



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA – PPGFAR**

**ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA
Esenbeckia leiocarpa Engl. NO MODELO DA PLEURISIA
INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS**

DOUTORADO

Patrícia Pozzatti Wanzeller

**Florianópolis
2012**

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

Patrícia Pozzatti Wanzeller

**ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA
Esenbeckia leiocarpa Engl. NO MODELO DA PLEURISIA
INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada a Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Sílvia Fröde.

Área de Concentração: Análises Clínicas.

Linha de Pesquisa: Mecanismos moleculares e celulares envolvidos em processos fisiopatológicos.

Florianópolis
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Wanzeller, Patrícia Pozzatti

Estudo do efeito anti-inflamatório da *Esenbeckia leiocarpa Engl.* no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos [tese] / Patrícia Pozzatti Wanzeller ; orientadora, Tânia Silvia Fröde - Florianópolis, SC, 2012.

119 p.; 21cm

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

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Efeito anti-inflamatório. 3. *Esenbeckia leiocarpa Engl.*. 4. Pleurisia. 5. Produtos naturais. I. Fröde, Tânia Silvia. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

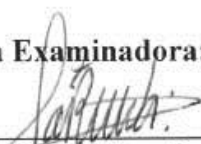
“Estudo do efeito anti-inflamatório da Esenbeckia leiocarpa Engl. no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos”

POR


Patrícia Pozzatti Wanzeller

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:



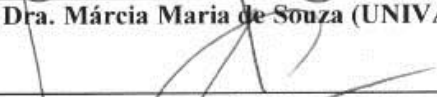
Prof.ª Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva (UFSC – Membro Titular)



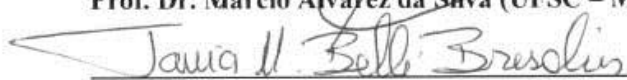
Prof.ª Dra. Lillian Sibelle Campos Bernardes (UFSC – Membro Titular)



Prof.ª Dra. Márcia Maria de Souza (UNIVALI – Membro Titular)



Prof. Dr. Márcio Alvarez da Silva (UFSC – Membro Titular)



Prof.ª Dra. Tania Mari Bellé Bresolin (UNIVALI – Membro Titular)



Prof.ª Dra. Tania Silvia Fröde (UFSC – Orientadora)

Prof.ª Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 26 de outubro de 2012.

*Dedico esta tese à minha mãe,
Célia Maria Rossatto Pozzatti,
por sua dedicação, amor, apoio
e, principalmente, por acreditar
sempre nesse sonho, mesmo
nos momentos mais difíceis de
nossas vidas.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir que eu concluísse mais esta etapa em minha vida, mesmo após muitas lágrimas e crises de ansiedade; por me proteger durante os vários momentos em que precisei ir ao laboratório de madrugada, sozinha, e com medo; por me fazer persistir, mesmo quando fazia uma série de experimentos no sábado ou domingo de sol e, no fim do dia, constatava que quase nada havia dado certo; ou, quando pensava na minha mãe doente, precisando de mim a 700 km de distância, novamente era Ele e a Santa Paulina que me confortavam.

À minha família: meus pais, Célia e Laudi, meus irmãos, Juliana e Daniel, meu sobrinho, Dante Valentino, e à minha cunhada, Camila Santiago, obrigada por todo apoio e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu esposo Leonardo Wanzeller, um anjo que apareceu na minha vida, logo que cheguei a Florianópolis. Obrigada por todo seu amor, companheirismo, e principalmente pela sua paciência. Obrigada por me compreender, até mesmo quando cheguei atrasada no dia do nosso casamento civil por estar submetendo um artigo.

À nova família que me recebeu com todo carinho: Vera, Leonardo Martins, Danielle e Eloir, obrigada por estarem sempre torcendo por mim.

