ensinar a aceitar às críticas, a escutar e por ampliar meus horizontes.

Ao seu Carlos e a dona Vilma, pela alegria de todos os dias.

Aos animais, todo o meu respeito.

Agradeço também a todos que de alguma forma colaboraram com a execução deste trabalho, mas que eu tenha me esquecido de mencionar.

“O que dá beleza ao deserto é que esconde um poço
de água em qualquer parte.”

(Antoine de Saint-Exupéry, 1943)

...Afinal, na ciência não é diferente.

RESUMO

Combretum leprosum (mofumbo ou cipoaba) é um arbusto nativo do Brasil utilizado na medicina popular para o tratamento de hemorragias, como sedativo, cicatrizante, antiofídico e antitussígeno. Estudos fitoquímicos permitiram isolar alguns flavonóides e triterpenos com atividade biológica, dentre estes, o triterpeno ácido arjunólico. Existem evidências que indicam uma atividade anti-inflamatória deste composto, porém não existem trabalhos que descrevam tal efeito. Assim, o objetivo do presente estudo foi analisar o efeito anti-inflamatório do ácido arjunólico no modelo de peritonite induzida por carragenina. Foram usados camundongos Swiss adultos (25-30 g) de ambos os sexos. Os animais foram pré-tratados com ácido arjunólico (10, 30 ou 100 mg/kg, v.o.) 1h antes da injeção intraperitoneal (i.p.) de 0,5 ml de carragenina (750 µl/sítio); ou 0,5h antes, da administração de dexametasona (controle positivo; 0,5 mg/kg, i.p.). Depois de 4h da injeção de carragenina os animais foram sacrificados e o exsudato coletado para a contagem de leucócitos, avaliação da permeabilidade capilar, ensaio de mieloperoxidase e determinar os níveis de citocinas. O ácido arjunólico produziu uma redução na migração leucocitária para a cavidade peritoneal nas doses de 30 e 100mg/kg ($I_{max}=53\pm6$ e $54\pm5\%$, respectivamente; e $DI50\approx 49$ mg/kg), similar a encontrada no grupo de animais tratados previamente com dexametasona. Esta redução foi representada pela diminuição na migração de polimorfonucleares ($I_{max}=52\pm8$ e $55\pm14\%$, respectivamente para as doses de 30 e 100 mg/kg; e $DI50\approx 55$ mg/kg). Resultados semelhantes foram obtidos no grupo controle positivo. O ácido arjunólico não foi capaz de reduzir a migração de mononucleares nem o exsudato peritoneal, reduziu significativamente os níveis de MPO ($I_{max}=35\pm14$ e $47\pm13\%$, respectivamente para as doses de 30 e 100 mg/kg). A carragenina aumentou os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6. O tratamento com o ácido arjunólico diminuiu os níveis de TNF- α ($I_{max}=47\pm14\%$ na dose de 30 mg/kg, e $56\pm13\%$, na dose de 100 mg/kg) mas não alterou os níveis de IL-1 β e IL-6, enquanto o tratamento com dexametasona reduziu os níveis das três citocinas. Assim a atividade anti-inflamatória do ácido arjunólico provavelmente ocorre devido à inibição da migração de neutrófilos para o sítio inflamatório e reduzir a citocina pró-inflamatória TNF- α .

Palavras-chave: Inflamação. Produto natural. Triterpeno.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 27 |
| 1.1. INFLAMAÇÃO | 27 |
| 1.2. PRODUTOS NATURAIS – PLANTAS MEDICINAIS | 31 |
| 1.3. COMBRETUM LEPROSUM MART. & EICHER (COMBRETACEAE) | 32 |
| 1.4. ÁCIDO ARJUNÓLICO | 33 |
| 1.5. OBJETIVOS | 34 |
| 1.5.1. Objetivo Geral | 34 |
| 1.5.2. Objetivos Específicos | 34 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS | 35 |
| 2.1. MATERIAL BOTÂNICO: ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO ÁCIDO ARJUNÓLICO | 35 |
| 2.2. ANIMAIS | 36 |
| 2.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA | 36 |
| 2.3.1. Peritonite induzida pela injeção intraperitoneal de carragenina | 36 |
| 2.3.1.1. Contagem de leucócitos peritoneais | 37 |
| 2.3.1.2. Permeabilidade capilar peritoneal | 37 |
| 2.3.1.3. Ensaio de mieloperoxidase do fluido peritoneal | 37 |
| 2.3.1.4. Determinação dos níveis de citocinas do líquido peritoneal | 38 |
| 3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA | 38 |
| 4. RESULTADOS | 39 |
| 5. DISCUSSÃO | 45 |
| CONCLUSÃO | 49 |
| REFERÊNCIAS | 51 |

1 INTRODUÇÃO

1.1. INFLAMAÇÃO

Existem diversos sistemas e barreiras responsáveis pela defesa do nosso organismo contra agentes infecciosos. Dentre eles, destacam-se as barreiras naturais, como o epitélio; mecanismos inespecíficos, como os realizados por certos tipos de leucócitos e a febre; e os mecanismos específicos, como os realizados pelos anticorpos (VIVIER e MALISSEN, 2005).

O epitélio é a maior barreira de proteção frente a microorganismos, no entanto, quando o mesmo sofre uma lesão são desencadeados processos que levam a um quadro inflamatório. Este processo inflamatório é uma resposta do organismo a qualquer ação capaz de causar lesão celular ou tecidual. Além disso, esta resposta é comum a vários tecidos e é regulada por diversas substâncias, denominadas de mediadores químicos, que são produzidas pelas células lesionadas e pelo sistema imune que se encontram eventualmente nas proximidades da lesão (DELVES e ROITT, 2000).

O processo inflamatório começa quando diversas células residentes do tecido lesionado são ativadas por microorganismos ou estímulos nocivos, sejam físicos ou químicos. Assim, os diferentes leucócitos ativados participam desse processo desempenhando diferentes funções. Por outro lado, os mastócitos ativados degranulam e liberam mediadores inflamatórios, como também o fazem as outras células residentes e células endoteliais. Além disso, as células dendríticas e macrófagos fagocitam os patógenos e posteriormente, apresentam antígenos aos linfócitos T. Estes últimos, por sua vez, amplificam a resposta inflamatória e recrutam outras células, os eosinófilos e os basófilos. Todavia, os linfócitos B quando ativados, produzem anticorpos (DELVES e ROITT, 2000; VIVIER e MALISSEN, 2005).

Como foi colocado anteriormente, os leucócitos são um grupo heterógeno de células efectoras do sistema imune. Estas, quando encontradas no sangue, são chamadas comumente de glóbulos brancos, pois ao contrário dos eritrócitos ou glóbulos vermelhos, estas células não possuem nenhum tipo de pigmento. De acordo com a forma do seu núcleo, os leucócitos podem se dividir em polimorfonucleares, o que inclui os neutrófilos, eosinófilos e basófilos; e mononucleares que são os monócitos e linfócitos (SMITH, 1994).

