

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

Diana Ana Pereira

**ESTUDO FARMACOLÓGICO
DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS
DA *LOTUS CORNICULATUS* VAR. SÃO GABRIEL
UTILIZANDO-SE O MODELO DA PLEURISIA
EM CAMUNDONGOS**

Florianópolis
2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

Diana Ana Pereira

**ESTUDO FARMACOLÓGICO
DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS
DA *LOTUS CORNICULATUS* VAR. SÃO GABRIEL
UTILIZANDO-SE O MODELO DA PLEURISIA
EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmácia, sob a orientação da Profa. Dra. Tânia Silvia Fröde.

Florianópolis
2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

P436e Pereira, Diana Ana

Estudo farmacológico do extrato bruto, frações e compostos isolados da *Lotus corniculatus* var. São Gabriel utilizando-se o modelo da pleurisia em camundongos [dissertação] / Diana Ana Pereira ; orientadora, Tânia Silvia Frode. - Florianópolis, SC, 2011.

98 p.: grafs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui bibliografia.

1. Farmácia. 2. Cornichão. 3. Bradicinina. 4. Pleurisia. 5. Agentes antiinflamatórios. 6. Ácido oleanólico. I. Frode, Tânia Silvia. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito anti-inflamatório da *Lotus corniculatus* no modelo de pleurisia induzida por bradicinina, em camundongos. **Materiais e métodos:** As partes aéreas da *L. corniculatus* var. São Gabriel foram secas ao ar e cortadas. Ao material obtido foi adicionado etanol 96% para obter o extrato bruto hidroalcoólico (CE). Este foi fracionado por partição líquido-líquido utilizando hexano, acetato de etila, *n*-butanol e água, em ordem crescente de polaridade, resultando nas frações hexano (HEX), acetato de etila (AcOEt), butanol (BuOH), e aquosa (Aq). Os compostos **1** e **2** foram isolados das frações HEX e AcOEt por meio de coluna cromatográfica de sílica gel, e identificados como ácido oleanólico e canferitrina. Camundongos albinos suíços foram utilizados nos experimentos e a pleurisia foi induzida por bradicinina (BK), de acordo com metodologia descrita por Saleh et al. (1997). Inicialmente, diferentes grupos de animais foram tratados com diferentes doses de CE (25–200 mg/kg), HEX (5–25 mg/kg), AcOEt (5–25 mg/kg), BuOH (5–25 mg/kg), Aq (5–25 mg/kg), ácido oleanólico (1–5 mg/kg), ou canferitrina (1–10 mg/kg), 0,5 h antes da indução por BK. Os parâmetros inflamatórios (leucócitos, exsudação, atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e adenosina-deaminase (ADA), e concentrações de nitrato/nitrito (NO_x) e interleucina-17A (IL-17A)) foram avaliados 4 h após a indução da pleurisia. Diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas pela análise de variância (ANOVA), complementadas quando necessário, com Dunnett ou teste *t* de Student. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. **Resultados:** o CE, suas frações e compostos isolados inibiram significativamente os leucócitos, a exsudação, a atividade das enzimas MPO e ADA, assim como as concentrações de NO_x e IL-17A ($p < 0,05$). **Conclusão:** A *L. corniculatus* apresentou importante efeito anti-inflamatório, principalmente pela inibição do influxo de leucócitos e exsudação causada pela BK. Este efeito parece ser em parte mediado pela inibição das enzimas MPO e ADA, e dos mediadores NO e IL-17A. Além disso, os compostos ácido oleanólico e canferitrina parecem ser responsáveis, em parte, pelo efeito anti-inflamatório observado.

Palavras-chave: *Lotus corniculatus*; bradicinina; pleurisia; efeito anti-inflamatório; camferitrim; ácido oleanólico, parâmetros pró-inflamatórios.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory effect of *Lotus corniculatus* in the mouse model of pleurisy induced by bradykinin (BK). **Material and methods:** The aerial parts of *Lotus corniculatus* var. São Gabriel were air-dried and grounded. The grounded material was extracted using ethanol 96% to obtain the crude extract (CE). The CE was fractionated by liquid-liquid extraction using hexane, ethyl acetate, n-butanol and water in growing order of polarity, resulting in hexane (HEX), ethyl acetate (AcOEt), butanol (BuOH) and aqueous (Aq) fractions. The compounds **1** and **2** were isolated from HEX and AcOEt fractions by silica gel column chromatography and identified as oleanolic acid and kaempferitrim, respectively. Swiss mice were used in the *in vivo* experiments and the pleurisy induced by BK was performed in accordance with Saleh et al. (1997). Different groups of animals were treated with different doses of CE (25 – 200 mg/kg), HEX (5 – 25 mg/kg), AcOEt (5 – 25 mg/kg), BuOH (5 – 25 mg/kg), Aq (5 - 25 mg/kg), oleanolic acid (1 – 5 mg/kg) or kaempferitrim (1 – 10 mg/kg), 0.5 h before BK induction. The inflammatory parameters (leukocytes, exudation, myeloperoxidase (MPO) and adenosine-deaminase (ADA) activities and nitrate/nitrite (NO_x) and interleukin-17A (IL-17A) levels) were evaluated 4 h after pleurisy induction. Statistical differences between groups were determined by two way analysis of variance (ANOVA) complemented with Dunnett's and/or Student *t* test, as necessary. *p* values less than 0.05 were considered statistically significant. **Results:** CE, its derived fractions and isolated compounds significantly inhibited leukocytes, exudation, MPO and ADA activities, as well as NO_x concentrations and IL-17A levels (*p* < 0.05). **Conclusion:** *Lotus corniculatus* presented important anti-inflammatory action by inhibiting prior leukocyte influxes and exudation caused by BK. This effect was directly related to the inhibition of either MPO and ADA enzymes and NO_x and IL-17A levels. Furthermore, oleanolic acid and kaempferitrim can be account for these anti-inflammatory effects.

KEYWORDS: *Lotus corniculatus*; bradykinin; pleurisy; anti-inflammatory effect; kaempferitrim; oleanolic acid; pró-inflammatory parameters.

TABELA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Lotus corniculatus</i> , var. são Gabriel.....	19
Figura 2: substâncias isoladas da <i>Lotus corniculatus</i>	20
Figura 3: Ação da mieloperoxidase sobre o peróxido de hidrogênio.....	25
Figura 4: Efeito do extrato bruto da <i>Lotus corniculatus</i> var. São Gabriel sobre a migração de leucócitos e exsudação na pleurisia induzida por bradicinina	46
Figura 5: Efeito da fração hexano isolada da <i>Lotus corniculatus</i> var. São Gabriel sobre a migração leucócitos e exsudação na pleurisia induzida por bradicinina	47
Figura 6: Efeito da fração acetato de etila isolada da <i>Lotus corniculatus</i> var. São Gabriel sobre a migração leucócitos e exsudação na pleurisia induzida por bradicinina	48
Figura 7: Efeito da fração butanólica isolada da <i>Lotus corniculatus</i> var. São Gabriel sobre a migração leucócitos e exsudação na pleurisia induzida por bradicinina	49
Figura 8: Efeito da fração aquosa isolada da <i>Lotus corniculatus</i> var. São Gabriel sobre a migração leucócitos e exsudação na pleurisia induzida por bradicinina	50
Figura 9: Efeito do ácido oleanólico isolada da <i>Lotus corniculatus</i> var. São Gabriel sobre a migração leucócitos e exsudação na pleurisia induzida por bradicinina	51
Figura 10: Efeito do canferitina isolada da <i>Lotus corniculatus</i> var. São Gabriel sobre a migração leucócitos e exsudação na pleurisia induzida por bradicinina	52
Figura 11: Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da <i>Lotus corniculatus</i> var. São Gabriel, sobre a atividade da mieloperoxidase	53
Figura 12: Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da <i>Lotus corniculatus</i> var. São Gabriel, sobre a atividade da adenosina-deaminase	54
Figura 13: Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da <i>Lotus corniculatus</i> var. São Gabriel, sobre as concentrações de nitrato/nitrito	55
Figura 14: Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da <i>Lotus corniculatus</i> var. São Gabriel, sobre as concentrações de IL-17A	56

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Fração acetato de etila
ADA	adenosina-deaminase
Aq	Fração aquosa
BK	Bradicinina
BuOH	Fração butanólica
CE	Extrato bruto hidroalcoólico
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COX-2	ciclooxigenase-2
CV	Coefficiente de variação
DEX	Dexametasona
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
EROs	espécies reativas de oxigênio
G-CSF	fator estimulante de colônia de granulócitos
GM-CSF	fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófago
HEX	Fração hexano
ICAM-1	molécula de adesão intercelular-1
IL	Interleucina
Indo	Indometacina
iNOS	óxido nítrico sintase induzida
INF- γ	Interferon- γ
IP-10	proteína 10 induzida pelo INF- γ
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB4	Leucotrieno B4
MCP-1	proteína quimiotática de monócito-1
MPO	Mieloperoxidase
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear- κ B
NO	óxido nítrico
NO _x	nitrato/nitrito
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PGI ₂	prostaglandina I ₂
S	Salina estéril
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
VCAM-1	molécula de adesão vascular tipo-1
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 PLANTAS MEDICINAIS	17
1.2 <i>LOTUS CORNICULATUS</i>	18
1.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO	21
1.3.1 Bracicina	21
1.3.2 Neutrófilos	24
1.3.3 Mieloperoxidase	24
1.3.4 Mononucleares	26
1.3.5 Adenosina-deaminase	27
1.3.6 Óxido nítrico	28
1.3.7 Interleucina-17	28
1.4 MODELOS DE INFLAMAÇÃO	29
2. OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 MATERIAL VEGETAL	33
3.2 PREPARO DO EXTRATO VEGETAL	33
3.3 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES	34
3.4 OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS	34
3.5 ANIMAIS	35
3.6 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO	35
3.7 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS	35
3.8 PLEURISIA INDUZIDA PELA BRADICINA, EM CAMUNDONGOS	36
3.9 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DOS LEUCÓCITOS	36
3.9.1 Coloração dos esfregaços celulares	37
3.10 DETERMINAÇÃO DA EXSUDAÇÃO	37
3.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE	38
3.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ADENOSINA- DEAMINASE	38
3.13 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE NITRATO/NITRITO	39
3.14 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE IL- 17A	39

3.15 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	40
3.16 FÁRMACOS E REAGENTES	41
3.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
4. RESULTADOS	43
4.1 EFEITO DO EXTRATO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA <i>LOTUS CORNICULATUS</i> VAR. SÃO GABRIEL SOBRE A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS E EXSUDAÇÃO	43
4.2 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA <i>LOTUS CORNICULATUS</i> VAR. SÃO GABRIEL, SOBRE A ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE	53
4.3 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA <i>LOTUS CORNICULATUS</i> VAR. SÃO GABRIEL, SOBRE A ATIVIDADE DA ADENOSINA-DEAMINASE	55
4.4 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA <i>LOTUS CORNICULATUS</i> VAR. SÃO GABRIEL, SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE NITRATO/NITRITO	55
4.5 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA <i>LOTUS CORNICULATUS</i> VAR. SÃO GABRIEL, SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE IL-17A	56
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	69
ANEXOS	83
ANEXO A - Protocolo de aprovação no Comitê de Ética na Experimentação com Animais	85
ANEXO B - Artigo submetido e aceito. Revista: Agricultural and Food Chemistry	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 PLANTAS MEDICINAIS

A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem estimado que aproximadamente 65% da população mundial depende principalmente de plantas com propriedades medicinais para cuidados primários da saúde, principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (NEWMAN & CRAGG, 2007; WHO, 2008).

Os produtos naturais desempenham importante papel na saúde e na pesquisa farmacêutica, pelo qual muitos medicamentos são oriundos de produtos naturais ou derivados destes. É estimado que cerca de 40% de todos os medicamentos são produtos naturais ou seus derivados (NEWMAN & CRAGG, 2007).

Os antibióticos (penicilina, tetraciclina e eritromicina), antiparasitários (ivermectina), antimaláricos (quinina e artemisinina), hipolipemiantes (lovastatina e análogos), imunossupressores para transplantados (ciclosporina e rapamicina) e quimioterápicos (taxol e doxorubicina) são exemplos de importantes medicamentos que revolucionaram a medicina (LI & VEREDAS, 2009).

A medicina popular é utilizada em todas as partes do mundo e observa-se, nos dias atuais, seu impacto econômico pelo uso de plantas medicinais, especialmente em países em desenvolvimento (AGRA, FREITAS & BARBOSA-FILHO, 2007), onde serviços de saúde são limitados e pode representar o único tratamento disponível. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1999; 2008), as estimativas atuais sugerem que, em muitos países desenvolvidos, grande parte da população faz uso da medicina popular e de plantas medicinais. Embora o acesso à medicina moderna seja disponível em muitos desses países, a popularidade do uso de plantas medicinais continua sendo um fator histórico e cultural.

Informações sobre o conhecimento tradicional de grupos étnicos que utilizam plantas medicinais podem ser fundamentais na descoberta de novos produtos a partir de plantas (ALMEIDA,

NAVARRO & BARBOSA-FILHO, 2001; SILVA et al., 2003; ROCHA et al., 2005; BARBOSA-FILHO et al., 2007, 2008).

Os fitoterápicos no Brasil, no período de 2003 - 2006, apresentaram um importante crescimento econômico, estimado no valor de 160 milhões de dólares (WHO 2008). Neste período, a venda de fitoterápicos alcançou 31.834,435 unidades em 2006, representando 2,42% do total de medicamentos vendidos naquele ano (FREITAS, 2007).

1.2 *LOTUS CORNICULATUS*

O gênero *Lotus* pertence à família Fabaceae (Leguminosae) e possui aproximadamente 173 espécies (KIRKBRIDE, 1999). Essas espécies são nativas da Europa, Ásia e Mediterrâneo (GREENE, 1999; STEINER, 1999).

A *Lotus corniculatus*, conhecida popularmente como cornichão, é uma leguminosa forrageira perene hiberno-primaveril, de origem européia e mediterrânea, porém distribuída em todas as partes do mundo, com exceção de regiões muito frias e tropicais (BEUSELINCK, 1999). Morfologicamente, a planta apresenta variações quanto ao tamanho, à forma, pubescência, e coloração das folhas (SEANEY & HENSON, 1970). A grande variabilidade dos genótipos dessa espécie deve-se à variedade genética (STEINER & SANTOS, 2001) (Figura 1).



Figura 1: *Lotus corniculatus*.

Fonte: www.domenicus.malleotus.free.fr/www.fatherpitt.wordpress

No Brasil, o único cultivar disponível é o São Gabriel, desenvolvido pela Estação Experimental de São Gabriel, no Rio Grande do Sul, tendo o seu cultivo expandido para outros países da América do Sul (PAIM, 1988).

A *Lotus corniculatus* é utilizada como forrageira, no pasto e na silagem. Esta planta possui considerável quantidade de proantocianidinas (polímeros de flavonóides), ou taninos condensados, sendo os principais responsáveis pelos efeitos benéficos na alimentação animal (DIXON, XIE & SHARMA, 2005).

Os taninos condensados estão associados a alguns efeitos benéficos em relação ao metabolismo animal, como aumento na absorção de aminoácidos no intestino (WAGHORN et al., 1987), redução da população de parasitas (AERTS, BARRY, & MCNABB, 1999), e de metano ruminal (SCALBERT, 1991), ganho de peso, aumento no crescimento da lã (MIN et al., 2001), e na produção e melhora na composição do leite e promoção da ovulação (WAGHORN & SHELTON, 1997).

Outros efeitos farmacológicos reportados para os taninos condensados incluem as atividades: antibacteriana e antiviral, efeito antioxidante e anti-inflamatório, propriedades antimutagênica e antitumoral (BRUYNE et al., 1999).

Estudos fitoquímicos demonstraram que a *Lotus corniculatus* possui importante diversidade de flavonóides. Dentre os principais compostos mencionados em diferentes estudos, 10 são derivados de canferol e quercetina (HARNEY & GRANT, 1964; BATE-SMITH, 1965; JAY et al., 1978). Além disso, os flavonoides predominantes nas pétalas das flores da *L. corniculatus* são também canferol e quercetina (JAY & IBRAHIM, 1986) (Figura 2).