Às minhas amigas-irmãs: Danielle F. Pereira e Sílvia Helena M. Borgmann, que dividiram comigo as mesmas angústias e felicidades, desde a faculdade, mestrado e doutorado. Além disso, obrigada Danielle, por trazer a *Esenbeckia leiocarpa*, diretamente para nossa “república”, e me permitir pesquisá-la.

Aos amigos que conheci em Florianópolis e que se tornaram parte da minha família: Ana Paula Q. Barreiros e Marco Antônio P. de Andrade, e a tantos outros que de alguma forma cruzaram meu caminho legando-me ensinamentos.

À minha orientadora: Tânia Silvia Fröde, obrigada por seus ensinamentos e disponibilidade no decorrer do curso.

Ao meu aluno de iniciação científica, meu “jardineiro fiel”, meu padrinho, meu amigo, meu “escravo”: Gustavo Oliveira dos Reis. Obrigada por tudo, sua ajuda foi fundamental para a conclusão deste doutorado.

Aos meus colegas de laboratório: Ziliani da S. Buss, Jucélia P. Benincá, Júlia Salvan, Eduardo M. Dalmarco, Geison Vicente, Rafael de Liz, Marina Nader, Diana A. Pereira, Janaína Koelzer, Silvana Vigil de Mello, Giliard Astolfi, Bruno M. Facchin, Fábio A. Silva, Andrea T. C. Hoepers, Maria Anita C. Spindola, Daniel H. Nunes, Juliana K. Ikino, entre outros que participaram do Grupo de Pesquisa em Imunologia Clínica, obrigada pelo companheirismo, pelas horas de descontração, momentos alegres, outros nem tanto, que passamos juntos durante esta jornada. Em especial, agradeço à minha grande amiga Ziliani, à minha afilhada Jucélia e ao meu amigo Eduardo, obrigada por todos os seus ensinamentos!!!

À Coordenadora do PPGFAR, professora Dra. Tânia B. C. Pasa, à vice-coordenadora, Simone G. Cardoso e ao secretário Bruno W. Farias, obrigada por toda a ajuda durante o curso, principalmente na etapa final.

Aos professores do departamento de Química: Moacir G. Pizzolatti e Gustavo Micke, e aos alunos do programa de pós-graduação em química: Heros Horst, Leandro Espíndola e Melina Heller, obrigada por todas as análises fitoquímicas realizadas.

À Prefeitura Municipal de Florianópolis, aos colegas farmacêuticos Juanna G. Ronsein, Sidnei Batista, Aloísio Schimidt Cardoso e Juliane B. Casagrande, à colega Zulma da Silva Tomaz, à coordenadora do Centro de Saúde, Alessandra Machado Evangelista e aos demais colegas, obrigada por todo apoio, amizade e flexibilidade para que eu pudesse concluir meus estudos.

À farmacêutica Fabiana B. Baldaça, chefe do Almoxarifado de Medicamentos Judiciais da Diretoria de Assistência Farmacêutica de Santa Catarina, e demais colegas, obrigada pela compreensão e apoio no período em que trabalhei neste setor.

RESUMO

Introdução: O gênero *Esenbeckia* (Rutaceae) compreende aproximadamente 30 espécies identificadas, nativas de regiões tropicais, tais como México e Brasil, incluindo principalmente os Estados brasileiros de São Paulo, Bahia, Minas Gerias, Goiás e Mato Grosso do Sul. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que plantas deste gênero apresentam propriedades anti-inflamatórias.

Objetivos: Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto hidroalcoólico (EBH), frações e compostos isolados da *Esenbeckia leiocarpa* Engl., administrada por via intraperitoneal (i.p.), no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.