Os mediadores inflamatórios liberados são moléculas solúveis e difusíveis que agem regulando as alterações vasculares, celulares e bio-

químicas no local da inflamação (HUERRE e GOUNON, 1996). Estas moléculas promovem os eventos do processo de inflamação, como a vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular e o recrutamento e ativação de leucócitos (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; VIVIER e MALISSEN, 2005; HUERRE e GOUNON, 1996).

Da mesma forma que as células que participam da inflamação, existem vários mediadores inflamatórios com ação e atuação em células alvo diferentes, podendo promover ou inibir a inflamação. Dentre estes, cabe destacar as citocinas, o óxido nítrico (NO), os componentes do sistema complemento e o produto da degranulação de mastócitos (histamina e serotonina). Existem ainda outras moléculas que possuem papel importante no processo inflamatório que são os mediadores peptídicos e lipídicos (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

As citocinas são pequenas proteínas que originalmente, eram chamadas de "linfocinas" e "monocinas" para indicar suas fontes celulares, mas posteriormente, foi adotado o termo "citocina", uma vez que quase todas as células nucleadas são capazes de sintetizá-las e, por sua vez, de responder a elas, mesmo que na maioria destas células, os genes de citocinas não sejam expressos, salvo sob algum estímulo nocivo (DINARELLO, 2000).

As citocinas são agrupadas em classes diferentes dependendo da sua atividade biológica. Desta forma, as citocinas que promovem a inflamação são chamadas de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 (Interleucina 1) e TNF (fator de necrose tumoral) que atuam na regulação de genes que geralmente não são expressos em tecidos saudáveis. Estes genes codificam enzimas que aumentam a síntese de fator ativador de plaquetas, além dos leucotrienos, prostanóides, NO e quimiocinas. Contudo, as citocinas que suprimem a atividade inflamatória de outras citocinas são chamadas de anti-inflamatórias. Esta dualidade de funções é fundamental para entender a biologia das citocinas e a complexidade dos casos clínicos onde estes processos estão alterados (DINARELLO, 2000; OPAL e DePALO, 2000).

Existem ainda citocinas que podem ter as duas funções. Por exemplo, IL-4, IL-10 e IL-13 são potentes ativadores de linfócitos B. No entanto, estas mesmas citocinas também são potentes anti-inflamatórios em virtude da sua capacidade de suprimir a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e TNF. Outro exemplo é a IL-6 que tem sido considerada como uma citocina pró-inflamatória, juntamente com TNF- α e IL-1 β , e é frequentemente utilizada como marcador de ativação sistêmica de citocinas pró-inflamatórias porque é uma potente indutora da resposta de proteínas no processo inflamatório agudo. Po-

rém, tem propriedades anti-inflamatórias, pois induz a síntese de glicocorticoides e promove a síntese e liberação de citocinas anti-inflamatórias ao mesmo tempo em que inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias. Portanto, um "equilíbrio" entre os efeitos de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é o que determina o resultado final (OPAL e DePALO, 2000).

Minutos após uma lesão, ocorre a vasodilatação de capilares, arteríolas e vênulas e, além disso, as células endoteliais sofrem retração. Tudo isto permite uma maior disponibilidade de mediadores e células inflamatórias, pois aumenta o fluxo sanguíneo local, permeabilidade vascular e há extravasamento de fluídos, proteínas e células (SMITH, 1994). Cerca de 50 a 60% dos leucócitos presentes no sangue são neutrófilos (SMITH, 1994), estas células são as primeiras a chegar e as mais abundantes no local da inflamação. Os neutrófilos são "guiados" desde as pequenas vênulas até o foco da inflamação pelo gradiente de concentração de moléculas quimiotáticas, chamadas quimiocinas cuja expressão é muito aumentada no tecido inflamado (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Os neutrófilos tem capacidade fagocitária e também liberam fatores citotóxicos no local da inflamação. Os grânulos citoplasmáticos desta célula possuem várias enzimas proteolíticas que podem causar a lise dos microorganismos presentes. Após isto, o neutrófilo finaliza seu ciclo entrando em apoptose (SMITH, 1994; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

No início do processo inflamatório atuam também algumas citocinas. A IL-1 e o TNF possuem atividade sinérgica, são indutores de moléculas de adesão endoteliais, que são essenciais para a adesão de leucócitos à superfície endotelial antes da emigração para os tecidos. Já as citocinas anti-inflamatórias bloqueiam este processo ou, pelo menos, diminuem a intensidade. As citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13 suprimem a produção de IL-1, TNF, quimiocinas como a IL-8 e moléculas de adesão vascular. (DINARELLO, 2000).

Entretanto, a processo inflamatório não passa despercebido, é caracterizado pela presença de vários sinais, como o calor, produzido pelo aumento do metabolismo celular; rubor ou vermelhidão, ocasionado pela hiperemia e vasodilatação; edema devido ao desequilíbrio entre a pressão hidrostática e osmótica e, dor por causa da ativação de nociceptores próximos ao local da inflamação.

Assim, a inflamação tem como finalidade direcionar fatores do plasma e células do sistema imunológico ao local da lesão, erradicar a infecção e reparar os tecidos lesionados. Porém, o processo inflamatório pode causar danos nos tecidos e até levar a perda da função devido a

todas as mudanças que ocorrem durante o processo. Além disso, a complexidade da resposta imune pode acarretar erros na sua regulação que podem estar ligados ou não a fatores genéticos. Por exemplo, devido à eficiência das citocinas, as suas atividades têm que ser rigorosamente controladas. As citocinas estão envolvidas no desencadeamento da resposta imune, indução de eventos inflamatórios agudos, mas também, a sua persistência caracteriza a inflamação crônica. Há evidências de que as citocinas TNF e IL-1 contribuem para a patogênese de doenças inflamatórias autoimunes, como artrite reumatoide e esclerose múltipla, e tem um papel importante em doenças como vasculites, aterosclerose e doenças inflamatórias intestinais, como a doença de Crohn e colite ulcerativa (BURGER e DAYER, 2002).

As particularidades de cada doença refletem a variedade de citocinas envolvidas em maior ou menor grau além das células do sistema imune que são reguladas por estas moléculas. Já que, a persistência de citocinas promove a ativação desenfreada de células do sistema imune, como neutrófilos e macrófagos além da produção de espécies reativas e oxigênio e nitrogênio como resultado do estresse provocado no tecido lesionado (BURGER e DAYER, 2002; DINARELLO, 2000).

O tratamento para os casos patológicos de inflamação é feito atualmente com dois grupos de fármacos, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e os esteroidais ou também chamados de glicocorticoides. Porém o uso terapêutico destes fármacos é limitado devido aos seus efeitos colaterais (BENSEN e BRIDGE, 1981).

Os AINEs são os anti-inflamatórios mais usados no mundo. Atualmente existem mais de 50 tipos no mercado, sendo que o mais conhecido é o ácido acetilsalicílico, o princípio ativo da aspirina. Na maioria das vezes, estes são consumidos sem receita médica como anti-inflamatório, antipirético e analgésico. Estão relacionados a uma gama de efeitos colaterais, como lesão gastrointestinal, inibição da função renal, hipersensibilidade e efeitos hematológicos em pacientes crônicos, e também podem ocasionar reações cutâneas, além de sangramento e anemia, pois bloqueia a agregação de plaquetas, e inibição da motilidade uterina (ROONEY *et al.*, 1978; BROWN e COLLINS, 1978; MILLER e JACOBSON, 1979; DUGGAN, 1980; BENSEN e BRIDGE, 1981, BLACK, 1986).