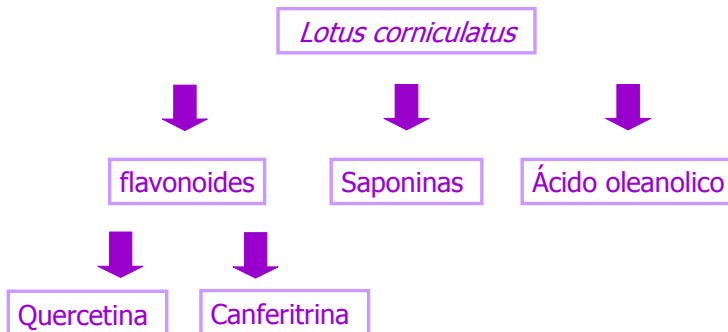


Figura 2: substâncias isoladas da *Lotus corniculatus*.

Fonte: elaborado pela autora da dissertação, 2011.

Na espécie *L. corniculatus* var. *tenuifolius* L., foram isolados β -amirina, β -sitosterol e ácido ursólico; além dos flavonóides quercetina, quercetrina, canferol e canferitrina, sendo este último encontrado também na espécie *Lotus japonicus* (ABDEL-GHANI et al., 2001).

Em relação à *L. corniculatus*, estudos mostraram a presença de substâncias com propriedades anti-inflamatórias já conhecidas, como flavonóides (quercetina e camferol) (RIJKE et

al., 2004), triterpeno (ácido oleanólico) e saponinas (WALTER, 1961). Essas propriedades anti-inflamatórias são mencionadas em vários estudos *in vivo* e *in vitro*. Dentre estes citam-se: a quercetina apresenta atividade antioxidante (MOON, 2001; GUPTA et al., 2010; KAO et al., 2010), anti-inflamatória (KWON, 2009; VALÉRIO, 2009; ROGERIO et al., 2010) e antimutagênica (GUPTA et al., 2010). O canferol apresenta ação antinociceptiva e anti-inflamatória pela inibição de mediadores pró-inflamatórios e inibição do fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B) (KWON et al., 2009; MELO et al., 2009; PARK et al., 2009). O ácido oleanólico e as saponinas apresentam propriedades anti-inflamatórias via inibição da síntese dos leucotrienos (GINER-LARZA et al., 2001), produção/liberação de óxido nítrico (NO) (ABDEL-ZAHER, 2007), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), prostaglandina E₂ (PGE₂) e ciclooxigenase-2 (COX-2) (KIM et al., 2006).

Na França, o chá das folhas da *Lotus corniculatus* é utilizado como sedativo e espasmolítico. Baseados no fato de que a planta possui grande quantidade de polifenóis, Trouillas et al. (2003) mostraram que o extrato hidroalcolólico obtido da *Lotus corniculatus* possui atividade antioxidante e antiproliferativa.

Uma vez que neste estudo enfocamos o papel da *Lotus corniculatus* na inibição da resposta inflamatória induzida na cavidade pleural de animais tratados com bradicinina, é importante relatarmos sobre este evento fisiológico que muitas vezes leva à destruição tecidual e à falência de órgãos.

1.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO

1.3.1 Bradicinina

Dentre os mediadores liberados na resposta inflamatória, destaca-se a bradicinina (BK), que é uma cinina conhecida pelos efeitos pró-inflamatórios. Esta é formada no plasma e em tecidos (MEINI & MAGGI, 2008) em resposta à lesão e/ou inflamação (STEWART, 2004).

As cininas, incluindo a bradicinina, originam-se do cininogênio, uma proteína sintetizada no figado. Os cininogênios

são classificados em: cininogênio de alto peso molecular encontrado no plasma e cininogênio de baixo peso molecular encontrado no tecido. No plasma, a BK é liberada a partir do cininogênio de alto peso molecular sob a ação da calicreína plasmática. A pré-calicreína, é ativada pelo fator Hageman (fator VIII) no plasma, por meio de um estímulo, como por exemplo: a inflamação, infecção, lesão, anóxia e diminuição do pH, liberando a calicreína plasmática. No tecido, a calicreína secretada pelo pâncreas, rim e glândulas salivares, age sobre o cininogênio de baixo peso molecular produzindo a calidina (Lys-BK) (KAPLAN, JOSEPH & SILVERBERG, 2002; MARCEAU & REGOLI, 2004; STEWART, 2004). Após a liberação de BK e Lys-BK, ocorre a ação de duas outras proteases, as carboxipeptidases N e M, também conhecidas como cininases I, formando os peptídeos des-Arg⁹-BK e Lys-des-Arg⁹-BK, respectivamente, consideradas metabólitos ativos (KAPLAN, JOSEPH & SILVERBERG, 2002). Por outro lado, as cininases II, enzima conversora de angiotensina, hidrolisam as cininas em metabólitos inativos (MARCEAU & REGOLI, 2004).

A administração de BK em tecido humano ou animal induz resposta inflamatória caracterizada por rubor, calor, edema e dor (MARCEAU & REGOLI, 2004). Além disso, no vaso, a BK induz o extravasamento plasmático de proteínas e mediadores pró-inflamatórios, promovendo a formação de edema e contribuindo para a resposta inflamatória aguda (ELLIS & FOZARD, 2002).

A BK estimula as células endoteliais a liberar também o óxido nítrico (NO) e a prostaglandina I₂ (PGI₂) (MARCEAU & REGOLI, 2004), promovendo a vasodilatação. Além disso, a liberação de BK induz outros efeitos biológicos como, por exemplo, o aumento da permeabilidade vascular, o que permite a quimiotaxia de anticorpos e dos leucócitos para o local da lesão (STEWART, 2004) e a formação do exsudato (ELLIS & FOZARD, 2002).

Há dois receptores conhecidos para as cininas, os receptores B₁ e B₂. O receptor B₁ é ativado pela des-Arg⁹-BK ou Lys-des-Arg⁹-BK, enquanto o receptor B₂ é ativado por BK ou Lys-BK (BOCKMANN & PAEGELOW, 2000, STEWART, 2004).

O receptor B₁ pode ser ativado ainda por diferentes estímulos: lipopolissacarídeo (LPS), interleucina-1beta (IL-1β), interleucina-6 (IL-6), interferon-gama (INF-γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α) (LEEB-LUNDBERG et al., 2005; ABRAHAM, SCURI & FARMER, 2006). A ativação do receptor B₁ promove diferentes efeitos biológicos como, por exemplo, o influxo de neutrófilos, a ativação do fator de transcrição nuclear NF-kappa B (NF-κB), resultando na síntese de citocinas pró-inflamatórias como o TNF-α e a IL-1β (MARCEAU & REGOLI, 2004; LEEB-LUNDBERG et al., 2005). Estas citocinas por sua vez, promovem: vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular (STEWART, 2004), extravasamento de proteínas plasmáticas, dor, quimiotaxia de leucócitos e acúmulo destas células, no local da inflamação (LEEB-LUNDBERG et al., 2005; ABRAHAM, SCURI & FARMER, 2006).

O receptor B₂ da BK é responsável pela maioria dos efeitos farmacológicos das cininas, incluindo: broncoconstrição, hipotensão, inflamação aguda, edema e dor (ABRAHAM, SCURI & FARMER, 2006).

A ativação dos receptores da bradicinina em diferentes tipos celulares promove diferentes efeitos farmacológicos. Dentre eles podemos mencionar que nas células endoteliais do vaso, em condições fisiológicas, a ativação do receptore B₂ resulta na ativação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) gerando o óxido nítrico. No entanto, no processo inflamatório, a ativação do receptor B₁ nessas células promove a liberação de grande quantidade de óxido nítrico por meio da ativação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) por um período de tempo prolongado (LEEB-LUNDBERG et al., 2005; KUHR et al., 2010).

Nos neutrófilos a BK promove a quimiotaxia celular pela ativação do receptor B₂ na inflamação aguda, enquanto que na inflamação crônica este efeito ocorre via ativação do receptor B₁ (BOCKMANN & PAEGELOW, 2000). Nos macrófagos, a ativação do receptor B₁ promove a liberação de TNF-α, IL-1, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-6 e IL-8 (BOCKMANN & PAEGELOW, 2000). Já a ativação do mesmo receptor em mastócitos promove a liberação de histamina (LEEB-LUNDBERG et al., 2005).

A bradicinina está envolvida em algumas doenças como por exemplo: doença inflamatória, renal, aterosclerose, sepse e diabetes (MARCEAU & REGOLI, 2004; DUCHENE & AHLUWALIA, 2009).

1.3.2 Neutrófilos

Dentre as células envolvidas na resposta inflamatória, destaca-se os neutrófilos que são as primeiras células recrutadas para o local da inflamação (ARNHOLD & FLEMMIG, 2010), e são também considerados uma das principais células responsáveis pela destruição de microorganismos invasores (NATHAN, 2006). Quando os neutrófilos alcançam o tecido lesado, esses se tornam ativados pelo contato direto com o agente causal ou por ação de citocinas liberadas por células residentes (macrófagos) (MEDZHITOV, 2008). Os neutrófilos tentam destruir os agentes invasores pela liberação de agentes tóxicos que incluem as espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ENRs) (MEDZHITOV, 2008).

Os neutrófilos estão envolvidos em algumas doenças como por exemplo: síndrome Chediak-Higashi, vasculite de pequenos vasos, granulomatose de Wegener, neutropenia hereditária, artrite reumatóide, doença inflamatória do intestino, asma, câncer, aterosclerose, esclerose múltipla e glomerulonefrite (ARNHOLD & FLEMMIG, 2010; GUILPAIN et al., 2008; PHAM, 2008).

1.3.3 Mieloperoxidase

Nos neutrófilos, a mieloperoxidase (MPO) é a principal enzima, sendo liberada a partir dos grânulos azurófilos primários e desempenha importante papel microbicida na resposta a infecção bacteriana (LAU & BALDUS 2006; GUILPAIN et al., 2008; LORIA et al., 2008; ARNHOLD & FLEMMIG, 2010). Esta enzima apresenta atividade oxidativa e inflamatória (LORIA et al., 2008). No fagossoma de neutrófilos, a MPO converte o peróxido de hidrogênio e íons cloro em ácido hipocloroso (HClO) e água (LAU & BALDUS 2006; GUILPAIN et al., 2008; LORIA et al.,

2008; ARNHOLD & FLEMMIG, 2010) (Figura 3). O ácido hipocloroso formado é considerado um agente oxidante citotóxico com atividade microbicida (LAU & BALDUS 2006; GUILPAIN et al., 2008).

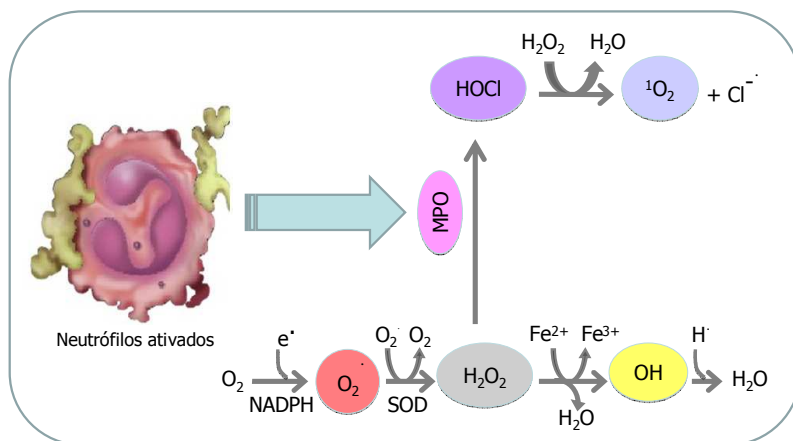


Figura 3: Ação da mieloperoxidase sobre o peróxido de hidrogênio.

Fonte: elaborado pela a autora da dissertação, 2011.

A MPO é conhecida por ser um marcador de neutrófilos ativados (LAU & BALDUS 2006; GUILPAIN et al., 2008; LORIA et al., 2008). A migração de neutrófilos para o tecido inflamado é avaliada pela determinação da atividade da MPO, pois durante esta ativação, uma quantidade considerável desta enzima é liberada para o meio extracelular (ARNHOLD & FLEMMIG, 2010). Os neutrófilos em apoptose liberam MPO e são removidos pelos macrófagos, o que é importante para a resolução da inflamação (ARNHOLD & FLEMMIG, 2010). A MPO está mais relacionada à ativação de neutrófilos do que mononucleares, uma vez que esta enzima é perdida na maturação dos monócitos (ARNHOLD & FLEMMIG, 2010).

A MPO está envolvida em várias doenças, especialmente aquelas relacionadas à inflamação mediada por neutrófilos como: doença arterial coronária, artrite reumatóide, doença inflamatória do intestino, asma, câncer (GUILPAIN et al., 2008) aterosclerose, esclerose múltipla e glomerulonefrite (ARNHOLD & FLEMMIG, 2010). Nestas doenças se observa o aumento significativo da atividade desta enzima (ARNHOLD & FLEMMIG, 2010).

1.3.4 Mononucleares

Outro tipo celular importante na resposta inflamatória constitui os monócitos, células encontradas na corrente sanguínea, que migram para os tecidos e se diferenciam em macrófagos. Em contraste com os neutrófilos, os quais contribuem para a resposta inflamatória aguda, os monócitos/macrófagos são as principais células da resposta inflamatória de caráter crônico. Os macrófagos são a maior fonte de mediadores inflamatórios e assim modulam o curso da inflamação e a resposta imune. Estas células apresentam três funções importantes 1) apresentação de antígeno ao sistema imunológico, 2) fagocitose e 3) imunomodulação (HASKÓ, et al., 2007; DALE, BOXER & LILES, 2008; MOSSER & EDWARDS, 2008).

A ativação dos macrófagos ocorre por diferentes estímulos, como por exemplo, citocinas pró-inflamatórias do tipo TNF- α , IL-1 β , entre outros, resultando em aumento da capacidade microbicida e tumoricida destas células. As citocinas pró-inflamatórias liberadas pelos macrófagos ativados são importantes na defesa contra microorganismos, mas podem também causar danos ao tecido. A liberação de IL-1, IL-6 e IL-23 ativam outras citocinas associadas ao desenvolvimento e a expansão clonal de células T_H17, a IL-17, pelo qual promove o recrutamento de neutrófilos para o local da inflamação, e contribui para a amplificação da inflamação em doenças inflamatórias e de caráter autoimune (MOSSER & EDWARDS, 2008).

Os mononucleares estão envolvidos em algumas doenças como a aterosclerose, artrite reumatóide, leucemia, lupus

eritematoso sistêmico e mononucleose infecciosa, entre outras (ZAVIALOV & ENGSTRÖM, 2005; DALE, BOXER & LILES, 2008).

1.3.5 Adenosina-deaminase

Os neutrófilos e as células endoteliais liberam o autácóide adenosina em situações de estresse metabólico, inflamação e infecção. Nas mesmas condições, os macrófagos ativados liberam uma concentração maior de adenosina (HASKÓ et al., 2007). A adenosina, como substrato, é transformada em inosina pela ação da enzima adenosina-deaminase (ADA), sendo esta reação irreversível. A formação de adenosina aumenta rapidamente em resposta ao estresse metabólico, dano celular, isquemia, trauma, sepse e inflamação (HASKÓ et al., 2007; HASKÓ et al., 2008; RIKSEN et al., 2008; KUMAR & SHARMA, 2009). O aumento extracelular de adenosina estimula a expressão de receptores de adenosina em diferentes tipos celulares (RIKSEN et al., 2008).

A adenosina atua em 4 receptores distintos (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3) presentes em neutrófilos, macrófagos, linfócitos, células dendríticas, monócitos e mastócitos (HASKÓ et al., 2007; HASKÓ et al., 2008; KUMAR & SHARMA, 2009; FREDHOLM, 2010). A baixa concentração de adenosina ativa os receptores de adenosina de alta afinidade (A_1 , A_{2A} , e A_3) e a alta concentração de adenosina estimula o receptor de baixa afinidade (A_{2B}) (HASKÓ et al., 2007; HASKÓ et al., 2008).

A ativação do receptor de baixa afinidade promove a liberação de IL-6, enquanto que a ativação dos receptores de alta afinidade promove a diminuição de TNF- α , INF- γ , IL-6, IL-12, EROs e aumento de IL-10 e óxido nítrico (NO) (HASKÓ et al., 2008). Em condições de estresse metabólico e/ou dano celular, o efeito biológico é atribuído à ativação do receptor A_{2B} (HASKÓ et al., 2007; HASKÓ et al., 2008).