Metodologia: As cascas secas da *E. leiocarpa* Engl. foram maceradas e extraídas com etanol para obter o EBH. A partir deste extrato, foram obtidas as frações n-hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt), aquosa (Aq) e alcaloídica (Alc), sendo que esta última fração foi extraída com éter etílico originando duas subfrações: uma alcaloídica polar (AlcP) e outra apolar (AlcAp). O composto majoritário, o alcaloide indólico dihidrocorinanteol (DHC), foi isolado da subfração AlcAp. No protocolo para identificar e elucidar a estrutura do composto majoritário presente na *E. leiocarpa* Engl., foram utilizadas análises de eletroforese capilar, características físicas, infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C) e espectrometria de massas. Em outro protocolo, o composto isolado identificado foi modificado por reações de substituição nucleofílica, originando os análogos acetil, p-metil, benzoil, p-metoxi e p-cloro, que foram utilizados em um estudo de relação estrutura-atividade, avaliando-se o efeito destes compostos sobre leucócitos, exsudação e atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). No modelo da pleurisia induzida pela carragenina, foram utilizados camundongos albinos *Swiss* e foram avaliados os seguintes parâmetros inflamatórios no lavado da cavidade pleural: leucócitos, exsudação, atividades das enzimas MPO e adenosina-deaminase (ADA), e as concentrações de nitrito/nitrato (NO_x), interleucina 1-beta ($\text{IL-1}\beta$) e fator de necrose tumoral-alfa ($\text{TNF-}\alpha$). Neste estudo, diferentes grupos de animais foram tratados com EBH (10 - 100 mg/kg), Hex (10 - 50 mg/kg), AcOEt (10 - 50 mg/kg), Aq (2 - 10 mg/kg), Alc (1 - 10 mg/kg), AlcP (0,5 - 5 mg/kg), AlcAp (0,1 - 2 mg/kg) ou DHC (0,1 - 0,5 mg/kg), administrados (i.p.) 0,5 h antes da carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.). Os parâmetros inflamatórios foram avaliados 4 h após. Para avaliar a exsudação, os animais foram

tratados previamente com solução Azul de Evans (25 mg/kg, i.v.). Diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas pela análise dos testes de variância (ANOVA), Newman-Keuls e/ou *t* de Student. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Além disso, realizou-se também o estudo de toxicidade do EBH por meio da análise da curva de sobrevivência. Neste estudo, diferentes grupos de animais receberam diferentes doses do EBH (250 mg/kg, 500 mg/kg e 1000 mg/kg, i.p.) e o número de óbitos foi observado diariamente, durante dez dias. **Resultados:** EBH da *E. leiocarpa* Engl. (25 - 100 mg/kg), Hex (25 - 50 mg/kg), AcOEt (25 - 50 mg/kg), Aq (5 - 10 mg/kg), Alc (5 - 10 mg/kg), AlcP (1 - 5 mg/kg), AlcAp (0,5 - 2 mg/kg) e DHC (0,25 - 0,5 mg/kg) inibiram: leucócitos, neutrófilos, mononucleares e exsudação ($P < 0,05$). Da mesma forma, EBH (25 mg/kg), Hex (50 mg/kg), AcOEt (50 mg/kg), Aq (5 ou 10 mg/kg), Alc (10 mg/kg), AlcP (1 ou 2 mg/kg), AlcAp (0,5 mg/kg) e DHC (0,25 mg/kg) inibiram as atividades das enzimas MPO e ADA, além das concentrações de NO_x , IL-1 β e TNF- α ($P < 0,05$). Em relação à toxicidade, observou-se que a dose de 250 mg/kg demonstrou-se segura, pois resultou em 100% de sobrevivência dos animais após 10 dias de observação, enquanto que nas doses de 500 e 1000 mg/kg todos os animais morreram no primeiro dia. Observou-se também que o composto DHC apresentou melhor efeito anti-inflamatório do que seus análogos: acetil, *p*-metil, benzoil, *p*-metoxi e *p*-cloro, uma vez que somente o DHC inibiu ambos os parâmetros inflamatórios estudados: leucócitos e exsudação ($P < 0,01$). Além disso, os análogos do DHC inibiram a atividade da MPO ($P < 0,01$). **Conclusões:** Os resultados demonstraram que: 1) *E. leiocarpa* Engl. possui importante atividade anti-inflamatória; 2) este efeito ocorre principalmente em relação à inibição da migração leucocitária e da exsudação; 3) a inibição destes parâmetros inflamatórios está relacionada também à inibição de NO_x , IL-1 β e TNF- α ; 4) a inibição da atividade da MPO e ADA está relacionada a diminuição de leucócitos ativados; 5) as doses utilizadas nos experimentos parecem ser seguras; 6) o DHC foi mais efetivo do que os seus análogos neste modelo de inflamação, e as alterações físico-químicas promovidas no DHC, após a inserção dos substituintes acetil, *p*-metilbenzoil, benzoil, *p*-metoxibenzoil e *p*-clorobenzoil na hidroxila do carbono 17, determinam a efetividade do efeito anti-inflamatório.