Os glicocorticoides são extensamente utilizados para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas. Os fármacos mais utilizados são a hidrocortisona, a prednisolona e a dexametasona. Este grupo de fármacos reduz a atividade de leucócitos, a fibrose e as células inflamatórias, inibe citocinas pró-inflamatórias e prostaglandinas característicos da

inflamação crônica. Porém, o seu uso prolongado resulta no desenvolvimento da síndrome de Cushing, também conhecido como hipercortisolismo, pois este grupo de drogas tem a capacidade de reduzir a captação de glicose, além de aumentar catabolismo e redistribuição da gordura (REID *et al.*, 1982).

1.2. PRODUTOS NATURAIS – PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de produtos naturais na terapêutica é uma prática muito antiga e está relacionado com a própria evolução do homem. De fato, este conhecimento foi passado ao longo de gerações, em conjunto com os mitos e rituais e formaram parte importante das culturas locais. Além disto, este conhecimento é baseado em experiências de erros e acertos e observação nos animais e também em homens. Desde então, a natureza constitui uma importante fonte de diversos elementos importantes para a sobrevivência. O uso dos produtos naturais como alimento sempre existiu, e a este se somou a busca de matéria-prima para confecção de roupas e ferramentas. Esta fonte, além de renovável, pode auxiliar na descoberta de novos medicamentos e, a partir da sua ação no organismo, pode ajudar também na compreensão de mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos (BALUNAS e KINGHORN, 2005; ITOKAWA *et al.*, 2008; BEGHYN *et al.*, 2008; LORENZI e MATOS, 2002).

Dentro desse contexto, as plantas sempre ocuparam um lugar importante. A observação das variações sazonais mostradas pela flora provocou deslumbramento e criou um respeito místico às plantas. Logo aquelas plantas com propriedades alucinógenas foram incorporadas aos rituais religiosos, e lhes foram atribuídas propriedades mágicas de colocar os homens em contato com os deuses (LORENZI e MATOS, 2002). Os sacerdotes sumerianos eram considerados representantes de Deus ou ainda deuses da morte, pois utilizavam o ópio extraído da papoula (*Papaver somniferum*) em seus rituais e para aliviar a dor em doentes agonizantes. Posteriormente, o papiro de Ebers (1500 a.C.) descreve um “remédio para acabar com o choro de crianças” feito a partir da mesma papoula (BROWNSTEIN, 1993).

Na atualidade, é estimado que ao redor de 65 a 80% da população de países em desenvolvimento utiliza plantas como primeiro tratamento devido à pobreza e falta de acesso aos medicamentos modernos (CALIXTO, 2000).

Ainda assim, os dados que existem sobre as plantas consideradas como medicinais pela população não garantem sua eficácia, qualidade e segurança. Desta forma, na atualidade, vem se evidenciando um aumen-

to do estudo de plantas medicinais para validar sua utilização como fitoterápico (CALIXTO, 2000), como também, na busca do desenvolvimento de fármacos ou terapias com resultado terapêutico satisfatório e com efeitos adversos reduzidos (NIEDERBERGER *et al.*, 2008). A tudo isto se soma a preocupação crescente com a biodiversidade e a ideia de desenvolvimento sustentável e de uma vida mais natural, o que despertou novamente um interesse geral na fitoterapia.

É digno de nota que existe uma diversidade enorme de plantas usadas pela população, sendo que estas não se restringem apenas a um grupo taxonômico e os conhecimentos sobre seu uso são normalmente passados de geração a geração pelas comunidades locais. Dentre essas plantas medicinais, as espécies da família Combretaceae estão em destaque devido a sua ampla utilização e distribuição.

1.3. COMBRETUM LEPROSUM MART. & EICHER (COMBRETA-CEAE)

Os membros da família Combretaceae são fonte de metabólitos com atividade biológica importante, incluindo a atividade antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória, anti-helmíntica e contra esquistossomose. Estas plantas são utilizadas na medicina popular na África e na Índia para o tratamento de dor abdominal, nas costas, de ouvido, de cabeça, de dente, além de esquistossomose, tosse, dismenorréia, ancilostomíase, inchaço causado pela caxumba, hanseníase, resfriado, conjuntivite, febre, infertilidade feminina, pneumonia, mordida de escorpião e cobra, sífilis e fraqueza geral (FACUNDO *et al.*, 2008).

A família Combretaceae é constituída por 18 gêneros, sendo que o maior deles é o gênero *Combretum* com cerca de 370 espécies que ocorrem em regiões tropicais e subtropicais e são utilizadas na medicina popular (McGAW *et al.*, 2001).

Combretum leprosum Mart. & Eicher é um arbusto nativo do Brasil e é conhecido popularmente como mofumbo ou cipoaba. Esta planta é amplamente distribuída na Caatinga brasileira, compreendendo as regiões Norte e Nordeste (FACUNDO *et al.*, 2005; FACUNDO *et al.*, 2008). Esta espécie é utilizada pela população local na forma de infusões das partes aéreas e raízes para o tratamento de hemorragias, como sedativo, cicatrizante, antiofídico e antitussígeno (FACUNDO *et al.*, 2005).

Estudos fitoquímicos permitiram o isolamento e caracterização de vários metabólitos presentes em *C. leprosum* com atividade biológica. Entre estes podemos citar os flavonóides 3-o-metilquercetina e 3-o- α -

metilquercetina, e os triterpenos $2\alpha,3\beta,23$ -trihidroxilup-20(29)-ene (TTHL), ácido arjunólico e o ácido mólico (FACUNDO *et al.*, 2005).

1.4. ÁCIDO ARJUNÓLICO

O ácido $2\alpha,3\beta,23$ -trihidroxiolean-12-en-28-oico foi batizado como ácido arjunólico por ter sido isolado pela primeira vez a partir da espécie *Terminalia arjuna* Wight & Arn. Esta planta, conhecida popularmente como arjuna, é amplamente utilizada na medicina popular indiana devido a sua atividade cardioprotetora (DWIVEDI, 2007).

De acordo com sua estrutura química, o ácido arjunólico é classificado como uma saponina triterpênica. De modo geral, as saponinas são substâncias de elevada massa molecular e, na natureza, são encontradas formando complexas misturas o que dificulta sua identificação e isolamento. É devido a isto que os conhecimentos sobre a química e propriedades biológicas são recentes e foram possíveis graças à evolução das técnicas cromatográficas e espectroscópicas (SCHENKEL *et al.*, 2003).

As propriedades biológicas das saponinas triterpênicas vão ao encontro com o uso popular das plantas ricas nestas moléculas. Já em 1971 foi observada a propriedade de formar complexos com o colesterol, também, foi descrita a atividade anti-inflamatória de uma grande diversidade de saponinas, assim como seu efeito antitussígeno, dentre muitos outros efeitos. Cabe destacar que muitas destas propriedades foram detectadas em testes *in vitro*, poucos compostos formam testados em modelos animais, ou apenas foi feita uma avaliação preliminar. Isto quer dizer que ainda é longo o caminho a se trilhar para propiciar o desenvolvimento de aplicações terapêuticas de fato (SCHENKEL *et al.*, 2003).