O aumento da atividade de ADA é encontrada em doenças como artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico, tuberculose, pneumonia, síndrome da imunodeficiência adquirida

(AIDS) e mononucleose infecciosa (ZAVIALOV & ENGSTRÖM, 2005), entre outras.

1.3.6 Óxido nítrico

Dentre os principais mediadores pró-inflamatórios se destaca o óxido nítrico que participa de diversos processos biológicos como a regulação do tônus vascular, inflamação, neurotransmissão e apoptose (NAGY et al., 2007; KUHR et al., 2009). O NO é um dos principais agente vasodilatadores conhecidos (NAGY et al., 2007). No sistema imune, concentrações elevadas de NO são importantes para eliminar o patógeno, contribuindo para a atividade bactericida dos macrófagos (HASKÓ et al., 2007; LUNDBERG, WEITZBERG & GLADWIN, 2008; KUHR et al., 2009).

O NO é sintetizado a partir da L-arginina pela ação da enzima NO sintetase (NOS). Esta enzima apresenta três isoformas: nNOS, eNOS e iNOS. Em condições fisiológicas, as células endoteliais são a principal fonte de NO pela a ação da eNOS. Em condições inflamatórias, a iNOS é ativada por citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , INF- γ e TNF- α e LPS (NAGY et al., 2007; LUNDBERG, WEITZBERG & GLADWIN, 2008; KUHR et al., 2009). Uma vez expressa a iNOS, libera o NO em grande quantidade, e por tempo mais prolongado quando comparado à eNOS (KUHR et al., 2009).

O aumento de NO é observado em diversas doenças como por exemplo: artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal e inflamação tecidual por toxinas (PACHER et al., 2007), entre outras.

1.3.7 Interleucina-17

Dentre as principais citocinas pró-inflamatórias, que tem sido alvo de muitos estudos, destaca-se a IL-17.

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória liberada a partir do estímulo de células da resposta imune inata e adaptativa como células epiteliais, neutrófilos e linfócitos (CD8+, NK, T $\gamma\delta$, CD4+(T_H17)) (BENGHIAT et al., 2009; CUA & TATO, 2010), e

participa da defesa contra microorganismos (DONG, 2008). Esta citocina induz a liberação de citocinas pró-inflamatória (IL-6, TNF- α , IL-1 β), fatores de crescimento hematopoiético (fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF), fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófago (GM-CSF)) e quimiocinas (IL-8, CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL7, proteína-1 quimiotática de monócito). Além disso, a IL-17 promove o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da inflamação (BENGHIAT et al., 2009), aumento na expressão de molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), ativação da ciclooxigenase-2 (COX-2) e da iNOS (IWAKURA et al., 2008, CUA & TATO, 2010), entre outros.

A ativação de células T produtoras de IL-17 tem sido descrita em numerosas doenças incluindo, a doença de Crohn, colite ulcerativa, uveíte, psoríase, artrite reumatóide, dermatite de contato e esclerose múltipla (OGAWA et al., 2004; BENGHIAT et al., 2009) entre outras.

1.4 MODELOS DE INFLAMAÇÃO

Os modelos animais são ferramentas importantes para avaliar as propriedades farmacológicas de plantas (ZOSKY & SLY, 2007).

Para a avaliação do mecanismo de ação anti-inflamatório de diferentes fármacos e/ou plantas, vários modelos de inflamação já foram descritos, como a pleurisia, a bolsa de ar, o edema de pata, a artrite e o implante de esponjas embebidas em agentes irritantes (SEDGWICK & LEES, 1986).

Algumas espécies animais são utilizadas em modelos experimentais de asma, incluindo cobaia, cão, camundongos e ratos. Entretanto, devido à complexidade da doença, a asma brônquica não é reproduzida adequadamente em animais. Desta forma, modelos em camundongos podem proporcionar uma oportunidade para estudar vários aspectos da doença, devido à facilidade de avaliar-se a resposta imunológica e farmacológica. Além disso, estes modelos experimentais permitem avaliar as alterações morfológicas, imunológicas e fisiológicas nas vias respiratórias que podem mimetizar alguns eventos que ocorrem

na asma brônquica humana (LEWKOWICH & WILLS-KARP, 2008).

O modelo de inflamação da pleurisia induzida por bradicinina é caracterizado pelo aumento de leucócitos do tipo neutrófilos (principalmente) e mononucleares, e da exsudação que ocorre 4 h após a administração da bradicinina na cavidade pleural de camundongos. Neste modelo, observa-se que 4 h após a administração do agente flogístico, ocorre inicialmente aumento de leucócitos e da exsudação. Este modelo sugere, que no fluido da cavidade pleural desses animais inflamados por bradicinina, ocorra a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios como histamina, óxido nítrico, taquicininas, citocinas e EROs (SALEH, CALIXTO & MEDEIROS, 1997).

Neste trabalho, optou-se pelo modelo experimental de pleurisia, uma vez que é possível avaliar vários parâmetros da inflamação em um período agudo semelhante aos que ocorrem no início do processo inflamatório. Além disso, este modelo foi padronizado em nosso laboratório, é de fácil execução para avaliar plantas que possuem propriedades anti-inflamatórias.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto hidroalcoólico, frações e compostos isolados obtidos da *Lotus corniculatus* var. São Gabriel, administrado por via sistêmica em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Avaliar o efeito anti-inflamatório do material vegetal sobre a migração dos leucócitos e a exsudação.

II. Investigar o efeito do material vegetal sobre a atividade/ou concentrações de mieloperoxidase (MPO), adenosina-deaminase (ADA), nitrito/nitrato (NO_x).

III. Estudar o efeito do material vegetal sobre as concentrações da interleucina-17 (IL-17).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

A espécie *Lotus corniculatus* var. São Gabriel foi coletada no município de Lages, na estação de pesquisa agropecuária da EPAGRI, no mês de novembro de 2006, a qual foi identificada pelo Prof. Dr. Daniel de Barcelos Falkenberg e depositada no herbário FLOR, no Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina, tendo como número 18.770.

3.2 PREPARO DO EXTRATO VEGETAL

A extração do material foi realizada pela aluna de Pós-graduação (doutorado) Juliana Bastos Dalmarco, no Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, utilizando-se a técnica de maceração em etanol 96%.

O material vegetal (partes aéreas de *L. corniculatus* var. São Gabriel), após coleta e identificação, foi seco em estufa com circulação de ar a 50°C resultando em 620 g de material seco. Após, o material foi moído em moinho de facas (Mill TE-651, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) e submetido ao procedimento de maceração em etanol 96% durante quinze dias. O extrato obtido foi filtrado e o solvente extrator evaporado em rota-evaporador (60°C) (Fisatom-802, São Paulo, SP, Brasil) com condensador acoplado sob vácuo, sendo concentrado até o volume ser reduzido em 1/3 do volume inicial, de forma que o solvente evaporado fosse recuperado e, posteriormente, reutilizado para nova maceração. Este mesmo procedimento foi realizado por mais duas vezes por mais 15 dias resultando no final das extrações 78,12g de extrato bruto seco, correspondendo a 12,5% da planta seca.

3.3 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES

Para a obtenção das frações, o extrato bruto foi diluído em H₂O/EtOH, e após, submetido a um fracionamento por partição líquido-líquido com solventes, de grau analítico PA, de diferentes polaridades: hexano, acetato de etila e *n*-butanol, resultando nas frações hexano (HEX: 7,82g), acetato de etila (AcOEt: 11,4g), butanólica (BuOH: 5,24g) e aquosa (Aq: 30,8g), após completa remoção dos solventes por rota-evaporador (Fisatom-802, São Paulo, SP, Brasil).

3.4 OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS

As frações foram obtidas por cromatografias em coluna (CC) de sílica gel, e a separação monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD).

Para o procedimento de isolamento e purificação dos compostos por CC, foi utilizado como fase estacionária sílica gel 0,063 - 0,2 para CC normal e 0,04 - 0,063 para CC flash. As frações e compostos obtidos foram analisadas através de CCD, utilizando-se placas de alumínio recobertas por sílica gel 60 GF254, (Merck, Frankfurt, Darmstadt, Alemanha), com 0,25 mm de espessura e partículas entre 5 a 40 µm de diâmetro. As substâncias separadas nas placas cromatográficas foram visualizadas utilizando vários métodos: revelação em câmara de iodo, revelação com reagente cloreto férrico (conc.) e revelação com reagente anisaldeído-sulfúrico seguido de aquecimento a 110°C. O reagente anisaldeído-sulfúrico foi preparado do seguinte modo: 9 mL de etanol foram adicionados sequencialmente, com agitação e banho de gelo, 0,5 mL de ácido sulfúrico (conc.), 0,1mL de ácido acético glacial e 0,5 mL de anisaldeído.

Nestes procedimentos obteve-se compostos isolados e com quantidade suficiente para submissão aos ensaios de atividade biológica. Nas frações HEX e AcOEt, após cromatografia em coluna de sílica gel, verificou-se a presença de ácido oleanólico e canferitrina, respectivamente.

O ácido oleanólico e a canferitrina foram identificados por comparação de seus receptivos resultados químicos e espectroscópicos com dados descritos na literatura (HUNG & YEN, 2001; URGOANKAR & SHAW, 2007).

Para medir o ponto de fusão dos compostos isolados, foi utilizado um aparelho digital (Microquímica MQAPF-301, Palhoça, SC, Brasil). Este equipamento é provido de lupa para a visualização da fusão da amostra e uma chapa aquecida, sobre a qual é colocada a amostra entre a lâmina e lamínula.

As estruturas químicas dos compostos isolados foram identificadas por meio de resultados espectroscópicos de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C (Varian AS-400 – Palo Alto, Califórnia, EUA) e de infravermelho (Perkin-Elmer FTIR 16 PC, Beaconsfield, Buckinghamshire, Inglaterra).

3.5 ANIMAIS

Para a técnica da pleurisia foram utilizados camundongos albinos suíços, 1 mês de idade, de ambos os sexos, pesando entre 18 e 25 g, fornecidos pelo Biotério Central da UFSC.

Os animais mencionados foram acomodados em gaiolas plásticas com serragem, sob temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e a luz natural. Estes animais receberam alimentação e água durante todos os experimentos (ZIMMERMAN et al., 1983). Este projeto foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) sob protocolo Nº PP00180 (Anexo A).

3.6 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO

A anestesia foi induzida com pentobarbital (25 mg/kg) administrados por via intraperitoneal.

3.7 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Os animais foram sacrificados com *overdose* éter.

3.8 PLEURISIA INDUZIDA PELA BRADICINA, EM CAMUNDONGOS

Os experimentos foram realizados de acordo com os procedimentos descritos por SALEH, CALIXTO & MEDEIROS, 1997.

No dia dos experimentos, os animais receberam 0,1 mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) ou do agente flogístico bradicinina (BK: 20 nmol), administrado na cavidade pleural direita através do espaço intercostal, utilizando-se de uma agulha 13x5 mm e cânula de poliestireno. De acordo com cada protocolo experimental, após a administração da bradicinina ou da solução salina estéril, os animais foram sacrificados 4 h após a indução da inflamação com *overdose* de éter. A seguir, os animais foram fixados em mesa cirúrgica, em declive de 30° a 45°, sendo feita uma incisão transversal na pele e nos músculos abdominais. Em seguida, o apêndice xifóide foi pinçado e através de duas incisões paralelas ao longo do esterno, a cavidade pleural foi exposta. Imediatamente, a cavidade pleural foi lavada com duas alíquotas de 0,5 mL (totalizando 1 mL) de solução salina tamponada (PBS, pH 7,6, NaCl (130 mmol), Na₂HPO₄ (5 mmol), KH₂PO₄ (1 mmol) e água destilada (1000 mL) e heparina (20 UI/mL)). Alíquotas do lavado pleural foram coletadas com auxílio de pipeta automática para a quantificação dos números total e diferencial de leucócitos. De acordo com o protocolo experimental, 10 minutos antes dos experimentos, alguns animais foram tratados com solução de azul de Evans (25 mg/kg, 0,2 mL/animal, i.v.), para posterior determinação indireta do grau de exsudação na cavidade pleural (SALEH et al., 1996).

3.9 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DOS LEUCÓCITOS

No dia dos experimentos, após a morte dos animais e abertura das cavidades, alíquotas do lavado pleural (200 µL) foram reservadas para a contagem de leucócitos totais, utilizando-se líquido de Türk (1:20) e câmara de Neubauer com auxílio de microscópio ótico comum (aumento 400 vezes). Os esfregaços celulares foram realizados para a contagem

diferencial dos leucócitos. Após o preparo dos esfregaços em citocentrífuga (Wescor-Cytopro, Logan, Utah, EUA.), estes foram corados pelo método de May-Grünwald-Giemsa. A contagem diferencial de leucócitos (polimorfonucleares e mononucleares) foi realizada também em microscópio óptico comum, com auxílio de objetiva de imersão (aumento de 1000 vezes), contando-se 100 células por lâmina. Os resultados foram expressos em número total de células ($\times 10^6$).

3.9.1 Coloração dos esfregaços celulares

A metodologia consiste na coloração sucessiva com uma mistura de eosinato de azul-de-metileno (May-Grünwald) e de azul-eosina (Giemsa). As lâminas contendo o sedimento dos lavados pleurais após centrifugação em citocentrífuga foram secas em posição horizontal à temperatura ambiente. Em suporte de coloração apropriado, as lâminas foram cobertas com 1 mL de corante May-Grünwald e mantidas em contato com o sedimento por 2 minutos. A seguir adicionou-se água deionizada (1 mL) nas lâminas, com auxílio de pipeta automática com capacidade de 1 mL. Após 3 min, o corante foi removido e cobriu-se a lâmina com corante Giemsa (diluído 1:20 em água deionizada) por 15 min. A seguir, as lâminas foram lavadas em água deionizada e secas à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em número total de células $\times 10^6$.

3.10 DETERMINAÇÃO DA EXSUDAÇÃO

No dia dos experimentos, uma alíquota (200 μ L) do lavado pleural foi reservada para a determinação das concentrações de azul de Evans em leitor de enzimmunoensaio (ELISA) (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, EUA), por leitura da densidade ótica, em comprimento de onda de 620 nm, de acordo com a metodologia descrita por Saleh, Calixto, Medeiros (1997). Para a quantificação da concentração de azul de Evans, curvas padrão com concentrações previamente conhecidas do corante (0,01 - 50 μ g/mL) tiveram suas densidades óticas determinadas,

e formulou-se uma equação da reta. Os valores das concentrações de azul de Evans foram expressos em $\mu\text{g/mL}$.

3.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE

Neste grupo de experimentos, imediatamente após o sacrifício dos animais, uma amostra do lavado pleural de camundongos foi coletada e imediatamente processada para a quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Volumes de 20 μL do lavado da cavidade pleural ou do padrão (MPO de neutrófilos humanos (0,7 - 140 mU/mL)) foram transferidos para placas de ELISA e a reação bioquímica iniciada com a adição de 180 μL de solução (0,167 mg/mL de o-dianisidina 2HCl e 0,0005% de H_2O_2). Após 15 min de incubação, à temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida com a adição de 30 μL de azida sódica (1%) (RAO et al., 1993). A seguir, as placas contendo as amostras foram lidas em densidade ótica (450 nm) em leitor de ELISA (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, EUA). Curvas-padrão com concentrações conhecidas da MPO (0,7 - 140 mU/mL) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo-se a quantificação dos valores desconhecidos. Os valores da atividade da MPO foram expressos em mU/mL , com o auxílio da equação da reta.