Palavras-chaves: *Esenbeckia leiocarpa* Engl., pleurisia, efeito anti-inflamatório, citocinas pró-inflamatórias, mieloperoxidase.

ABSTRACT

Introduction: *Esenbeckia* genus (Rutaceae) includes approximately 30 species native from tropical regions such as Mexico and Brazil, mainly in the Brazilian states of Sao Paulo, Bahia, Minas Gerais, Goias and Mato Grosso do Sul. Studies using *in vivo* and *in vitro* models have demonstrated that plants of this genus have anti-inflammatory properties. **Objectives:** To evaluate the anti-inflammatory effect of the crude hydroalcoholic extract (CHE), fractions and compounds isolated from *Esenbeckia leiocarpa* Engl., administered intraperitoneally (i.p.) in the carrageenan-induced murine model of pleurisy. **Methodology:** The dried *E. leiocarpa* Engl. bark was macerated and extracted with ethanol to obtain the CHE. The n-hexane (Hex), ethyl acetate (AcOEt), aqueous (Aq) and alkaloids (Alk) fractions were obtained from CHE, and two alkaloid subfractions, polar (polar Alk) and nonpolar (nonpolar Alk) were obtained from the Alk fraction using an ethyl ether extraction. The major compound, the indole alkaloid dihydrocorinantheol (DHC) was isolated from nonpolar Alk subfraction. Analysis of capillary electrophoresis, physical characteristics, infrared, nuclear magnetic resonance (^1H and ^{13}C NMR) and mass spectrometry were used to identify and elucidate the structure of the major compound present in the *E. leiocarpa* Engl. In another protocol, the isolated compound was subjected to chemical structural modifications by nucleophilic substitution reactions to develop the acetyl, p-methyl, benzoyl, p-methoxy and p-chloro analogs, which were used in a study of structure-activity relationships to evaluate the effect of these compounds upon leucocytes and exudation concentrations and myeloperoxidase (MPO) activity. Swiss mice were used in the carrageenan-induced murine model of pleurisy and the following inflammatory parameters were evaluated the fluid of the pleural cavity: leukocytes, exudation, MPO and adenosine deaminase (ADA) activities, and the concentrations of nitrite/nitrate (NO_x), interleukin-1 beta ($\text{IL-1}\beta$) and tumor necrosis factor-alpha ($\text{TNF-}\alpha$). In this study, different groups of animals were pretreated with CHE (10 - 100 mg/kg), Hex (10 - 50 mg/kg), AcOEt (10 - 50 mg/kg), Aq (2 - 10 mg/kg), Alk (1 - 10 mg/kg), polar Alk (0.5 - 5 mg/kg), nonpolar Alk (0.1 - 2 mg/kg) or DHC (0.1 - 0.5 mg/kg) administered (i.p.) 0.5 h before carrageenan (1%) which was administered by intrapleural route (i.pl.). The inflammatory parameters were evaluated after 4 h. To evaluate the exudation, the animals were pretreated with Evans blue dye (25 mg/kg, i.v.). Statistical differences between groups