Estudos prévios demonstraram que o extrato etanólico das partes aéreas e das raízes, assim como o ácido arjunólico obtido de *C. leprosum* apresentam significativo efeito antinociceptivo e anti-inflamatório (PIETROVSKI *et al.*, 2006; FACUNDO *et al.*, 2005). Dados na literatura corroboram o efeito antifúngico, antidiabético e antioxidante do ácido arjunólico isolado de diferentes plantas (HEMALATHA *et al.*, 2010). Dentre os possíveis mecanismos envolvidos no efeito antioxidante e antidiabético do ácido arjunólico, são encontradas vias comuns a mecanismos anti-inflamatórios (MANNA *et al.*, 2009). Porém não existem resultados descrevendo melhor o efeito deste composto em relação à ação anti-inflamatória, os mecanismos de ação e os efeitos adversos relacionados a seu uso.

Neste sentido, além da necessidade de se encontrar novos fármacos mais potentes e eficazes, o objetivo principal do presente estudo é analisar o efeito anti-inflamatório do ácido arjunólico, isolado de *C. leprosum*, utilizando um modelo de inflamação aguda in vivo.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. Objetivo Geral

Investigar a ação do triterpeno, ácido arjunólico, isolado de *Combretum leprosum* sobre os parâmetros inflamatórios induzidos por carragenina em camundongos, bem como os possíveis mecanismos envolvidos neste efeito.

1.5.2. Objetivos Específicos

- Investigar o possível efeito do ácido arjunólico sobre a peritonite induzida pela administração de carragenina (i.p.).
- Avaliar a migração de células inflamatórias, assim como o extravasamento plasmático na cavidade peritoneal decorrente da peritonite induzida pela carragenina.
- Investigar alguns dos mecanismos envolvidos com o efeito anti-inflamatório do ácido arjunólico, como na produção de citocinas (IL-1 β , TNF- α e IL-6) e a presença da enzima mieloperoxidase como indicativo indireto da presença de neutrófilos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAL BOTÂNICO: ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO ÁCIDO ARJUNÓLICO

Os espécimes de *Combretum leprosum* foram coletados em Co-calzinho-Viçosa, estado do Ceará, Brasil. A espécie foi identificada pelo Prof. Afrânio Fernandes (Universidade Federal do Ceará) em maio de 2001 e um exemplar encontra-se catalogado (n.12446) no Herbário Prisco Bezerra no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. A obtenção do extrato etanólico, assim como o isolamento, a purificação e a identificação dos compostos isolados de *C. leprosum* foram realizados pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Valdir Alves Facundo, do Departamento de Química da Universidade Federal de Rondônia. Primeiramente as flores foram secas e trituradas, e então submetidas à extração com etanol a temperatura ambiente. Foram realizadas três extrações sucessivas, utilizando 5 litros de etanol em cada extração, e então o produto foi submetido à destilação do solvente sob pressão reduzida, fornecendo 58,3 g de extrato.

Parte do extrato etanólico obtido nessa primeira etapa foi submetido a um fracionamento em coluna filtrante, utilizando como adsorvente sílica gel e tendo como fases solventes: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, obtendo-se assim as respectivas frações. A fração clorofórmio foi então submetida à cromatografia em coluna de sílica gel, tendo como fase fixa gel H da Merck e como fase móvel uma mistura de hexano e acetato de etila em polaridade crescente. Em quatro frações (27-30), extraídas com hexano: acetato de etila (3:7) foi observado a presença de um precipitado branco, através de recristalização com éter etílico foi feita a purificação da substância identificada por métodos químicos e espectroscópicos como sendo o triterpeno ácido arjunólico (Figura 1) (FACUNDO *et al.*, 1993).

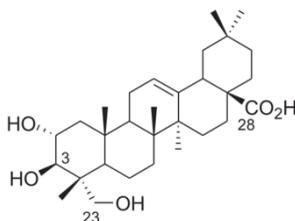


Figura 1. Ácido arjunólico extraído de *Combretum leprosum* (FACUNDO *et al.*, 2003).

2.2. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos do tipo Swiss, adultos (30-40 g), de ambos os sexos, obtidos do Biotério Central da UFSC, aclimatados a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, em um ciclo de 12h claro/12h escuro (luzes acesas às 7h), com água e ração *ad libitum*. Os protocolos dos experimentos foram previamente aprovados pela CEUA (Comissão de ética no uso de animais) sob número PP00562/UFSC (protocolo: 23080.040942/2010-63). Os animais foram mantidos no laboratório 1h antes da realização dos experimentos para aclimação, sendo que todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas internacionais para o estudo com animais de laboratório, e o número de animais e a intensidade do estímulo nocivo usados foram o mínimo necessário para demonstrar efeitos consistentes nos tratamentos (ZIMMERMANN, 1983).

2.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

2.3.1. Peritonite induzida pela injeção intraperitoneal de carragenina

A peritonite foi induzida por meio de injeção intraperitoneal (i.p.) de carragenina (750 μg /0,5 ml) dissolvido em salina estéril (PAGANO *et al.*, 2002). Os animais do grupo controle receberam injeção intraperitoneal com o mesmo volume de uma solução salina (0,9% NaCl) e foram pré-tratados com solução salina (10 ml/kg). É possível produzir a resposta inflamatória aguda 4h depois da injeção i.p. de carragenina em camundongos.

Os animais foram tratados 1h antes da injeção de carragenina com ácido arjunólico (10, 30 ou 100 mg/kg) via oral (v.o.). O grupo controle positivo foi pré-tratado com um anti-inflamatório esteroidal, a Dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) 0,5h antes da injeção de carragenina (MONTANHER *et al.*, 2007). Sendo que cada grupo é formado de 6 a 8 animais (n).

Os animais foram sacrificados por asfixia utilizando CO₂ (HEINE, 1965) 4h após a indução da peritonite e o exsudato foi coletado para posteriores análises. O exsudato contaminado com sangue foi descartado.

2.3.1.1. Contagem de leucócitos peritoneais

A cavidade peritoneal foi aberta e lavada com 1 ml de tampão fosfato estéril (PBS), contendo heparina (20 μ I/ml). A contagem total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, após diluição do líquido peritoneal com solução de Türk (1:20). As células peritoneais foram citocentrifugadas em lâminas usando um Cytospin (Tharmac, Alemanha) e coradas com May-Grünwald Giemsa para contagem diferencial de leucócitos (MONTANHER *et al.*, 2007).

2.3.1.2. Permeabilidade capilar peritoneal

Antes da injeção de carragenina (i.p.), os camundongos foram anestesiados por inalação de isoflurano (1-2%) e uma solução de corante azul de Evans (25 mg/kg), utilizado como marcador de permeabilidade capilar peritoneal, foi injetada por via intravenosa. Uma amostra do líquido coletado (500 μ l) a partir do espaço peritoneal foi separada e armazenada em freezer (-20°C) para determinar a concentração de corante de azul de Evans. A quantidade de azul de Evans extravasado foi medida utilizando espectrofotômetro a 620 nm. A permeabilidade capilar peritoneal induzida por carragenina foi expressa em termos de corante (Densidade Ótica (DO)/ml), que vazou na cavidade peritoneal por interpolação a partir da curva padrão de azul de Evans na faixa de 5-100 mg/ml.