3.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ADENOSINA-DEAMINASE

Inicialmente, amostras-padrão com concentrações conhecidas (volume final 2500 μL) de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (15 mM) e NH_3SO_4 (15 mM) foram preparadas com a finalidade de obter-se uma curva-padrão (10 - 50 U/L). As amostras do lavado pleural (20 μL) foram transferidas para cubetas e a reação enzimática iniciou-se com a adição da solução de adenosina fosfato (pH 6,5, 500 μL , composição: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (15 mM) e adenosina (0,5 mM)). Após período de incubação de 1 h a 37°C, a reação enzimática foi bloqueada pela adição da solução (1000 μL) de fenol (1 mM), nitroprussiato de sódio (0,17 mM) e tampão

alcalino (1000 μL : NaOCl : 11 mM e NaOH : 125mM) (GIUSTI e GALANTI, 1984). Esta solução também foi adicionada às cubetas contendo concentrações diferentes das amostras-padrão (volume final 2500 μL). As absorbâncias das amostras foram lidas em 620 nm em leitor de ELISA (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, EUA). A quantificação da atividade da (ADA) foi expressa em U/L, com auxílio da equação da reta.

3.13 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE NITRATO/NITRITO

O óxido nítrico (NO) foi quantificado pela formação de seus metabólitos nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-), utilizando-se a reação de Griess (GREEN et al., 1982). No dia dos experimentos, 300 μL de cada amostra do lavado pleural foi submetida à desproteïnização. Para cada amostra, foram adicionados 20 μL de solução de sulfato de zinco (20%) e incubadas em banho de gelo por 60 minutos. As amostras foram centrifugadas (2.500 g por 15 minutos) e o resultado final desta primeira etapa foi a obtenção de um sobrenadante límpido. A seguir, 100 μL do sobrenadante foram transferidos para uma cubeta onde foi adicionado 100 μL cloreto de vanádio III (VCl_3) (0,8%) (p/v), e 100 μL de reagente de Griess (50 μL de sulfanilamida (1%) (p/v) e 50 μL de N-(1-naftil) etilenodiamina (0,1%) (p/v)) e incubado durante 40 minutos, à 37 °C (MIRANDA et al., 2001). A reação de NO_2^- com esse reagente produz uma coloração rósea, que foi quantificada por meio da leitura das densidades óticas em leitor de ELISA (Organon - Technica, Roseland, New Jersey, EUA) em 540 nm. Curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas de NO_2^- (0 -150 μM) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo-se a quantificação dos valores de nitrato/nitrito no exsudato em μM , com auxílio da equação da reta.

3.14 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE IL-17A

Neste grupo de experimentos, imediatamente após a morte dos animais, amostras do lavado pleural foram coletadas e

processadas para a realização da técnica de ELISA fase sólida, método sanduíche para a pesquisa das concentrações de IL-17. Neste protocolo foram utilizados anticorpos específicos de acordo com as instruções dos fabricantes (IL-17A: Cat. Nº 88797129) (Bioscience Pharmigen, EUA.).

A sensibilidade identificada no kit para esta citocina foi: 4,0 pg/mL, o coeficiente de variação (CV) intra e interensaios observado foram: CV intra: IL-17A = $7,5 \pm 1,7\%$; CV inter: IL-17A = $6,2 \pm 0,9\%$. Curvas-padrão com concentrações conhecidas de IL-17A (4,0 - 500 pg/mL) também tiveram a densidade ótica determinada, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos com o auxílio da equação da reta. As leituras das amostras e a respectiva curva-padrão foram realizadas em leitor de ELISA (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, EUA). Os valores foram expressos em pg/mL.

3.15 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Inicialmente, para investigar o efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da *Lotus corniculatus* sobre os parâmetros inflamatórios, realizou-se uma curva dose-resposta.

Neste protocolo experimental, diferentes grupos de animais foram tratados com diferentes doses de extrato bruto (CE) (25 - 200 mg/kg, i.p.), fração hexano (HEX), fração acetato de etila (AcOEt), fração butanólica (BuOH) ou fração aquosa (Aq), nas doses de 5 - 25 mg/kg, i.p., ácido oleanólico (1 - 5 mg/kg) ou canferitrina (1 - 10 mg/kg), e a inflamação foi analisada 4 h após.

Estudo realizado anteriormente em nosso laboratório (KOELZER et al., 2009), demonstrou por meio da curva tempo-resposta que o melhor tempo de tratamento prévio dos animais com o material vegetal da planta *Lotus corniculatus* var. São Gabriel capaz de inibir leucócitos e exsudação, foi de 0,5 h, sendo assim, este foi o tempo de tratamento prévio utilizado em nosso protocolo de estudo experimental.

Após a escolha da melhor dose e determinado o melhor tempo de tratamento prévio pelo qual a CE, HEX, AcOEt, BuOH, Aq, ácido oleanólico e canferitrina inibiram os leucócitos e a exsudação, estudou-se o efeito destes fármacos sobre a

atividade da MPO e ADA, e sobre a concentração de NO_x , além da IL-17A. O efeito da planta sobre estes parâmetros foi observado também 4 h após a indução da pleurisia.

Para todos os parâmetros inflamatórios estudados diferentes grupos de animais foram tratados com: 1) somente solução de salina estéril (S) (grupo-controle negativo), 2) somente com bradicinina (BK: 20 nmol) (grupo-controle positivo), 3) indometacina (Indo: 5 mg/Kg, i.p.) + BK ou 4) dexametasona (Dex: 0,5 mg/Kg, i.p.) + BK. Estes últimos dois grupos foram utilizados para compararmos o efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da *Lotus corniculatus* var São Gabriel, com fármacos de referência com conhecida ação anti-inflamatória.

3.16 FÁRMACOS E REAGENTES

Neste estudo foram utilizados os seguintes fármacos e reagentes: dexametasona (Prodome Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, SP, Brasil), bradicinina (BK), hidróxido de sódio (NaOH), mieloperoxidase de neutrófilos humanos, indometacina, o-dianisidina 2HCl (3,3'-dimetoxibenzidina), azida sódica, sulfato de cobre (pentahidratado) ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), ácido tartárico ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{K}_2$), dodecil sulfato de sódio (SDS), cloreto de vanádio-III (VCl_3), sulfanilamida ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), peróxido de hidrogênio (H_2O_2 30 %) (Biotech, São Paulo, SP, Brasil), adenosina ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$) (Fluka, Ronkonkoma, Nova York, EUA), heparina (Liquemine®, Roche, São Paulo, SP, Brasil), fosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), sulfato de zinco (ZnSO_4) (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$), fosfato de hidrogênio dissódico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), nitroprussiato ($\text{C}_5\text{FeN}_5\text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Nuclear, São Paulo, SP, Brasil), sulfato de amônio (NH_3SO_4) (Labsynth, São Paulo, SP, Brasil), carbonato de sódio (Na_2CO_3) (MicroBioquímica, Lorena, SP, Brasil), HCl (Synth, Diadema, SP, Brasil), líquido de Türk, May-Grünwald (Newprov, Pinhais, PR, Brasil), Giemsa (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil), azul de Evans ($\text{C}_{34}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_{14}\text{S}_4\text{Na}_4$) (Acros-Organics, Geel, Antwerp, Belgium); dihidrocloreto de N-(1-naftil)-etilenodiamina ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2$) (Merck,

Frankfurter, Darmstadt, Alemanha). Outros sais e reagentes, de grau de pureza analítica, foram obtidos de diferentes fontes comerciais.

3.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos parâmetros inflamatórios estudados (migração celular, exsudação, MPO, ADA, NO_x e IL-17A) foram expressos utilizando-se a média \pm erro padrão da média (e.p.m.), e estes resultados foram analisados pelo programa de estatística GraphPad Prism[®] versão 3.00 (San Diego, Califórnia, EUA.). As diferenças estatísticas dos parâmetros analisados entre os grupos controle e tratados com o material vegetal ou fármacos de referência foram realizados por meio do teste de variância ANOVA (teste paramétrico), complementado pelo teste de Dunnett. Quando necessário, utilizou-se o teste *t* de Student (não-pareado). Para todas as análises estatísticas, valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1 EFEITO DO EXTRATO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA *LOTUS CORNICULATUS* VAR. SÃO GABRIEL SOBRE A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS E EXSUDAÇÃO.

Na pleurisia induzida por bradicinina, o extrato bruto hidroalcoólico (CE) inibiu os leucócitos nas doses de 50 a 200 mg/kg (% de inibição: 50 mg/kg: $50,00 \pm 2,32\%$, 100 mg/kg: $36,14 \pm 4,22\%$ e 200 mg/kg: $48,69 \pm 6,96\%$) ($p < 0,01$) (Figura 4A). Esta inibição ocorreu às custas da inibição de neutrófilos (% de inibição: 50 mg/kg: $66,35 \pm 4,85\%$, 100 mg/kg: $57,74 \pm 3,07\%$ e 200 mg/kg: $73,08 \pm 2,02\%$) ($p < 0,01$) (Figura 4B). Além disso, as doses de 25 a 200 mg/kg foram capazes de inibir a exsudação (% de inibição: 25 mg/kg: $29,02 \pm 12,91\%$, 50 mg/kg: $40,25 \pm 1,66\%$, 100 mg/kg: $44,65 \pm 8,10\%$ e 200 mg/kg: $28,69 \pm 4,32\%$) ($p < 0,05$) (Figura 4C).

A respeito da fração hexano (HEX), observa-se que as doses de 5 a 25 mg/kg foram capazes de inibir os leucócitos (% de inibição: 5 mg/kg: $41,58 \pm 9,32\%$, 10 mg/kg: $27,82 \pm 5,94\%$ e 25 mg/kg: $28,08 \pm 5,53\%$) ($p < 0,05$) (Figura 5A), os neutrófilos (% de inibição: 5 mg/kg: $65,13 \pm 8,49\%$, 10 mg/kg: $58,24 \pm 5,64\%$ e 25 mg/kg: $55,05 \pm 5,76\%$) ($p < 0,01$) (Figura 5B) e a exsudação (% de inibição: 5 mg/kg: $29,94 \pm 7,00\%$, 10 mg/kg: $29,12 \pm 7,13\%$ e 25 mg/kg: $19,82 \pm 4,16\%$) ($p < 0,05$) (Figura 5C).

A fração acetato de etila (AcOEt) mostrou um perfil anti-inflamatório semelhante à fração hexano. Esta fração, nas doses de 5 a 25 mg/kg inibiu os leucócitos (% de inibição: 5 mg/kg: $27,72 \pm 8,83\%$, 10 mg/kg: $32,18 \pm 4,70\%$ e 25 mg/kg: $34,21 \pm 4,56\%$) ($p < 0,05$) (Figura 6A), os neutrófilos (% de inibição: 5 mg/kg: $65,39 \pm 5,81\%$, 10 mg/kg: $67,26 \pm 2,55\%$ e 25 mg/kg: $54,81 \pm 10,01\%$) ($p < 0,01$) (Figura 6B) e a exsudação (% de inibição: 5 mg/kg: $52,46 \pm 4,31\%$, 10 mg/kg: $59,02 \pm 10,37\%$ e 25 mg/kg: $59,53 \pm 10,23\%$) ($p < 0,05$) (Figura 6C).

A fração butanólica (BuOH), similarmente à fração HEX e AcOEt, inibiu os leucócitos nas doses de 5 a 25 mg/kg (% de inibição: 5 mg/kg: $27,31 \pm 4,06\%$, 10 mg/kg: $37,72 \pm 9,28\%$ e 25 mg/kg: $46,49 \pm 3,82\%$) ($p < 0,05$) (Figura 7A) e os neutrófilos (% de inibição: 5 mg/kg: $65,13 \pm 8,49\%$, 10 mg/kg: $58,24 \pm 5,64\%$ e 25 mg/kg: $55,05 \pm 5,76\%$) ($p < 0,01$) (Figura 7B) e a exsudação (% de inibição: 5 mg/kg: $29,94 \pm 7,00\%$, 10 mg/kg: $29,12 \pm 7,13\%$ e 25 mg/kg: $19,82 \pm 4,16\%$) ($p < 0,05$) (Figura 7C).

de inibição: 5 mg/kg: $51,99 \pm 9,11\%$, 10 mg/kg: $54,20 \pm 6,22\%$ e 25 mg/kg: $73,40 \pm 2,85\%$) ($p < 0,01$) (Figura 7B). As doses de 10 e 25 mg/kg da fração BuOH inibiram também a exsudação (% de inibição: 10 mg/kg: $23,35 \pm 12,00\%$ e 25 mg/kg: $29,51 \pm 6,25\%$) ($p < 0,05$) (Figura 7C).

A fração aquosa (Aq) foi menos potente quando comparada às frações anteriores. A fração Aq inibiu os leucócitos somente em doses superiores (% de inibição: 25 mg/kg: $60,26 \pm 6,54\%$) ($p < 0,01$) (Figura 8A). Os neutrófilos foram inibidos nas doses de 5 a 25 mg/kg (% de inibição: 5 mg/kg: $37,17 \pm 5,53\%$, 10 mg/kg: $47,60 \pm 9,43\%$ e 25 mg/kg: $78,85 \pm 1,66\%$) ($p < 0,05$) (Figura 8B) e a exsudação foi inibida nas doses de 10 e 25 mg/kg (% de inibição: 10 mg/kg: $27,87 \pm 9,65\%$ e 25 mg/kg: $57,01 \pm 8,79\%$) ($p < 0,05$) (Figura 8C).

Uma vez que as frações HEX e AcOEt apresentaram o melhor efeito anti-inflamatório nos parâmetros analisados, o próximo passo foi isolar os compostos dessas duas frações e determinar quais destes compostos poderiam ser os responsáveis pela inibição da inflamação induzida pela bradicinina no modelo experimental da pleurisia, em camundongos.

O composto **1** (ácido oleanólico), isolado da fração hexano, nas doses de 1 a 5 mg/kg, inibiu os leucócitos (% de inibição: 1 mg/kg: $39,54 \pm 6,02\%$, 2,5 mg/kg: $57,88 \pm 7,51\%$ e 5 mg/kg: $72,37 \pm 7,37\%$) ($p < 0,01$) (Figura 9A) e os neutrófilos (% de inibição: 1 mg/kg: $73,02 \pm 3,69\%$, 2,5 mg/kg: $82,01 \pm 4,77\%$ e 5 mg/kg: $90,56 \pm 3,41\%$) ($p < 0,01$) (Figura 9B). Porém, a única dose deste composto capaz de inibir a exsudação foi a dose de 5 mg/kg (% de inibição: 5 mg/kg: $36,06 \pm 8,76\%$) ($p < 0,05$) (Figura 9C).

O composto **2** (canferitrina), isolado da fração acetato de etila, nas doses de 5 e 10 mg/kg, inibiu também os leucócitos (% de inibição: 5 mg/kg: $29,35 \pm 8,81\%$ e 10 mg/kg: $30,03 \pm 9,82\%$) ($p < 0,05$) (Figura 10A). Os neutrófilos foram inibidos nas doses de 1 a 10 mg/kg (% de inibição: 1 mg/kg: $73,89 \pm 3,47\%$, 5 mg/kg: $66,85 \pm 13,85\%$ e 10 mg/kg: $46,68 \pm 7,50\%$) ($p < 0,01$) (Figura 10B). Além disso, a exsudação foi inibida somente na

dose de 10 mg/kg (% de inibição: 10 mg/kg: $73,89 \pm 3,47\%$) ($p < 0,01$) (Figura 10C).

Podemos notar que o composto **1** (ácido oleanólico) mostrou efeito anti-inflamatório superior ao composto **2** (canferitrina) em inibir a inflamação induzida por bradicinina, uma vez que doses menores (1 a 5 mg/kg) do composto **1** inibiram os mesmos parâmetros inflamatórios (leucócitos e exsudação) que as doses utilizadas do composto **2** (5 a 10 mg/kg). Inclusive para os parâmetros leucócitos, neutrófilos e exsudação os valores de inibição observados foram semelhantes aos valores basais (animais tratados com salina).

Os fármacos de referência, indometacina e dexametasona inibiram significativamente todos os parâmetros inflamatórios estudados (leucócitos: Indo: $48,29 \pm 3,27\%$ e Dex: $54,63 \pm 4,56\%$, neutrófilos: Indo: $79,35 \pm 8,75\%$ e Dex: $84,07 \pm 9,63\%$, exsudação: Indo: $72,33 \pm 5,32\%$ e Dex: $58,70 \pm 3,56\%$, respectivamente) ($p < 0,01$) (Figuras: 4 a 10).