were determined by analysis of variance test (ANOVA), Newman-Keuls and/or Student's t test. $P < 0.05$ was considered significant. Further, the toxicity study of CHE we performed by analyzing the survival curve. In this study, different groups of animals received different doses of EBH (250 mg/kg, 500 mg/kg and 1000 mg/kg, i.p.) and the number of deaths was observed daily for 10 days. **Results:** CHE (25 - 100 mg/kg), Hex (25 - 50 mg/kg), AcOEt (25 - 50 mg/kg), Aq (5 - 10 mg/kg), Alk (5 - 10 mg/kg), polar Alk (1 - 5 mg/kg), nonpolar Alk (0.5 - 2 mg/kg) and DHC (0.25 - 0.5 mg/kg) inhibited leukocytes, neutrophils, mononuclears and exudation ($P < 0.05$). Also, CHE (25 mg/kg), Hex (50 mg/kg), AcOEt (50 mg/kg), Aq (5 or 10 mg/kg), Alc (10 mg/kg), polar Alk (1 or 2 mg/kg), nonpolar Alk (0.5 mg/kg) and DHC (0.25 mg/kg) inhibited the MPO and ADA activities, and the concentrations of NO_x , IL-1 β and TNF- α ($P < 0.05$). In relation to toxicity, it was observed that the dose of 250 mg/kg of CHE was safe because its administration resulted in 100% survival of the animals after 10 days, whereas at the doses of 500 mg/kg and 1000 mg/kg all animals died in the first day of observation. Furthermore, the DHC alkaloid showed better anti-inflammatory effect than its analogs: acetyl, p-methyl, benzoyl, p-methoxy and p-chloro, because only the DHC inhibits both studied inflammatory parameters: leukocytes and exudation concentrations ($P < 0.01$). Further, the DHC analogs inhibited MPO activity ($P < 0.01$). **Conclusions:** The results showed that: 1) *E. leiocarpa* Engl. has important anti-inflammatory activity; 2) this effect occurs mainly in relation to inhibition of leukocyte migration and exudation concentrations; 3) the Inhibition of these inflammatory parameters is also related to NO_x , IL-1 β and TNF- α inhibition; 4) the inhibition of MPO and ADA activities are associated with decrease of activated leukocytes; 5) the doses used in the experiments of this study appear to be safe; 6) DHC was more effective than its analogs in this model of inflammation, and the physicochemical modifications in the DHC after insertion of the acetyl, p-methylbenzoyl, benzoyl, p-methoxybenzoyl and p-chlorobenzoyl substituents radicals on the hydroxyl group at carbon 17 determine the effectiveness of the anti-inflammatory action.

Keywords: *Esenbeckia leiocarpa* Engl., pleurisy, anti-inflammatory effect, pro-inflammatory cytokines, myeloperoxidase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Imagem da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. (A) e das suas folhas (B).....	28
Figura 2- Via do ácido araquidônico e mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs).	38
Figura 3- Vias de sinalização genômica e não-genômica dos glicocorticoides em células T.	40
Figura 4 - Diagrama da sequência de obtenção do extrato bruto hidroalcoólico, frações, subfrações e composto isolado das cascas da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.....	49
Figura 5- Reação química demonstrando as modificações estruturais do dihidrocorinanteol (DHC) e seus produtos.....	52
Figura 6- Eletroferograma para determinação do alcaloide dihidrocorinanteol (DHC) no extrato bruto hidroalcoólico (EBH).....	64
Figura 7- Eletroferograma para determinação do alcaloide dihidrocorinanteol (DHC) nas frações n-hexano (Hex) (A), acetato de etila (AcOEt) (B) e aquosa (Aq) (C).	65
Figura 8- Eletroferograma para determinação do alcaloide dihidrocorinanteol (DHC) na fração alcaloídica (Alc) (A), subfração alcaloídica polar (AlcP) (B) e subfração alcaloídica apolar (AlcAp) (C).....	66
Figura 9- Estrutura química do dihidrocorinanteol (DHC).	68
Figura 10- Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) (10 - 100 mg/kg) administrado por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleurial (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.	70