2.3.1.3. Ensaio de mieloperoxidase do fluido peritoneal

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no líquido peritoneal, um indicador de acumulação de neutrófilos, foi avaliado 4h após a indução da peritonite pela carragenina em camundongos (MONTANHER *et al.*, 2007; FRÖDE e MEDEIROS, 2001). O exsudado foi centrifugado a 20.000 g por 30min a 4°C. Uma alíquota foi colocada para reagir com uma solução de HCl 1,6mM tetrametilbenzidina em dimetilformamida e peróxido de hidrogênio 0,1 mM em placas de 96 poços. As placas foram incubadas a 37°C por 3 minutos, e então a reação foi interrompida pela adição de acetato de sódio (1,46 M, pH 3,0). Atividade de MPO foi estimada por meio de medições colorimétricas usando um leitor de placas (BMG Labtec, Alemanha), definido como medida de absorbância a 620 nm, e expressos em DO/ml. As amostras de líquido peritoneal dos animais foram coletadas e processadas imediatamente para analisar os níveis de MPO.

2.3.1.4. Determinação dos níveis de citocinas do líquido peritoneal

Após a indução da peritonite por carragenina, o líquido peritoneal dos camundongos foi usado para avaliar os níveis de citocinas por imunoenensaio de enzima (ELISA) (MIZGERD *et al.*, 2001). Alíquotas de 100 µl foram usadas para medir os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 utilizando kits de ELISA de R & D Systems (Minneapolis, E.U.A.) de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância de todas as citocinas estudadas foi medida usando um leitor de microplacas a 450 e 550 nm.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média + erro padrão da média (EPM), exceto as DI50 (doses do composto isolado capazes de reduzir 50% da resposta nociceptiva quando comparado com o grupo controle), que são apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança em nível de 95%. As DI50 foram estimadas a partir de experimentos individuais utilizando o método de regressão não-linear. A análise estatística entre os grupos do experimento foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA de uma via) seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. O valor $P < 0,05$ foi considerado como indicativo de significância. Foi utilizado o software GraphPad Prism versão 5.0 (San Diego, CA: 2008).

4. RESULTADOS

Visando estudar o efeito do composto em um dos componentes do processo inflamatório, a migração leucocitária, o ácido arjunólico foi avaliado no teste da peritonite induzida por carragenina. Os resultados representados na figura 2A mostram que o tratamento com o ácido arjunólico (v.o.) nas doses de 30 e 100 mg/kg, produziu uma redução na migração leucocitária para a cavidade peritoneal de 53 ± 6 e de $54\pm 5\%$, respectivamente para cada dose, e o DI50 foi de 49 (23,13 – 105,2) mg/kg.

A redução na migração leucocitária foi representada principalmente por uma diminuição na migração de polimorfonucleares (figura 2B) com inibição de $52\pm 8\%$ para a dose de 30 mg/kg e de $55\pm 14\%$ para a dose de 100 mg/kg, sendo que o DI50 neste caso foi de 55 (14,53 – 210,9) mg/kg. Estes resultados são semelhantes aos obtidos após o tratamento com o controle positivo dexametasona (0,5 mg/kg) que inibiu em $58\pm 5\%$ a migração de leucócitos totais e $64\pm 8\%$, a migração de polimorfonucleares (figura A e B).

Contudo, o tratamento com o ácido arjunólico não foi capaz de reduzir a migração de mononucleares (figura 2C), nem a exsudação plasmática induzida pela carragenina (figura 3), resultado diferente do controle positivo dexametasona, que foi capaz de inibir a migração de mononucleares, assim como a exsudação plasmática para o sítio inflamatório.

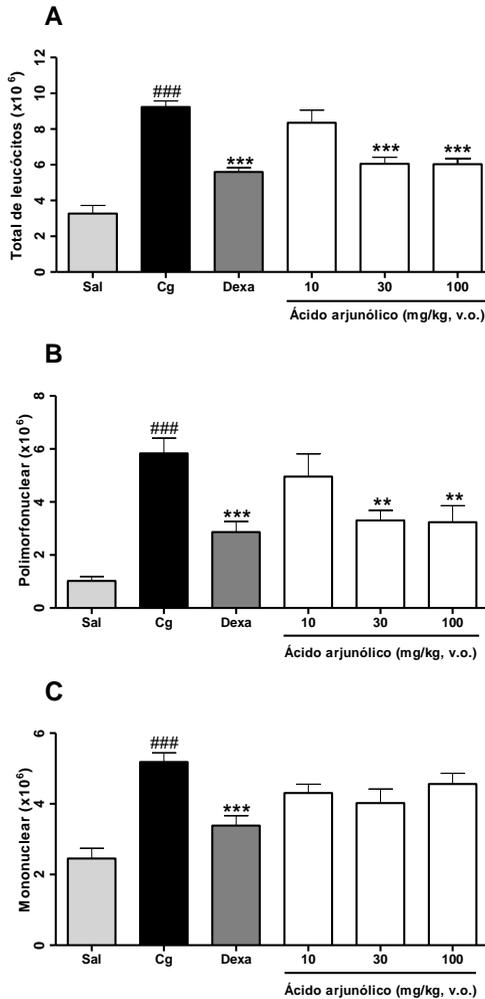


Figura 2. Efeito do ácido arjunólico (10, 30 e 100mg/kg, v.o.) e da dexametasona (Dexa, 0,5 mg/kg) sobre a migração de leucócitos (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C) induzida pela injeção i.p. de carragenina (750 $\mu\text{g}/0,5\text{ml}$). Os valores estão representados pela média + EPM. A comparação entre os grupos ($n=6$ a 8 animais) foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. A diferença entre os grupos está representada como ### $P<0,001$, comparado ao grupo salina (Sal); ** $P<0,01$ e *** $P<0,001$, comparado ao grupo controle (Cg).

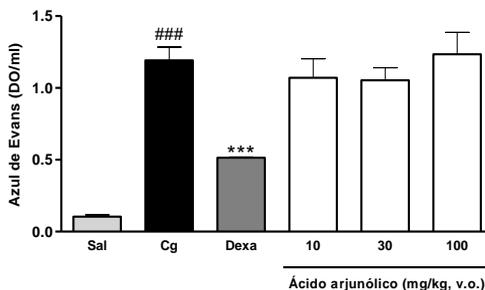


Figura 3. Efeito do ácido arjunólico (10, 30 e 100mg/kg, v.o.) e da dexametasona (Dexa, 0,5 mg/kg) sobre a exsudação plasmática para o sítio da inflamação induzida pela injeção i.p. de carragenina (750µg/0,5ml). O azul de Evans (25mg/kg, i.v.) foi utilizado como marcador de permeabilidade vascular. Os valores estão representados pela média + EPM. A comparação entre os grupos (n=6 a 8 animais) foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. A diferença entre os grupos está representada como ###P< 0,001, comparado ao grupo salina (Sal); ***P<0,001, comparado ao grupo controle (Cg).