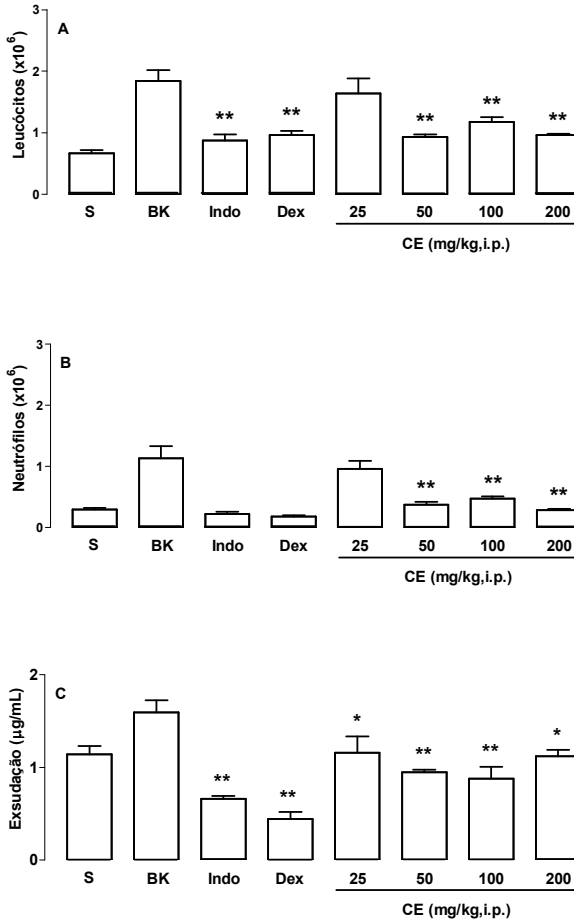


Figura 4: Efeito do extrato bruto (CE) (25 - 200 mg/kg, i.p.) da *Lotus corniculatus* administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela bradicinina (20 nmol/cav.), em camundongos. Efeito do CE sobre: A) Leucócitos, B) Neutrófilos, C) Exsudação. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), BK = animais tratados somente com bradicinina (20 nmol/cav.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.; 0,5 h), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas, n = 6 animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

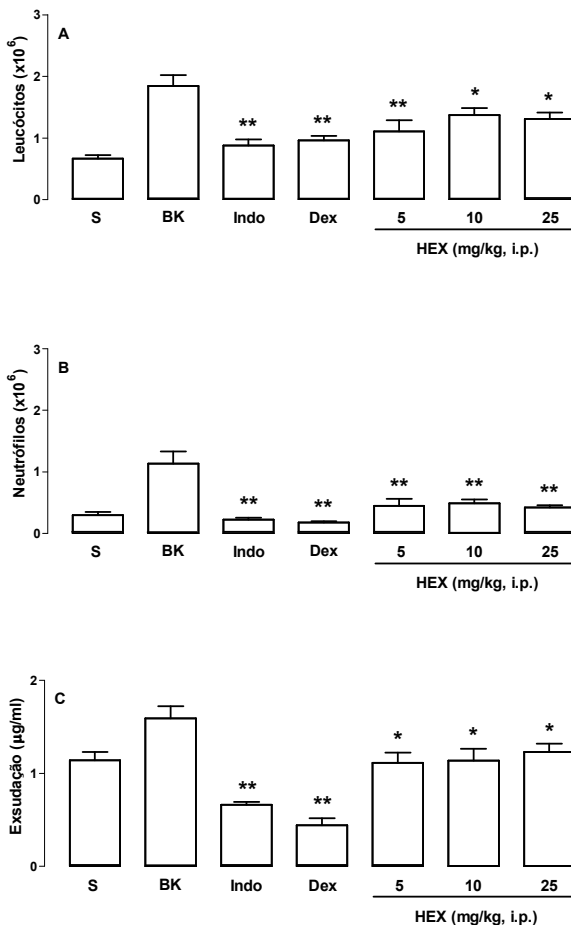


Figura 5: Efeito da fração hexano (HEX) (5 - 25 mg/kg, i.p.) isolada da *Lotus corniculatus* administrada 0,5 h antes da indução da pleurisia pela bradicinina (20 nmol/cav.), em camundongos. Efeito do HEX sobre: A) Leucócitos, B) Neutrófilos, C) Exsudação. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), BK = animais tratados somente com bradicinina (20 nmol/cav.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.; 0,5 h), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas, n = 6 animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

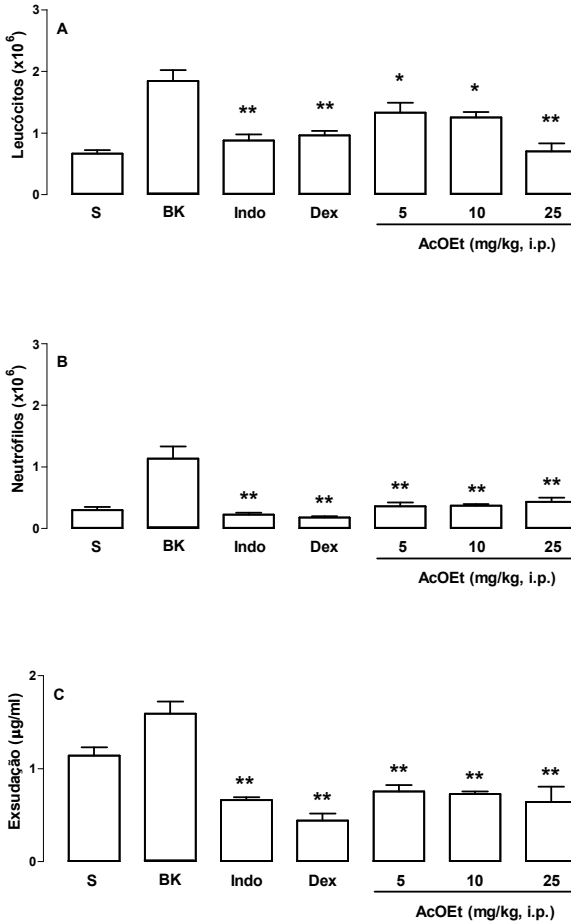


Figura 6: Efeito da fração acetato de etila (AcOEt) (5 - 25 mg/kg, i.p.) isolada da *Lotus corniculatus* administrada 0,5 h antes da indução da pleurisia pela bradicinina (20 nmol/cav.), em camundongos. Efeito do AcOEt sobre: A) Leucócitos, B) Neutrófilos, C) Exsudação. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), BK = animais tratados somente com bradicinina (20 nmol/cav.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.; 0,5 h), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas, $n = 6$ animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

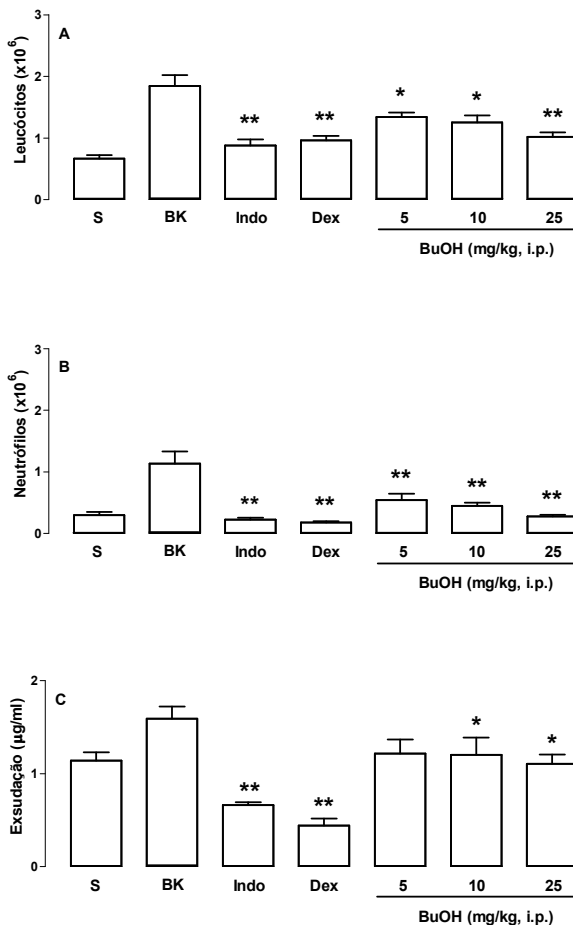


Figura 7: Efeito da fração butanólica (BuOH) (5 - 25 mg/kg, i.p.) isolada da *Lotus corniculatus* administrada 0,5 h antes da indução da pleurisia pela bradicinina (20 nmol/cav.), em camundongos. Efeito do BuOH sobre: A) Leucócitos, B) Neutrófilos, C) Exsudação. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), BK = animais tratados somente com bradicinina (20 nmol/cav.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.; 0,5 h), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas, $n = 6$ animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

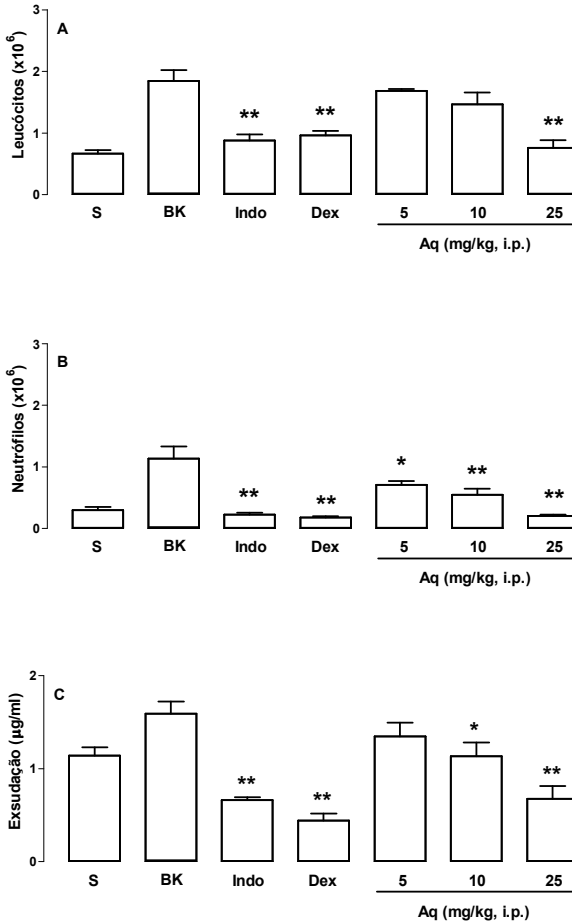


Figura 8: Efeito da fração aquosa (Aq) (5 - 25 mg/kg, i.p.) isolada da *Lotus corniculatus* administrada 0,5 h antes da indução da pleurisia pela bradicinina (20 nmol/cav.), em camundongos. Efeito do Aq sobre: A) Leucócitos, B) Neutrófilos, C) Exsudação. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), BK = animais tratados somente com bradicinina (20 nmol/cav.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.; 0,5 h), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas, $n = 6$ animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

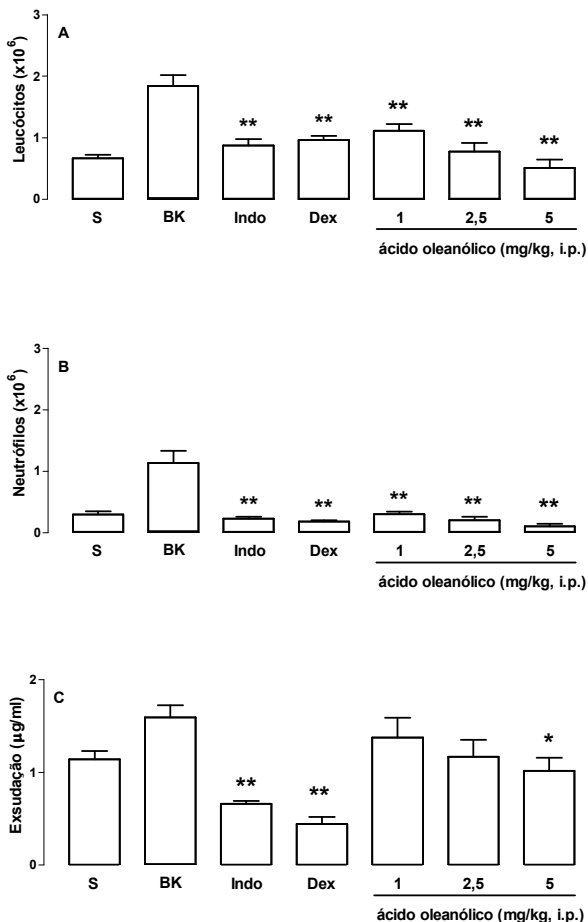


Figura 9: Efeito do ácido oleanólico (5 - 25 mg/kg, i.p.) isolada da *Lotus corniculatus* administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela bradicinina (20 nmol/cav.), em camundongos. Efeito do ácido oleanólico sobre: A) Leucócitos, B) Neutrófilos, C) Exsudação. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), BK = animais tratados somente com bradicinina (20 nmol/cav.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.; 0,5 h), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas, n = 6 animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

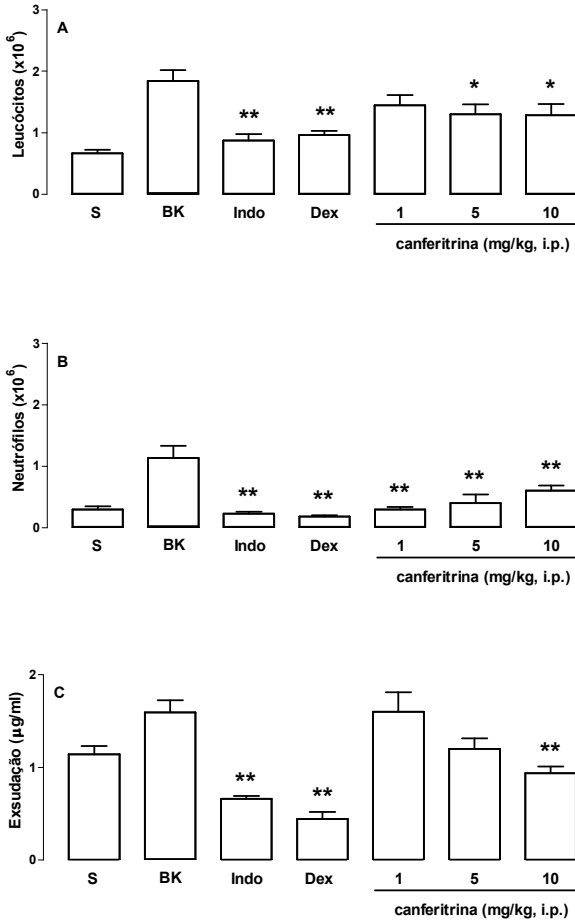


Figura 10: Efeito do canferitrina (1 - 10 mg/kg, i.p.) isolada da *Lotus corniculatus* administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela bradicinina (20 nmol/cav.), em camundongos. Efeito do canferitrina sobre: A) Leucócitos, B) Neutrófilos, C) Exsudação. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), BK = animais tratados somente com bradicinina (20 nmol/cav.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.; 0,5 h), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas, $n = 6$ animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.2 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA *LOTUS CORNICULATUS* VAR. SÃO GABRIEL, SOBRE A ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE.

O extrato bruto, frações e compostos isolados da *Lotus corniculatus* var. São Gabriel, inibiram a atividade da mieloperoxidase (MPO) (% de inibição: CE: 50 mg/kg: 39,92 ± 11,60%, HEX: 10 mg/kg: 57,99 ± 5,79%, AcOEt 10 mg/kg: 49,22 ± 2,71%, BuOH: 10 mg/kg: 59,15 ± 4,93%, Aq: 25 mg/kg: 53,30 ± 3,26%; ácido oleanólico: 1 mg/kg: 33,21 ± 16,26% e canferitrina: 5 mg/kg: 19,47 ± 8,77% ($p < 0,05$) (Figure 11).

A indometacina e a dexametasona também reduziram significativamente a atividade da MPO, Indo: 22,32 ± 1,18% e Dex: 48,84 ± 3,54% ($p < 0,01$) (Figura 11).

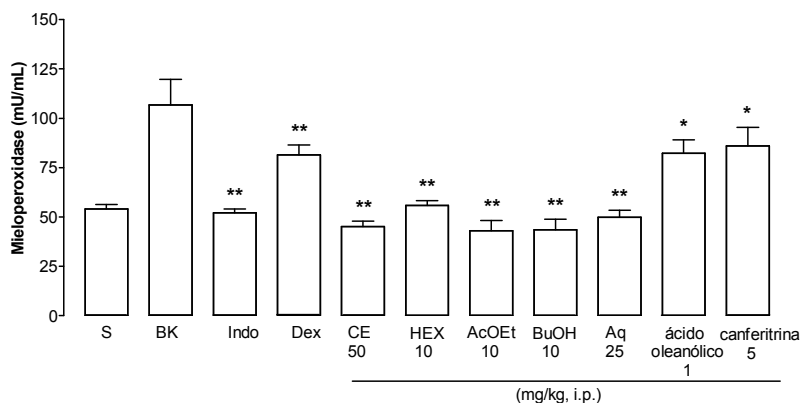


Figura 11: Efeito do extrato bruto (CE: 50 mg/kg), fração hexano (HEX: 10 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 10 mg/kg), fração butanólica (BuOH: 10 mg/kg), fração aquosa (Aq: 25 mg/kg), ácido oleanólico (1 mg/kg) e canferitrina (5 mg/kg) isolada da *Lotus corniculatus* sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO), no modelo de pleurisia induzida por bradicinina (20 nmol/cav.). S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), BK = animais tratados somente com bradicina (20 nmol/cav.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.; 0,5 h), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média ± e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas, n = 6 animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.3 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA *LOTUS CORNICULATUS* VAR. SÃO GABRIEL, SOBRE A ATIVIDADE DA ADENOSINA-DEAMINASE.

O extrato bruto, frações e compostos isolados da *Lotus corniculatus* var. São Gabriel, inibiram a atividade da adenosina-deaminase (ADA) (% de inibição: CE: 50 mg/kg: 60,32 ± 15,11%, HEX: 10 mg/kg: 47,02 ± 7,04%; AcOEt: 10 mg/kg: 72,45 ± 8,42%, BuOH: 10 mg/kg: 41,08 ± 6,37%, Aq: 25 mg/kg: 36,05 ± 6,77%, ácido oleanólico: 1 mg/kg: 82,75 ± 4,28% e canferitrina: 5 mg/kg: 84,17 ± 3,07% ($p < 0.05$) (Figura 12).

A indometacina e a dexametasona também reduziram significativamente a atividade da ADA, Indo: 38,95 ± 2,83% e Dex: 48,42 ± 4,82% ($p < 0.05$) (Figura 12).

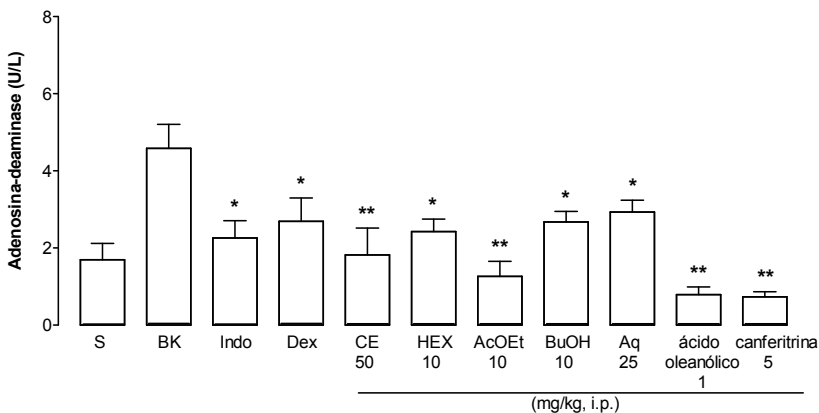


Figura 12: Efeito do extrato bruto (CE: 50 mg/kg), fração hexano (HEX: 10 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 10 mg/kg), fração butanólica (BuOH: 10 mg/kg), fração aquosa (Aq: 25 mg/kg), ácido oleanólico (1 mg/kg) e canferitrina (5 mg/kg) isolada da *Lotus corniculatus* sobre a atividade da adenosina-deaminase (ADA), no modelo de pleurisia por bradicinina (20 nmol/cav.). S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), BK = animais tratados somente com bradicinina (20 nmol/cav Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.; 0,5 h), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média ± e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas, n = 6 animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.4 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA *LOTUS CORNICULATUS* VAR. SÃO GABRIEL, SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE NITRATO/NITRITO.

O extrato bruto, frações e compostos isolados da *Lotus corniculatus* var. São Gabriel, inibiram as concentrações de nitrato/nitrito (NO_x) (% de inibição: CE: 50 mg/kg: 16,70 \pm 2,11%, HEX: 10 mg/kg: 49,25 \pm 3,04%, AcOEt: 10 mg/kg: 56,38 \pm 3,20%, BuOH: 10 mg/kg: 44,38 \pm 1,92%, Aq: 25 mg/kg: 16,74 \pm 4,14%; ácido oleanólico: 1 mg/kg: 21,75 \pm 3,45% e canferitrina: 5 mg/kg: 26,87 \pm 3,06% ($p < 0.05$) (Figura 13).

A indometacina e a dexametasona também reduziram significativamente NO_x , Indo: 44,80 \pm 3,14% e Dex: 65,26 \pm 3,69% ($p < 0,01$) (Figura 13).

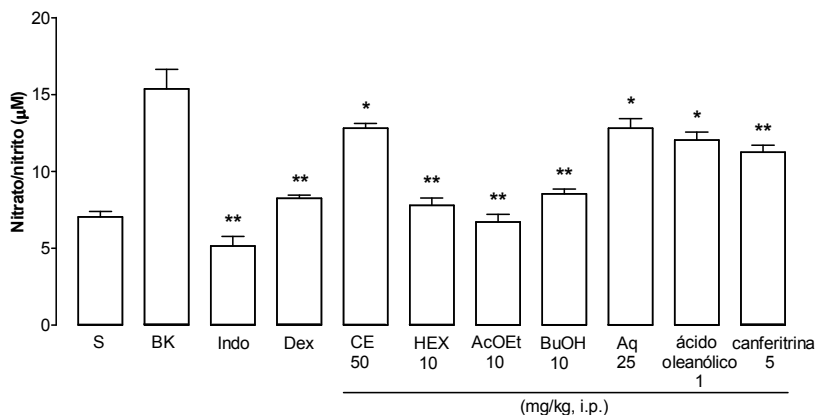


Figura 13: Efeito do extrato bruto (CE: 50 mg/kg), fração hexano (HEX: 10 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 10 mg/kg), fração butanólica (BuOH: 10 mg/kg), fração aquosa (Aq: 25 mg/kg), ácido oleanólico (1 mg/kg) e canferitrina (5 mg/kg) isolada da *Lotus corniculatus* sobre as concentrações de nitrato/nitrito (NO_x), no modelo de pleurisia induzida por bradicina (20 nmol/cav.). S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), BK = animais tratados somente com bradicinina (20 nmol/cav.), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas, n = 6 animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.5 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA *LOTUS CORNICULATUS* VAR. SÃO GABRIEL, SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE IL-17A.

O extrato bruto, frações e compostos isolados da *Lotus corniculatus* var. São Gabriel inibiram as concentrações de IL-17A (% de inibição: CE: 50 mg/kg: 71,42 ± 1,24%, HEX: 10 mg/kg: 77,38 ± 1,23%, AcOEt: 10 mg/kg: 62,91 ± 1,29%, BuOH: 10 mg/kg: 68,20 ± 1,34%, Aq: 25 mg/kg: 66,59 ± 1,15%, ácido oleanólico: 1 mg/kg: 24,62 ± 1,24%, e canferitrina: 5 mg/kg: 32,23 ± 1,32 ($p < 0.01$) (Figura 14).

A indometacina e a dexametasona também reduziram significativamente a concentração de IL-17A, Indo: 44,80 ± 2,62% e Dex: 58,83 ± 3,59% ($p < 0.01$) (Figura 14).

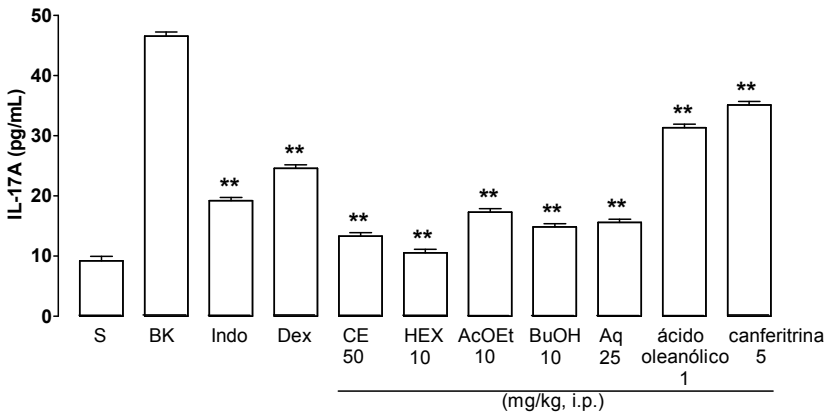


Figura 14: Efeito do extrato bruto (CE: 50 mg/kg), fração hexano (HEX: 10 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 10 mg/kg), fração butanólica (BuOH: 10 mg/kg), fração aquosa (Aq: 25 mg/kg), ácido oleanólico (1 mg/kg) e canferitrina (5 mg/kg) isolada da *Lotus corniculatus* sobre a concentração de IL-17A, no modelo de pleurisia induzida por bradicina (20 nmol/cav.). S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), BK = animais tratados somente com bradicinina (20 nmol/cav Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.; 0,5 h), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média ± e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas, n = 6 animais. ** $p < 0,01$.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo avaliou-se o efeito do extrato bruto (CE), obtido das partes aéreas da *Lotus corniculatus* variedade São Gabriel, bem como das frações: hexano (HEX), acetato de etila (AcOEt), butanólica (BuOH) e aquosa (Aq), e compostos isolados das frações HEX e AcOEt respectivamente: ácido oleanólico e canferitrina, administrados por via sistêmica, utilizando-se o no modelo da pleurisia induzida pela bradicinina, em camundongos.

Os resultados demonstraram que o extrato bruto hidroalcoólico (CE) da *Lotus corniculatus* variedade São Gabriel e frações (HEX, AcOEt, BuOH e Aq) apresentaram importante atividade anti-inflamatória, caracterizada pela diminuição da exsudação e do influxo de leucócitos, bem como pela redução da atividade das enzimas MPO e ADA, e das concentrações dos mediadores pró-inflamatórios, NO e IL-17, na cavidade pleural de animais inflamados. Além disso, muitos dos valores dos parâmetros inflamatórios estudados foram iguais aqueles observados nos animais tratados com solução salina estéril. Este fato mostra que o tratamento prévio dos animais com o material vegetal da *Lotus corniculatus* promoveu efeito anti-inflamatório conduzindo os parâmetros analisados a valores basais.

A literatura demonstra a participação de leucócitos e principalmente dos neutrófilos na resposta inflamatória aguda. Dentre estes estudos, se destacam aqueles realizados por Busnardo et al., (2010) que observaram aumento nas concentrações de neutrófilos, utilizando o modelo de pleurisia induzida carragenina, bradicinina, histamina, substância P, dextran ou PGE₂.

O efeito da bradicinina no aumento da migração leucocitária já é bem conhecido. Vianna & Calixto (1998) observaram o aumento do influxo de neutrófilos no modelo de pleurisia induzida por des-Arg⁹-BK, agonista seletivo dos receptores B₁ de bradicinina. O tratamento destes animais com antagonistas seletivos de receptor B₁ da BK (des-Arg⁹-BK ou des-Arg⁹-NPC 17731) diminuiu o influxo destas células.

Além da migração leucocitária, observou-se ainda que o extrato bruto hidroalcoólico (CE) e as frações (HEX, AcOEt,

BuOH e Aq) foram efetivos em inibir este parâmetro da inflamação. Esse efeito sobre o influxo de leucócitos foi associado à diminuição da atividade das enzimas MPO e ADA, uma vez que o extrato bruto hidroalcoólico (CE) e as frações (HEX, AcOEt, BuOH e Aq) foram capazes de inibir a atividade dessas enzimas, que são marcadores de ativação de neutrófilos e mononucleares, respectivamente (FRÖDE & MEDEIROS, 2001).

Vários são os estudos que demonstram que a MPO e a ADA são marcadores de ativação nuclear. Dentre os estudos que corroboram esta afirmativa, destacam-se aqueles realizados por Leeuwen et al. (2008), que revelaram aumento na atividade da MPO em placas ateroscleróticas de camundongos *knockout* para o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL). Este efeito estava relacionado ao aumento de neutrófilos nesta lesão. Buesing et al. (2010) também mostraram o aumento da concentração de MPO, no pulmão de camundongo tratados com LPS, no modelo de lesão aguda de pulmão. Shi et al. (2010), mostraram diminuição de leucócitos totais e de neutrófilos seguido da diminuição na atividade da MPO no pulmão de camundongos tratados com o flavonóide glicirrizinato de monoamônio (MAG), no modelo de lesão aguda de pulmão induzida por LPS. Koga et al. (2010) observaram que animais tratados com peptídeo natriurético atrial humano (ANPh) apresentavam diminuição do edema e das concentrações de IL-1 β , IL-6, além da atividade da MPO, no modelo de lesão aguda de pulmão induzida por LPS, em camundongos.

Em relação à enzima adenosina-deaminase, é importante mencionar que o aumento extracelular de adenosina estimula a expressão de receptores de adenosina (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3) (RIKSEN et al., 2008). A ativação do receptor A_{2A} promove a liberação de citoninas anti-inflamatórias (IL-10), diminui a lesão tecidual pela inibição da geração de EROs, promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , INF- γ , IL-4, IL-6, IL-12), leucotrieno B4 (LTB4), a expressão de moléculas de adesão e a migração de neutrófilos para o local da inflamação (KUMAR & SHARMA, 2009). Já a ativação do receptor A_{2B} estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10,

IL-13, IL-19), histamina e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (HASKÓ et al., 2008).

Estudos realizados por Linde et al., (2006) mostraram que o uso de ATL-146e, um agonista seletivo de receptor A_{2A} , reduziu a infiltração de leucócitos e de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , INF- γ e IL-4), no modelo de inflamação do íleo induzida por toxina A de *Clostridium difficile* em camundongos. Já a administração de ATL-801, um antagonista seletivo do receptor A_{2B} , promoveu diminuição na produção de IL-6 e infiltração de neutrófilos, além de uma redução na lesão da mucosa do cólon no modelo de colite induzida por dextran sulfato de sódio (DSS) em camundongos (KOLACHALA et al., 2008).

Apesar de que não estudada a ativação de receptores da adenosina, pode-se hipotetizar que o efeito observado neste estudo em relação à inibição desta enzima pela *Lotus corniculatus* var. São Gabriel, poderia resultar no aumento do autacóide adenosina que, por sua vez, atuaria em receptores do tipo A_{2A} em neutrófilos, promovendo a liberação de mediador anti-inflamatório (IL-10). Este efeito portanto, estaria relacionado a um dos efeitos anti-inflamatórios exercido pela *Lotus corniculatus*.

Além disso, neste estudo, com relação à atividade da enzima pró-inflamatória MPO, o extrato bruto hidroalcoólico e as frações mostraram perfil de inibição semelhante quando comparado aos fármacos de referência.

Já com relação à exsudação, o extrato bruto hidroalcoólico (CE) e as frações (HEX, AcOEt, BuOH, Aq) inibiram este parâmetro, porém mostrando diferentes perfis de inibição (% de inibição diferentes e diferentes doses).

Uma vez que o óxido nítrico é um importante agente e está relacionado a quimiotaxia celular (TRIPATHI, 2007), foi estudado o efeito da *Lotus corniculatus* variedade São Gabriel sobre este mediador pró-inflamatório. Já é bem conhecido o papel do NO como mediador pró-inflamatório. Yu; Ouyang & Li (2009) observaram aumento na produção de NO e expressão de iNOS no pulmão, no modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS, em ratos. Neste mesmo estudo se observou que animais tratados previamente com dexametasona diminuíram de forma

significativa a concentração de NO, além do decréscimo na expressão de iNOS no pulmão. Kenyon, Gohil & Last (2003) observaram que a expressão e a atividade da iNOS são necessárias para regulação da intensidade da resposta inflamatória em camundongos *knockout* para iNOS^{-/-} no modelo de inflamação das vias aéreas induzida por ovalbumina. Sunil et al., (2010) ao expor ratos ao gás mostarda, observaram por meio de análise histológica do trato respiratório alterações compatíveis com bronquiolite necrosante e inflamação, associados ao aumento de proteínas totais no lavado bronquiolar. Além disso, se observou ainda o aumento do influxo de leucócitos (neutrófilos e macrófagos), confirmando a lesão no tecido epitelial do pulmão. Além disso, testes imunohistoquímicos mostraram também aumento na expressão de iNOS e COX-2 no pulmão.