A peritonite induzida pela injeção de carragenina aumentou a presença da enzima mieloperoxidase (MPO) na cavidade peritoneal, o que indica, de forma indireta, o acúmulo de neutrófilos, quando comparado aos valores do grupo de animais tratados apenas com salina. O pré-tratamento com as doses de 30 e 100 mg/kg do ácido arjunólico (v.o.), 1h antes da indução da peritonite, reduziu significativamente a presença da MPO com inibição de 35±14 e 47±13%, respectivamente. Neste caso, o efeito do ácido arjunólico não foi tão efetivo como a dexametasona (figura 4).

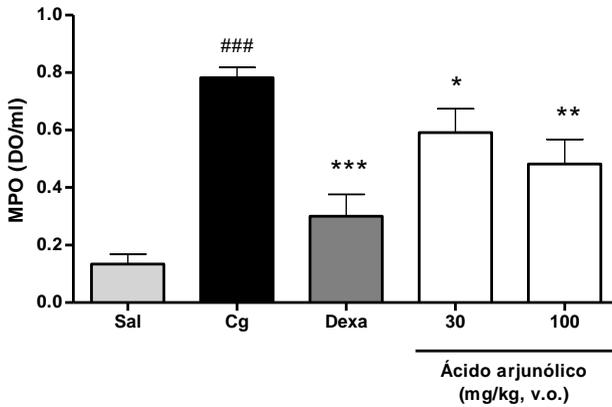


Figura 4. Efeito do ácido arjunólico (30 e 100mg/kg, v.o.) e da dexametasona (Dexa, 0,5 mg/kg) sobre os níveis da enzima MPO na cavidade peritoneal induzida pela injeção de carragenina (750 μ g/0,5ml, i.p.). A comparação entre os grupos (n=6 a 8 animais) foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. Diferente do grupo controle para *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001. Diferente para o grupo salina para ###P<0,001.

A injeção de carragenina também aumentou os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 no peritônio dos animais (figuras 5A-C). A dexametasona inibiu significativamente os níveis destas três citocinas em 66 \pm 8, 49 \pm 13, e 59 \pm 13%, respectivamente. O tratamento com o ácido arjunólico diminuiu os níveis de TNF- α em 47 \pm 14% na dose de 30 mg/kg, e 56 \pm 13%, na dose de 100 mg/kg, (figura 5B), mas não alterou os níveis de IL-1 β e IL-6 (figuras 5A e C).

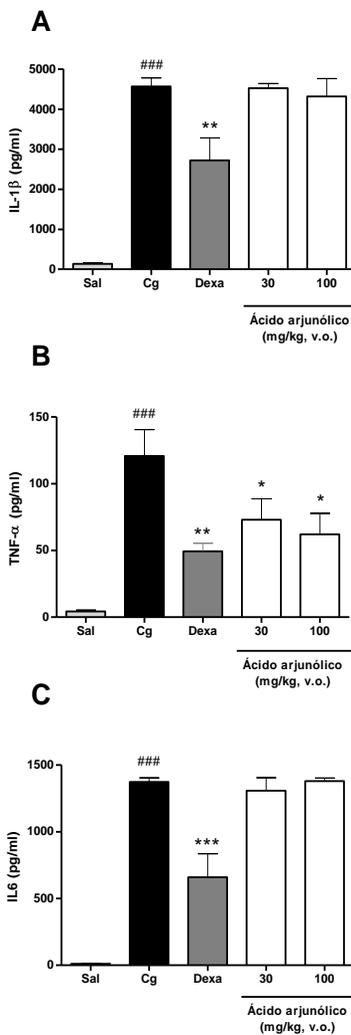


Figura 5. Efeito do ácido arjunólico (30 e 100mg/kg, v.o.) e da dexametasona (Dexa, 0.5 mg/kg) sobre os níveis de TNF- α (A), IL-1 β (B) e IL-6 (C) induzidos pela injeção de carragenina (750 μ g/0,5ml, i.p.). Os valores estão representados pela média + EPM. A comparação entre os grupos (n=6 a 8 animais) foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. A diferença entre os grupos está representada como ^{###}P<0,001, comparado ao grupo salina (Sal); ^{*}P<0,05, ^{**}P<0,01 e ^{***}P<0,001, comparado ao grupo controle (Cg).

5. DISCUSSÃO

As propriedades terapêuticas do ácido arjunólico descritas na literatura, não incluem algum tipo de efeito anti-inflamatório. No entanto, encontram-se evidências sinalizando um possível efeito do ácido arjunólico atuando sobre a inflamação em alguns trabalhos sem, contudo, estabelecer uma relação concisa entre ácido arjunólico e inflamação (HEMALATHA *et al.*, 2010; PIETROVSKI *et al.*, 2006; FACUNDO *et al.*, 2005).

Visto que clinicamente há uma escassez de produtos realmente eficazes e com poucos efeitos adversos no combate à inflamação, um composto natural que atue nesse sentido tem potencial considerável no tratamento de doenças inflamatórias.

Desta forma, a fim de pesquisar o possível efeito anti-inflamatório do ácido arjunólico, optou-se por utilizar o modelo de peritonite induzido por carragenina. A carragenina é uma mistura de polisacarídeos derivados de algas marinhas, sendo um dos irritantes não específicos mais amplamente utilizados para a indução e estudo da inflamação aguda, principalmente para o desenvolvimento de drogas com ação anti-inflamatória. Além disso, na cavidade peritoneal, a administração de carragenina promove um aumento do número de leucócitos, especialmente de neutrófilos, que migram para o local da inflamação. Paralelamente, permite a quantificação e correlação da migração celular com o aumento do exsudato inflamatório (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

Na fase inicial do processo inflamatório, os neutrófilos são reconhecidamente um dos principais componentes celulares presentes no sítio inflamatório. Estas células podem migrar para o sítio inflamatório e liberar enzimas proteolíticas, espécies reativas de oxigênio e outros mediadores pró-inflamatórios (GILROY *et al.*, 2004). A atividade da mieloperoxidase é um marcador indireto da atividade neutrofílica implicada na migração celular, associada ao óxido nítrico (MONTANHER *et al.*, 2007). O aumento da MPO é um importante indicativo da progressão do processo inflamatório.

O tratamento com o ácido arjunólico foi capaz de reduzir intensamente o número total de leucócitos na cavidade peritoneal. Além disso, diminuiu o número de polimorfonucleares, ou seja, reduziu o número de neutrófilos no local do processo inflamatório, fato confirmado pela análise da atividade da mieloperoxidase no exsudato peritoneal. Esses dados em conjunto, demonstram a atividade anti-inflamatória do ácido arjunólico e nos permite propor que um dos mecanismos envolvidos nes-

sa atividade anti-inflamatória é a inibição do influxo de neutrófilos para o sítio inflamatório. Entretanto, o ácido arjunólico não foi capaz de reverter a exudação plasmática o que sugere que possivelmente a ação deste triperpeno é posterior ao extravazamento plasmático ou envolve mecanismos independentes.