O extrato bruto hidroalcoólico (CE) da *Lotus corniculatus* variedade São Gabriel e suas frações (HEX, AcOEt, BuOH, Aq), reduziram também as concentrações de nitrato/nitrito, indicadores da produção de NO.

A IL-17 atualmente é considerada uma das principais citocinas relacionadas ao processo inflamatório, Hoshino et al. (1999), mostraram que a administração intratecal de IL-17 aumentou o influxo de neutrófilos no fluido broncoalveolar de ratos. Estudos *in vitro* realizados por Laan et al. (1999) observaram que a administração de IL-17 humana aumentou a liberação de IL-8 em células humanas do epitélio bronquiolar e endoteliais venosa, e aumento na expressão de RNAm para IL-8 em células do epitélio bronquiolar. Neste mesmo estudo (Laan et al., 1999) observaram que a administração de anti-IL-8 bloqueou o influxo de neutrófilos em experimentos *in vitro* utilizando células humanas do epitélio bronquiolar e endoteliais venosas.

Uma vez que o extrato bruto (CE), as frações HEX, AcOEt, BuOH e Aq foram efetivos em inibir os leucócitos, exsudação, a MPO, a ADA, o NO e a IL-17A na inflamação induzida por BK, avaliou-se quais os possíveis compostos poderiam ser responsáveis por este efeito anti-inflamatório. Nesta etapa foram isolados os compostos ácido oleanólico e o canferitina da fração HEX e AcOEt, respectivamente.

Os resultados revelaram que os compostos isolados ácido oleanólico e canferitrina inibiram leucócitos exsudação, MPO, ADA, NO_x e IL-17A. O composto ácido oleanólico foi mais potente em relação ao composto canferitrina, uma vez que uma dose menor (ácido oleanólico: 1 mg/kg) apresentou o mesmo efeito anti-inflamatório inibidor de todos os parâmetros estudados, correspondente à canferitrina em doses superiores (5 mg/kg).

Ao comparar os compostos isolados aos fármacos de referência, observou-se que o ácido oleanólico e a canferitrina apresentara atividade semelhante à dexametasona para todos os parâmetros analisados, exceto para exsudação e NO. Já quando comparados os compostos isolados à indometacina, mostraram-se perfis semelhantes, exceto para os parâmetros exsudação, MPO e NO, uma vez que as análises estatísticas mostraram $p > 0,05$ para os demais parâmetros analisados.

Estes resultados estão de acordo com a literatura, pois em estudos *in vivo* realizados por Giner-Larza et al. (2001) mostraram que o ácido oleanólico possui atividade anti-inflamatória, inibindo tanto o edema de orelha induzido por 12-deoxiforbol-13-fenil acetato (DPP), como o edema de pata induzido por BK ou fosfolipase A₂ em camundongos. Além disso, neste mesmo estudo, foi observada diminuição significativa da dermatite induzida por aplicações de 12-*o*-tetradecanoil-13-acetato (TPA) por via subcutânea em orelha de camundongos. Huang et al. (2010) observaram que este mesmo composto inibiu o edema de orelha induzida por xileno, também em camundongos. Lee et al. (2010) observaram que o ácido oleanólico promoveu diminuição significativa das concentrações de histamina e fosfolipase A₂ e diminuição de leucócitos, do tipo neutrófilos e eosinófilos, no modelo de asma induzida por ovalbumina em cobaias. Singh et al. (1992), ao utilizarem o modelo de pleurisia induzida por carragenina em ratos, observaram que estes animais tratados previamente com ácido oleanólico apresentaram redução significativa do exsudato e da infiltração leucocitária no lavado pleural.

Estudos *in vitro* utilizando ácido oleanólico têm mostrado também atividade anti-inflamatória, como aqueles realizados por

Suh et al. (2007), que observaram diminuição na liberação de óxido nítrico e inibição do NF- κ B em macrófagos de camundongo (raw 264.7) induzido por LPS. Takada et al. (2010), observaram que este composto inibiu significativamente a expressão de E-selectina e seu respectivo RNA mensageiro, via supressão do NF- κ B em cultura de células endoteliais do cordão umbilical de humanos (HUVECs) induzidas por TNF- α .

Em relação à canferitrina, estudos *in vivo* também revelaram que este composto em diferentes modelos de inflamação, inibiu o edema de orelha induzido por cróton e a peritonite induzida por carragenina em camundongos (MELO et al., 2009). O canferol também apresentou atividade anti-inflamatória pela inibição da concentração de ciclooxigenase-2 (COX-2), da proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1), da atividade da iNOS e da ativação de linfócito T, além da inibição do NF- κ B, no rim de ratos idosos (PARK et al., 2009).

Ainda, se comparar os resultados obtidos do material vegetal com os fármacos de referência como a indometacina (inibidor da COX-2) e dexametasona (inibidor da fosfolipase A₂, COX-2, fator de transcrição nuclear, entre outros) verifica-se que a planta foi tão eficaz quanto os fármacos de referência em inibir a inflamação estudada. Vale a pena salientar que o ácido oleanólico foi mais potente que a indometacina e que a canferitrina também mostrou a mesma potência que este fármaco de referência em inibir a resposta inflamatória estudada.

Em relação aos parâmetros inflamatórios estudados como migração celular, migração leucocitária, enzimas (ADA e MPO) e mediadores pró-inflamatórios (NO e IL-17), o extrato bruto hidroalcoólico, suas frações e compostos isolados foram capazes em inibir a resposta inflamatória induzida por bradicinina. Além disso, as frações AcOEt, HEX, e BuOH foram mais potentes que a fração Aq em inibir estes parâmetros, uma vez que doses menores (AcOEt, HEX: 10 mg/kg) inibiram esta resposta inflamatória mais efetivamente que dose maiores da fração aquosa (Aq: 25 mg/kg).

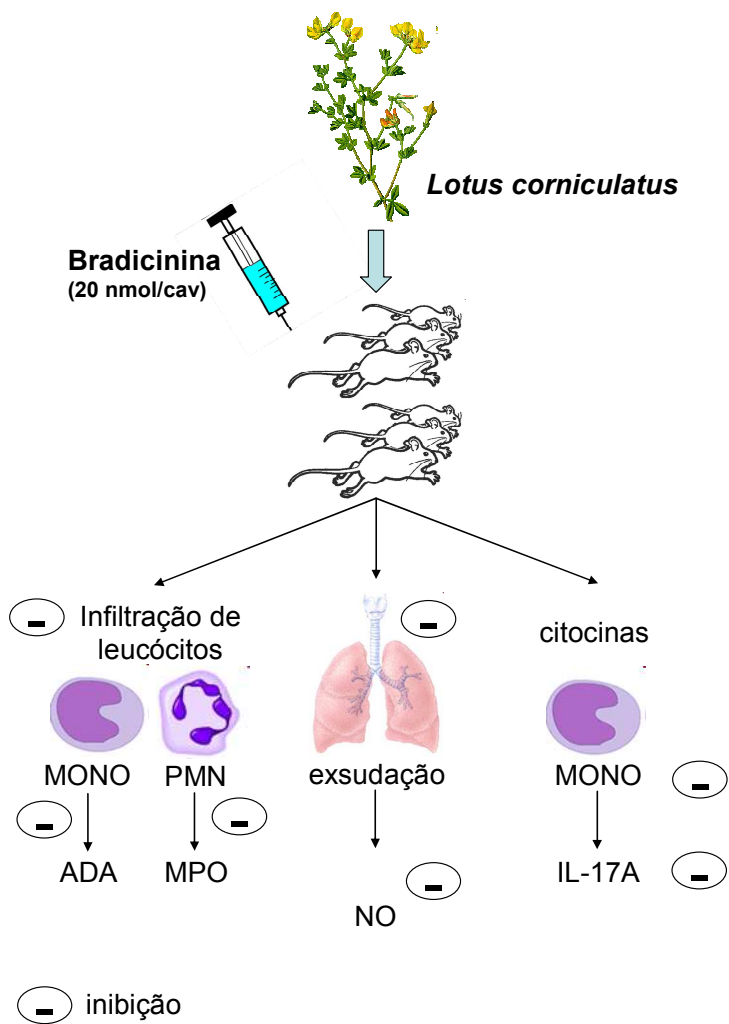
Em relação aos compostos isolados, ambos também foram eficazes em inibir esta inflamação, no entanto, o ácido oleanólico também foi mais potente em inibir os parâmetros estudados que

a canferitrina, uma vez que o ácido oleanólico inibiu a inflamação nas doses de 1 mg/kg, enquanto a canferitrina na dose de 5 mg/kg.

Ainda em relação à canferitrina, estudo *in vitro* realizado por Fang; Rao & Tzeng (2005) observou-se que a canferitrina foi capaz de inibir a concentração de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-12) em macrófagos de camundongos induzidos por LPS/INF- γ .

6 CONCLUSÃO

Estes resultados mostram que a *Lotus corniculatus* variedade São Gabriel possui importante efeito anti-inflamatório, principalmente inibindo o influxo de leucócitos e exsudação. Este efeito parece ser em parte mediado pela inibição das enzimas MPO e ADA, e dos mediadores NO e da IL-17A. Além disso, os compostos ácido oleanólico e canferitrina parecem ser responsáveis, pelo menos em parte, pelo efeito anti-inflamatório observado.



REFERÊNCIAS

ABDEL-GHANI, A. E.; HAFEZ, S. S.; ABDEL-AZIZ, E. M.; EL-SHAZLY, A. M. Phytochemical and biological studies of *L. corniculatus* cv. *ternuifolius* L. growing Egypt. **Journal Pharmaceutical Science**, v. 15, p. 103-108, 2001.

ABRAHAM, W.M.; SCURI, M.; FARMER, S.G. Peptide and non-peptide bradykinin receptor antagonists: Role in allergic airway disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, p. 215-221, 2006.

AERTS, R.J.; BARRY, T.N.; McNABB, W.C. Polyphenol and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. **Agriculture Ecosystem & Environment**, v. 75, p. 1-12, 1999.

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and pois nous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114-140, 2007.

ALMEIDA, R.N.; NAVARRO, D.S.; BARBOSA-FILHO, J.M. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine**, v. 8, p. 310-322, 2001.

ARNHOLD, J.; FLEMMIG, J. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, p. 92-106, 2010.

BARBOSA-FILHO, J.M.; NASCIMENTO-JÚNIOR, F.A.; TOMAZ, A.C.A.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; SILVA, M.S.; CUNHA, E.V.L.; SOUZA, M.F.V.; BATISTA, L.M.; DINIZ, M.F.F.M. Natural products with antileprotic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 141-148, 2007.

BARBOSA-FILHO, J.M.; ALENCAR, A.A.; NUNES, X.P.; TOMAZ, A.C.A.; SENA-FILHO, J.G.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; SILVA, M.S.; SOUZA, M.F.V.; DA-CUNHA, E.V.L. Sources of alpha-, beta-,

gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 135-154, 2008.

BATE-SMITH E.C. The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. 1. Dicotyledons. **Journal of the Linnean Society of Botany**, v. 58, p. 95-173, 1965.

BENGHIAT, F.S.; CHARBONNIER, L.M.; VOKAER, B.; WILDE, V.; MOINE, A. Interleukin 17-producing T helper cells in alloimmunity. **Transplantation Reviews**, v. 23, p. 11-18, 2009.

BEUSELINCK, P.R. **Trefoil: The science and technology of Lotus**. 28.ed. Madison:CSSA, p.9, 1999.

BOCKMANN, S.; PAEGELow, I. Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 68, p. 587–592, 2000.

BRUYNE, T. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 445-459, 1999.

BUESING, K.L.; DENSMORE, J.C.; KAUL, S.; PRITCHARD, K.A.; JARZEMBOWSKI, J.A.; GOURLAY, D.M.; OLDHAM, K.T. Endothelial microparticles induce inflammation in acute lung injury. **The Journal of Surgical Research**, v. 166, p. 32-39, 2010.

BUSNARDO, T.C.; PADOANI, C.; MORA, T.C.; BIAVATTI, M.W.; FRÖDE, T.S.; BÜRGER, C.; CLAUDINO, V.D.; DALMARCO, E.M.; DE SOUZA, M.M. Anti-inflammatory evaluation of *Coronopus didymus* in the pleurisy and paw oedema models in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 519-525, 2010.

CUA, D.J.; TATO, C.M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 479-489, 2010.

DALE, D.C.; BOXER, L.; LILES, W.C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, v. 122, p. 953-945, 2008.

DIXON, R.A.; XIE, D.; SHARMA, S.B. Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoids research? **The New Phytologist**, v. 165, p. 9-28, 2005.

DONG, C.. Regulation and pro-inflammatory function of interleukin 17 family cytokines. **Immunological Reviews**, v. 226, p. 80-86, 2008.

DUCHENE, J.; AHLUWALIA, A. The kinin B₁ receptor and inflammation: new therapeutic target for cardiovascular disease. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, p. 125-131, 2009.

ELLIS, K.M.; FOZARD, J.R. Species differences in bradykinin receptor-mediated responses of the airways. **Autonomic & Autacoid Pharmacology**, v. 22, p. 3-16, 2002.

FANG, S.; RAO, Y.K.; TZENG, Y. Inhibitory effects of flavonol glycoside from *Cinnamomum osmophoeum* on inflammatory mediators in LPS/IFN- γ -activated murine macrophages. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 2381–2388, 2005.

FREDHOLM, B. B. Adenosine receptors as drug targets. **Experimental cell research**, v. 316, p. 1284-1288, 2010.

FREITAS, A. **Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira**, Ministério da Saúde, Brasília, p. 1-28, 2007.

FRODE, T. S.; MEDEIROS, Y. S. Myeloperoxidase and adenosinedeaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse pleurisy model. **Mediators of Inflammation**, v. 10, p. 223-227, 2001

GINER-LARZA, E. M.; MÁEZ, S.; RECIO, M. C.; GINER, R. M.; PRIETO, J. M.; CERDÁ-NICOLÁS, M.; RÍOS, J. L. Oleanolic

acid, a 3-oxotriterpene from *Pistacia*, inhibits leukotriene synthesis and has anti-inflammatory activity. **European Journal of Pharmacology**, v. 428, p. 137-143, 2001.

GIUSTI, G.; GALANTI, B. Adenosine deaminase: colourimetric method. In **Methods of enzymatic analyses**, 3rd ed.; Bergmeyer, H.U., Eds.; Publisher: Verlag Chemie, Weinheim, Germany, p. 315–323, 1984.

GREEN, I. C.; WAGNER, D. A.; GLOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. B. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-137, 1982.

GREENE, S.L. Conservation of *Lotus* genetic resources. In P.R. Beuselinck, C. Hoveland (ed.) **Trefoil Science and Technology**, pp. 61-80. CSSA Special Publication 28, Madison, WI. 1999.

GUILPAIN, P.; SERVETTAZ, A.; BATTEUX, F.; GUILLEVIN, L. ; MOUTHON, L. Natural and disease associated anti-myeloperoxidase (MPO) autoantibodies. **Autoimmunity Reviews**, v. 7, p. 421-425, 2008.

GUPTA, C.; VIKRAM, A.; TRIPATHI, D. N.; RAMARAO, P.; JENA, G. B. Antioxidant and antimutagenic effect of quercetin against DEN induced hepatotoxicity in rat. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 119-128, 2010.

HARNEY, P.M.; GRANT, W.F. Chromatographic study of the phenolics of species of *Lotus* closely related to *L. corniculatus* and their taxonomic significance. **American Journal of Botany**, v. 51, p. 621-627, 1964.

HASKÓ, G.; PACHER, P.; DEITCH, E.A.; VIZI, E. S. Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 113, p. 264-275, 2007.

HASKÓ, G.; LINDEN, J.; CRONSTEIN, B.; PACHER, P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, p. 759-770, 2008.

HOSHINO, H.; LÖVALL, J.; SKOOGH, B.E.; LINDEN, A. Neutrophil recruitment by interleukin-17 into rat airways in vivo. Role of tachykinins. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 159, p. 1423-1428, 1999.

HUANG, L.J.; GAO, W.Y.; LI, X.; ZHAO, W.S.; HUANG, L.Q.; LIU, C.X. Evaluation of the in Vivo Anti-inflammatory Effects of Extracts from *Pyrus bretschneideri* Rehd. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. *In press*, 2010

HUNG, C.; YEN, G. Extraction and identification of antioxidative components of Hsian-tsao (*Mesona procumbens*, Hemsl.). **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 34, p. 306–311, 2001.

IWAKURA, Y.; NAKAE, S.; SAIJO, S.; ISHIGAME, H. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. **Immunological Reviews**, v. 226, p. 57-79, 2008.

JAY, M.; IBRAHIM, R.K. Biosynthesis of 8-sunstituted flavonols in relation to ontogeny of flower color in *Lotus corniculatus*. **Biochemie und Physiologie der Pflazen**, v. 181, p. 199-206, 1986.

JAY, M.; HASAN, A.; VOIRIN, B.; VIRICEL, M.R. Les flavonoids du *Lotus corniculatus*. [the flavonoids of *Lotus corniculatus*]. **Phytochemistry**, v. 17, p. 827-829, 1978.

KAO, T. K.; OU, Y. C.; RAUNG, S. L.; LAI, C. Y.; LIAO, S. L.; Chen, C. J. Inhibition of nitric oxide production by quercetin in endotoxin/cytokine-stimulated microglia. **Life Science**, v. 86, p. 315-321, 2010.

KAPLAN, A.P.; JOSEPH, K.; SILVERBERG, M. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 109, p.195-209, 2002.

KENYON, N. J.; GOHIL, K. LAST, A. Susceptibility to ovalbumin-induced airway inflammation and fibrosis in inducible nitric oxide synthetase-deficient mice: mechanisms and consequences. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 191, p. 2-11, 2003.

KIM, J. Y.; HWANG, Y. P.; KIM, D. H.; HAN, E. H.; CHUNG, Y. C.; ROH, S. H.; JEONG, H. G. Inhibitory Effect of the Saponins Derived from Roots of *Platycodon grandiflorum* on Carrageenan-Induced Inflammation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 70, 858-864, 2006.

KIRKBRIDE, J.H.J. Lotus systematics and distribution. *In: Trefoil: The Science and Technology of Lotus*. Beuselinck, P.R., editor. Publisher: Crop Science Society of America Special Publication. Madison, Wisconsin, USA, 1999, pp. 1–20.

KOELZER, J.; PEREIRA, D. A.; DALMARCO, J. B.; PIZZOLATTI, M. G. FRÖDE, T. S. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Lotus corniculatus*. **Food Chemistry**, v. 117, p. 444-450, 2009.

KOGA, H., HAGIWARA, S.; SHINGU, C.; MATSUMOTO, S.; YOKOI, I.; NOGUCHI, T. Human atrial natriuretic peptide ameliorates LPS-induced acute lung injury in rats. **Lung**, v. 188, p. 241-246, 2010.

KOLACHALA, V. L.; VIJAY-KUMAR, M.; DALMASSO, G.; YANG, D.; LINDEN, J.; WANG, L.; GEWIRTZ, A.; RAVID, K.; MERLIN, D.; SITARAMAN, S.V. A₂B adenosine receptor gene deletion attenuates murine colitis. **British Journal of Pharmacology**, v. 155, p. 127-137, 2008.

KUHR, F.; LOWRY, J.; ZHANG, Y.; BROVKOVYCH, V.; SKIDGEL, R.A. Diferencial regulation of inducible and endothelial

nitric oxide synthase by B₁ and B₂ receptors. **Neuropeptides**, v. 44, p. 145-154, 2010.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Adenosine: An endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. **European Journal of Pharmacology**, v. 616, p. 7-15, 2009.

KWON, S. H.; NAM, J. I.; KIM, S. H.; KIM, J. H.; YOON, J. H.; KIM, K. S. Kaempferol and quercetin, essential ingredients in Ginkgo biloba extract, inhibit interleukin-1 β -induced MUC5AC gene expression in human airway epithelial cells. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1708-1712, 2009.

LAAN, M.; CUI, Z. H.; HOSHINO, H.; LÖVALL J, SJÖTRAND, M.; GRUENERT, D. C.; SKOOGH, B. E.; LINDEN, A. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in them airways. **Journal of Immunology**, v. 162, p. 2347-2352, 1999.

LAU, D.; BALDUS, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammation vascular disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, p. 16-26, 2006.

LEE, J.Y.; MOON, H.; KIM, C.J. Effects of hydroxy pentacyclic triterpene acids from *Forsythia viridissima* on asthmatic responses to ovalbumin challenge in conscious guinea pigs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, p. 230-237, 2010.

LEEB-LUNDBERG, F. L. M.; MARCEAU, F.; MULLER-ESTERI, W.; PETTIBONE, D. J.; ZURAW, B. L. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. **Pharmacology Reviews**, v. 57, p. 27-77, 2005.

LEEUWEN, M.; GIJBELS, M.J.J.; DUIJVESTIJN, A.; SMOOK, M.; GAAR, M.J.; HEERINGA, P.; WINTHER, M.P.J. Accumulation of myeloperoxidase-positive neutrophils in atherosclerotic lesions in LDLR^{-/-} mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, p. 84-89, 2008.

LEWKOWICH, I.P.; WILLS-KARP, M. Animal models of allergen-induced asthma. In: ADKINSON, N. F.; BUSSE, W. W.; BOCHNER, B.S.; HOLGATE, S.T.; SIMONS, F.E.; LEMANSKE, R. F. J. editors. **Middleton's allergy: principles and practice**. 7th ed. London: Elsevier; 2008.

LI, J.W.H.; VEREDAS, J.C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?. **Science**, v. 325, p. 161-165, 2009.

LINDE, J.; RIEGER, J. M.; CUNHA, F. Q. GUERRANT, R. L.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. Effect of novel adenosine A₂A receptor agonist ATL 313 on *Clostridium difficile* toxin A induced murine ileal enteritis. **Infection Immunology**, v. 74, p. 2606-2612, 2006.

LORIA, V.; DATO, I.; GRAZIANI, F.; BIASUCCI, L. M. Myeloperoxidase: A new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. **Mediators of Inflammation**, v.1, p. 1-4, 2008.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature reviews, drug discovery**, v. 7, p. 156-167, 2008.

MARCEAU, F.; REGOLI, D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 845-852, 2004.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-435, 2008.

MEINI, S.; MAGGI, C.A. Knee osteoarthritis: a role for bradykinin?. **Inflammation Research**, v. 57, p. 351-361, 2008.

MELO, G. O.; MALVAR, D. C.; VANDERLINDE, F. A.; ROCHA, F. F.; PIRES, P. A.; COSTA, E. A.; MATOS, L. G.; KAISER, C. R.; COSTA, S. S. Antinociceptive and anti-inflammatory

kaempferol glycosides from *Sedum dendroideum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 228-232, 2009.

MIN, B.R.; FERNANDEZ, J.M.; BARRY, T.N.; MCNABB, W.C.; KEMP, P.D. The effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon reproductive efficiency and wool production in ewes during autumn. **Animal Feed Science Technology**, v. 92, p. 185-202, 2001.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M.; WINK, D. A. A RAPID, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. **Nitric Oxide**, v. 5, p. 62-71, 2001.

MOON, J. H.; TSUSHIDA, T.; NAKAHARA, K.; TERAOKA, J. Identification of quercetin 3-O-B-D-Glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, p. 1274-1285, 2001.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P.; Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 958-969, 2008.

NAGY, G.; CLARK, J. M.; BUZÁS, E. I.; GORMAN, C. L.; COPE, A. P. Nitric oxide, chornia inflammation and autoimmunity. **Immunology Letters**, v. 111, p. 1-5, 2007.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 173-182, 2006.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

OGAWA A, ANDOH A, ARAKI Y, BAMBIA, T.; FUJIYAMA, Y. Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. **Clinical Immunology**, v. 110, p. 55-62, 2004.

PACHER, P. BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxyne nitrite in health and disease. **Physiological reviews**, v. 87, p. 315-424, 2007.

PAIM, N.R. Research on Lotus spp. in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Lotus Newsletter**, v. 19, p. 37-43, 1988.

PARK, M. J.; LEE, E. K.; HEO, H. S.; KIM, M. S.; SUNG, B.; KIM, M. K.; LEE, J.; KIM, N. D.; ANTON, S.; CHOI, J. S.; YU, B. P.; CHUNG, H. Y. The anti-inflammatory effect of kaempferol in aged kidney tissues: The involvement of nuclear factor- κ B via nuclear factor-inducing kinase/I κ B kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, p. 351-358, 2009.

PHAM, C. T. N. Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. **The international Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, p. 1317-1333, 2008.

RAO, T. S.; CURIE, J. L.; SHAFFER, A. F. ISAKSON, P. C. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, v. 17, p. 723-741, 1993.

RIJKE, E. DE; ZAPPEY, H.; ARISE, F.; GOOIJER C.; BRINKMAN, U. A. T. Flavonoids in Leguminosae: Analysis of extracts of *T. pratense* L., *T. dubium* L., *T. repens* L., and *L. corniculatus* L. leaves using liquid chromatography with UV, mass spectrometric and fluorescence detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 995-1006, 2004.

RIKSEN, N. P.; RONGEN, G. A.; YELLON, D.; SMITS, P. Human in vivo research on the vascular effects of adenosine. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, p. 220-227, 2008.

ROCHA, L. G.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MACEDO, R. O.; BARBOSA-FILHO, J. M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytotherapy**, v. 12, p. 514-535, 2005.

ROGERIO, A. P.; DORA, C. L.; ANDRADE, E. L.; CHAVES, J. S.; SILVA, L. F. C.; SENNA, E. L.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammatory model in mice. **Pharmacological Research** v. 61, p. 288-297, 2010.

SALEH TS, CALIXTO JB, MEDEIROS YS. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, p. 811-9, 1996.

SALEH, T. S. F.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Pro-inflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. **European Journal of Pharmacology**, v. 331, p. 43-52, 1997.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v.30, p.3875-3883, 1991.

SEANEY, R. R.; HENSON, P. R. Birdsfoot trefoil. **Advances in Agronomy**, v. 22, p. 119-157, 1970.

SEDGWICK, A. D.; LEES, P. A comparison of air pouch, songe and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. **Agents Action**, v. 18, p. 439-446, 1986.

SHI, J. R.; MAO, L. G.; JIANG, R. A.; QIAN, Y.; TANG, H. F.; CHEN, J. Q. Monoammonium glycyrrhizinate inhibited the inflammation of LPS-induced acute lung injury in mice. **International Immunopharmacology**, v. 10, p. 1235-1241, 2010.

SILVA, J. S.; MOURA, M. D.; OLIVEIRA, R. A. G.; DINIZ, M. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M. Natural products inhibitors of ovarian neoplasia. **Phytomedicine**, v. 10, p. 221-232, 2003.

SINGH, G. B.; SINGH, S.; BANI, S.; GUPTA, B. D.; BANERJEE, S. K. Anti-inflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice.

Journal of Pharmacy & Pharmacology, v. 44, p. 456-458, 1992.

STEINER, J. J. Birdsfoot trefoil origins and germplasm diversity. In P.R. Beuselinck (ed.) **Trefoil: The science and technology of Lotus**. ASA-CSSA Spec. Publ. 28. Madison, WI., p. 81–96, 1999.

STEINER, J. J.; SANTOS, G. Adaptive ecology of *Lotus coniculatus* L. genotypes: I. Plant and morphology and RAPD marker characterizations. **Crop Science**, v. 41, p. 552-563, 2001.

STEWART, J. M. Bradykinin antagonists: discovery and development. **Peptides**, v. 25, p. 527-532, 2004.

SUH, S.; JIN, U.; KIM, K.; SON, J.; LEE, S. H.; SON, K. Triterpenoid saponin, oleanolic acid 3-O-b-D-glucopyranosyl(1–3)-a-L-rhamnopyranosyl(1–2)-a-L-arabinopyranoside (OA) from *Aralia elata* inhibits LPS-induced nitric oxide production by down-regulated NF- κ B in raw 264.7 cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 467, p. 227–233, 2007.

SUNIL, V.R.; PATEL, K.J.; SHEN, J.; REIMER, D.; GOW, A.J.; LASKIN, J.D.; LASKIN, D.L. Functional and inflammatory alterations in the lung following exposure of rats to nitrogen mustard. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 250, p. 10-18, 2010.

TAKADA, K.; NAKANE, T.; MASUDA, K.; ISHII, H. Ursolic acid and oleanolic acid, members of pentacyclic triterpenoid acids, suppress TNF-alpha-induced E-selectin expression by cultured umbilical vein endothelial cells. **Phytomedicine**, v. 17, p. 1114-1119, 2010.

TRIPATHI, P.; TRIPATHI, P.; KASHYAP, L.; SINGH, V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, p. 443–452, 2007.

TROUILLAS, P.; CALLISTE, C.; ALLAIS, D.; SIMON, A.; MARFAK, A.; DELAGE, C.; DUROUX, J. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. **Food Chemistry**, v. 80, p. 399-407, 2003.

URGOANKAR, S.; SHAW, J. T. Synthesis of kaempferitrin. **Journal of Organic Chemistry**, v. 72, p. 4582-4585, 2007.

VALÉRIO, D. A.; GEORGETTI, S. R.; MAGRO, D. A.; CASAGRANDE, R.; CUNHA, T. M.; VICENTINI, F. T. M. C.; VIEIRA, S. M. FONSECA, M. J. V.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; VERRI, W. A. Quercetin Reduces Inflammatory Pain: Inhibition of Oxidative Stress and Cytokine Production. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 1975-1979, 2009.

VIANNA, R.M.; CALIXTO, J.B. Characterization of the receptor and the mechanisms underlying the inflammatory response induced by des-Arg⁹-BK in mouse pleurisy. **British Journal of Pharmacology**, v. 123, p. 281-91, 1998.

YU, Z.; OUYANG, J.P.; LI, Y.P. Dexamethasone attenuated endotoxin-induced acute lung injury through inhibiting expression of inducible nitric oxide synthase. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 41, p. 117-125, 2009.

WAGHORN, G.C.; SHELTON, I.D. Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* on its nutritive value of pasture for sheep. **Journal of Agricultural Science**, v. 128, p. 365–372, 1997.

WAGHORN, G. C.; ULYATT, M. J.; JOHN, A.; FISHER, M. T. The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino acids and other nutrients in sheep fed on *Lotus corniculatus*. **British Journal of Nutrition**, v. 57, p. 115–126, 1987.

WALTER, E. D. Isolation of oleanolic acid and saponin from trefoil (*Lotus*

corniculatus, var. viking). **Journal Pharmaceutical Science**, v. 50, p.173, 1961.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. WHO monographs on selected medicinal plants. Geneva, v. 1, p. 1-295, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Traditional medicine, Fact sheet. Geneva, n. 134. 2008.

ZAVIALOV, A.; ENGSTRÖM, A. Human ADA₂ belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. **Biochemistry Journal**, v. 391, p. 51-57, 2005.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**. v. 16, p.109-10, 1983.

ZOSKY, G.R.; SLY, P.D. Animal models of asthma. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 37, p. 973-988, 2007.

ANEXOS

ANEXO A

Protocolo de aprovação no Comitê de Ética na Experimentação com Animais

Resultado de Solicitação de Protocolo**Protocolo**

PP00180

Título

ESTUDO FARMACOLÓGICO DA LOTUS EM MODELO DE INFLAMAÇÃO AGUDA, EM CAMUNDONGOS

Data de Entrada

03/12/2007

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

04/04/2008

Considerações

Ofício nº 047/CEUA/PRPe/2008

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA
Ao(à): Prof(a) Dr(a) Tânia Silvia Frode, Departamento de Análises Clínicas - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por 2 (dois) anos, para a utilização de 1459 camundongos (*Mus musculus*).

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

**Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)
Data 11/07/2010**

Data 11/04/2008

Parecer(es):

ANEXO B

**Artigo submetido e aceito
Revista: Agricultural and Food Chemistry**