Muitos mediadores inflamatórios estão envolvidos com a resposta do organismo a agentes infecciosos e/ou inflamatórios. Dentre esses mediadores, as citocinas tem papel fundamental na regulação e manutenção do processo inflamatório. O TNF- α é considerado uma citocina inflamatória protótipo, devido seu papel de iniciar a cascata de ativação de outras citocinas (IL-1 β , IL-16 e IL-8), sendo que o ponto final da cascata resulta na ativação da ciclooxigenase-2 (COX-2) (SOMMER e KRESS, 2004). Observamos que o tratamento prévio com o ácido arjunólico reduz significativamente os níveis da citocina inflamatória TNF- α induzido pela carragenina. Esses resultados sugerem que esse triterpeno pode estar interferindo direta ou indiretamente com a ação do TNF- α atuando no início da cascata inflamatória e, portanto, explicando ao menos em parte, a redução da inflamação com o tratamento do ácido arjunólico.

Atualmente, os antagonistas do TNF- α são bastante utilizados como tratamento para várias doenças inflamatórias. Porém, o uso destes antagonistas está associado ao aumento do risco de infecções e neoplasias. Esta citocina também participa dos mecanismos de homeostase do ferro, sendo que considera-se um fator protetor o seqüestro de ferro mediado pelo TNF- α (VUJANOVIC, 2011; GHIO e WEINBERG, 2011). Os antagonistas de TNF- α em uso, porém controlados, se dividem em duas classes: anticorpos monoclonais (ou fragmentos de anticorpos) e receptores solúveis (WALLIS, 2011). A terapia baseada na administração de anticorpos monoclonais pode resultar na produção de anticorpos anti-anticorpos pelo organismo. Os tratamentos com essas drogas podem levar a eventos adversos indesejáveis (KRIECKERT *et al.*, 2010). Portanto, como o ácido arjunólico pode atuar como um bloqueador e/ou antagonista de TNF- α , inibindo seu efeito sobre a cascata inflamatória, esse triterpeno é uma interessante ferramenta para futuras drogas comercializáveis.

O pré-tratamento dos animais com dexametasona inibiu significativamente a resposta inflamatória induzida pela carragenina, de maneira similar ao efeito encontrado com o tratamento com o ácido arjunólico. Esse corticóide exógeno também foi capaz de inibir de forma significativa o influxo de leucócitos, principalmente de polimorfonucleares, para a cavidade peritoneal. Apesar do efeito anti-inflamatório similar, a de-

xamentasona foi capaz de reduzir os níveis de todas as citocinas inflamatórias avaliadas (TNF- α , IL-1 β e IL6), diferentemente do ácido arjunólico que reduziu apenas os níveis de TNF- α no líquido peritoneal.

Neste contexto, estes resultados podem servir como embasamento científico validando o conhecimento etnofarmacológico acerca do uso popular de *C. leprosum*, e mais especificamente, do triterpeno isolado desta planta. Assim, o ácido arjunólico pode tornar-se uma molécula de interesse para o desenvolvimento de fármacos terapêuticamente úteis para o tratamento da inflamação. Visto que parte do efeito do triterpeno ocorre pela redução da citocina TNF- α , alvo de grande interesse para o tratamento de doenças inflamatórias.

Cabe destacar a necessidade de mais estudos principalmente para garantir seu uso seguro, além de conhecer mais detalhadamente seu mecanismo de ação, farmacocinética e farmacodinâmica.

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que:

- O ácido arjunólico produziu uma redução na migração leucocitária para a cavidade peritoneal induzida pela carragenina, sendo que a redução na migração leucocitária foi representada principalmente por uma diminuição na migração de polimorfonucleares, mas não interferiu na migração de mononucleares nem na exsudação plasmática;

- O ácido arjunólico reduziu significativamente a presença da MPO na cavidade peritoneal induzida pela carragenina;

- O ácido arjunólico diminuiu os níveis de TNF- α , mas não alterou os níveis de IL-1 β e IL-6.

Em síntese, o presente trabalho demonstrou que o ácido arjunólico isolado de *C. leprosum* apresenta importante efeito anti-inflamatório no modelo de peritonite induzida por carragenina. O mecanismo de ação não está completamente elucidado, entretanto, neste estudo foi demonstrado que o composto pode modular a participação de neutrófilos e TNF- α , fatores importantes no processo inflamatório, como demonstrado na figura 6. Assim, o ácido arjunólico pode ser uma molécula de interesse para o desenvolvimento de fármacos úteis para a intervenção e controle da inflamação.

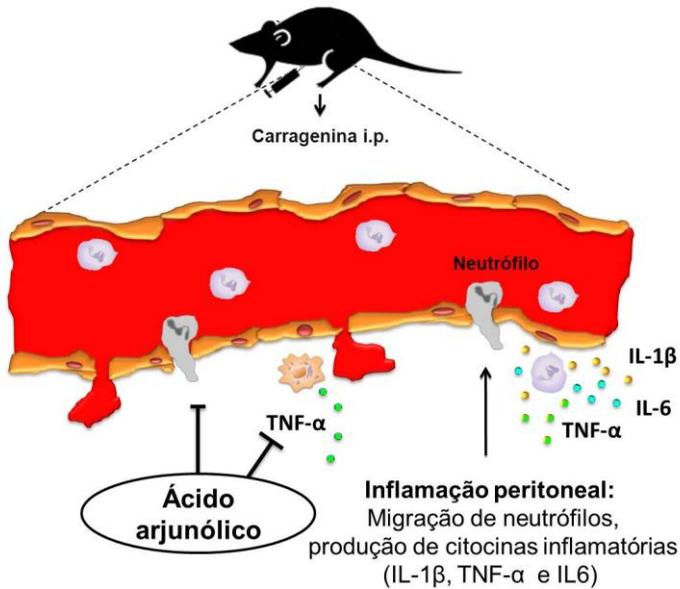


Figura 6. Esquema da ação do ácido arjunólico isolado de *Combretum leprosum* sobre o modelo de peritonite induzida pela injeção de carragenina (750 $\mu\text{g}/0,5\text{ml}$, i.p.). A inflamação peritoneal induzida pela carragenina é caracterizada pela migração de neutrófilos e produção de citocinas inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-6). O pré-tratamento com ácido arjunólico (v.o.) reduz a liberação da citocina TNF- α e a migração de neutrófilos no local da inflamação.

REFERÊNCIAS

- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. **Drug Discovery from medicinal plants**. *Life Sci.* 78:431-441. 2005.
- BEGHYN, T.; DEPREZ-POULAIN, R.; WILLAND, N.; POLLEAS, B.; DEPREZ, B. **Natural compounds: leads or ideas? Bioinspired molecules for drug discovery**. *Chem. Biol. Drug Des.* 72:3-15. 2008.
- BENSEN, W. G.; BRIDGE, M. A. Which anti-inflammatory? *Can. Fam. Phys.* 27:271-275. 1981.
- BLACK, H. E. **Renal toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs**. *Toxicol. Pathol.* 14:83. 1986.
- BROWN, K. A.; COLLINS, A. J. **In vitro effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human polymorphonuclear cells and lymphocyte migration**. *Br. J. Pharmac.* 64:347-352. 1978.
- BROWNSTEIN, M. J. **A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 5391-5393. 1993.
- BURGER, D.; DAYER, J. M. **Cytokines, acute-phase proteins, and hormones IL-1 and TNF- α production in contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes**. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 966: 464-473. 2002.
- CALIXTO, J. B. **Efficacy, safety, quality, control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents)**. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33: 179-189. 2000.
- DELVES, P. J.; ROITT, I. M. **The immune system. First of two parts**. *N. Engl. J. Med.* 343(1):37-49. 2000.
- DINARELLO, C. A. **Proinflammatory cytokines**. *Chest.* 118:503-508. 2000.
- DWIVEDI, S. ***Terminalia arjuna* Wight & Arn. A useful drug for cardiovascular disorders**. *J. Ethnopharmacol.* 114:114-129. 2007.

FACUNDO, V. A.; ANDRADE, C. H.; S. SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R.; HUFFORD, C. D. **Triterpenes and flavonoids from *Combretum leprosum***. Phytochem. 32: 411-415. 1993.

FACUNDO, V. A.; RIOS, K. A.; MOREIRA, L. S.; MILITÃO, J. S. L. T.; STABELLI, R. G.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E. R. **Two new cycloartanes from *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae)**. Rev. Latinoamer. Quím. 36(3):76-82. (2008).

FACUNDO, V. A.; RIOSA, K. A.; MEDEIROS, C. A.; MILITÃO, J. S. L. T.; MIRANDA, A. L. P.; EPIFANIO, R. A.; CARVALHO, M. P.; ANDRADE, A. T. ; PINTO, A. C.; REZENDE, C. M. **Arjunolic acid in the ethanolic extract of *Combretum leprosum* root and its use as a potential multi-functional phytomedicine and drug for neurodegenerative disorders: anti-inflammatory and anticholinesterasic activities**. J. Braz. Chem. Soc. 16(6B):1309-1312. 2005.

FRÖDE, T. S.; MEDEIROS, Y. S. **Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy**. Mediators. Inflamm. 10(4):223–227. 2001.

GHIO, A. J.; WEINBERG, E. D. **Complications of TNF- α antagonists and iron homeostasis**. Med. Hyp. doi:10.1016/j.mehy.2011.09.035. 2011.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. **Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery**. Nat. Rev. 3:104-106. 2004.

HEINE, W. **Basic principles of the modern care of experimental animals**. Med. Welt. 11:2834–2835. 1965.

HEMALATHA, T.; PULAVENDRAN, S.; BALACHANDRAN, C.; MANOHAR, B. M.; PUVANAKRISHNAN, R. **Arjunolic acid: a novel phytomedicine with multifunctional therapeutic applications**. Indian. J. Exp. Biol. 48(3):238-47. 2010.

HUERRE, M. R.; GOUNON, P. **Inflammation: patterns and new concepts**. Res. Immunol. 147:417-34. 1996.

ITOKAWA, H.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; AKIYAMA, T.; LEE, K. H. **Plan-derived natural product research aimed at new drug discovery.** J. Nat. Med. 62:263–280. 2008.

J.M. DUGGAN. **Gastrointestinal toxicity of minor analgesics.** Br. J. Clin. Pharmacol. 10:407S-410S. 1980.

KRIECKAERT, C. L. M.; BARTELD, G. M.; LEMS, W. F.; WOLBINK, G. J. **The effect of immunomodulators on the immunogenicity of TNF-blocking therapeutic monoclonal antibodies: a review.** Arthr. Res. Ther. 12:217. 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas.** Inst. Plantarum. Nova Odessa, SP. Brasil. 2002.

MANNA, P.; SINHA, M.; SIL, P. C. **Protective role of arjunolic acid in response to streptozotocin-induced type-I diabetes via the mitochondrial dependent and independent pathways.** Toxicol. 257:53–63. 2009.

McGAW, L. J.; RABE, T.; SPARG, S. G.; JAGER, A. K.; ELOFF, J. N.; VAN STADEN, J. **An investigation on the biological activity of *Combretum* species.** J. Ethnopharmacol., 75: 45-50. 2001.

MILLER, T. A.; JACOBSON, E. D. **Gastrointestinal cytoprotection by prostaglandins.** Gut. 20:75-87. 1979.

MIZGERD, J. P.; SPIEKER, M. R.; DOERSCHUK, C. K. **Early response cytokines and innate immunity: essential roles for TNF receptor 1 and type 1 IL-1 receptor during *Escherichia coli* pneumonia in mice.** J. Immunol. 166:4042–4048. 2001.

MONTANHER, A. B.; ZUCOLOTTO, S. M.; SCHENKEL, E. P.; FRODE, T. S. **Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model.** J. Ethnopharmacol. 109:281–8. 2007.

NIEDERBERGER, E.; KÜHLEIN, H.; GEISSLINGER, G. **Update on the pathobiology of neuropathic pain.** Expert. Rev. Proteomics. 5(6):799-818. 2008.

OPAL, S. M.; DePALO, V. A. **Anti-inflammatory cytokines.** Chest. 117:1162-1172. 2000.

PAGANO, R. L.; DIAS, M. A. A.; DALE, C. S.; GIORGI, R. **Neutrophils and the calcium-binding protein MRP-14 mediate carrageenan-induced antinociception in mice.** Med. Inflamm. 11:203-210. 2002.

PIETROVSKY, E. F.; ROSA, K. A.; FACUNDO, V. A.; RIOS, K.; MARQUES, M. C.; SANTOS, A. R. S. **Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3 β , 6 β , 16 β - tridroxilup-20(29)-eno obtained from flowers of *Combretum leprosum* in mice.** Pharmacol. Biochem. Behav. 83:90-99. 2006.

REID, D. M.; KENNEDY, N. S. J.; SMITH, M. A.; TOTHILL, P.; NUKI, G. **Total body calcium in rheumatoid arthritis: effects of disease activity and corticosteroid treatment.** Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.). 285(6338):330-332. 1982.

ROONEY, P. J.; CAPELL, H. A.; PATERSON, S.; BUCHANAN, W. W.; DICK, W. C. **Continued use of non-steroidal anti-inflammatory drugs: an index of clinical efficacy.** Br. J. Clin. Pharmacol. 5:453-455. 1978.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. **Mechanisms of inflammatory response.** Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol. 18(3):385-405. 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; ATHAYDE, M. L. **Farmacognosia. Da planta ao medicamento.** 5ta edição. Ed. da UFSC e UFRGS. Porto Alegre, RS. Brasil. 711-740. 2003.

SMITH, J. A. **Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword.** J. Leukoc. Biol. 56(6):672-86. 1994.

SOMMER, C.; KRESS, M. **Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia.** Neurosci. Lett. 6:361-363. 2004.

VIVIER, E.; MALISSEN, B. **Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited.** *Nat. Immunol.* 6(1):17-21. 2005.

VUJANOVIC, N. L. **Role of TNF superfamily ligands in innate immunity.** *Immunol. Res.* 50:159–174. 2011.

WALLIS, R. S. **Biologics and infections: lessons from tumor necrosis factor blocking agents.** *Infect. Dis. Clin. North Am.* 25(4):895-910. 2011.

ZIMMERMANN, M. **Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals.** *Pain.* 16:109-110. 1983.