Figura 11- Efeito da fração n-hexano (Hex) (10 - 50 mg/kg) administrada por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleural (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.....	71
Figura 12- Efeito da fração acetato de etila (AcOEt) (10 - 50 mg/kg) administrada por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleural (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.....	72
Figura 13- Efeito da fração aquosa (Aq) (2 - 10 mg/kg) administrada por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleural (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.....	74
Figura 14- Efeito da fração alcaloídica (Alc) (1 - 10 mg/kg) administrada por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleural (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.....	75
Figura 15- Efeito da subfração alcaloídica polar (AlcP) (0,5 - 5 mg/kg) administrada por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleural (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.	76
Figura 16- Efeito da subfração alcaloídica apolar (AlcAp) (0,1 - 2 mg/kg) administrada por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleural (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.	78
Figura 17- Efeito do composto dihidrocorinanteol (DHC) (0,1 - 0,5 mg/kg, i.p.) administrado por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleural (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.....	79

Figura 18- Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH: 25 mg/kg), fração n-hexano (Hex: 50 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), fração alcaloídica (Alc: 10 mg/kg), subfração alcaloídica polar (AlcP: 1 mg/kg), subfração alcaloídica apolar (AlcAp: 0,5 mg/kg), dihidrocorinanteol (DHC: 0,25 mg/kg) isolados das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. e administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleural (1%, i.pl.) sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO)..... 81

Figura 19- Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH: 25 mg/kg), fração n-hexano (Hex: 50 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), fração alcaloídica (Alc: 10 mg/kg), subfração alcaloídica polar (AlcP: 1 mg/kg), subfração alcaloídica apolar (AlcAp: 0,5 mg/kg), dihidrocorinanteol (DHC: 0,25 mg/kg) isolados das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. e administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleural (1%, i.pl.) sobre a atividade da adenosina-deaminase (ADA). 82

Figura 20- Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH: 25 mg/kg), fração n-hexano (Hex: 50 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), fração alcaloídica (Alc: 10 mg/kg), subfração alcaloídica polar (AlcP: 1 mg/kg), subfração alcaloídica apolar (AlcAp: 0,5 mg/kg), dihidrocorinanteol (DHC: 0,25 mg/kg) isolados das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. e administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleural (1%, i.pl.) sobre a concentração de nitrito/nitrato (NO_x)..... 83

Figura 21- Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH: 25 mg/kg), fração n-hexano (Hex: 50 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg) ou fração alcaloídica (Alc: 10 mg/kg), subfração alcaloídica polar (AlcP: 1 mg/kg), subfração alcaloídica apolar (AlcAp: 0,5 mg/kg), dihidrocorinanteol (DHC: 0,25 mg/kg) isolados das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* e administrada por via intrapleural (1%, i.pl.) sobre as concentrações de interleucina-1 beta (IL-1 β)..... 84

Figura 22- Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH: 25 mg/kg), fração n-hexano (Hex: 50 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 10 mg/kg) ou fração alcaloídica (Alc: 10 mg/kg), subfração alcaloídica polar (AlcP: 2 mg/kg), subfração alcaloídica apolar (AlcAp: 0,5 mg/kg), dihidrocorinanteol (DHC: 0,25 mg/kg) isolados das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* e administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleural (1%, i.pl.) sobre as concentrações de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)..... 85

Figura 23- Curva de sobrevivência realizada após a administração do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. nas doses de 250, 500 e 1000 mg/kg, i.p, utilizando-se a análise de Kaplan Meier..... 86

Figura 24- Efeito do DHC-acetil (0,25 mg/kg), DHC-*p*-metil (0,25 mg/kg), DHC-benzoil (0,25 mg/kg), DHC-*p*-metoxi (0,25 mg/kg) e DHC-*p*-cloro (1 mg/kg) administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina, administrada por via intrapleural (1%, i.pl.), sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO)..... 88

Figura 25- Efeito do dihidrocorinanteol (DHC) e seus análogos acetil, *p*-metil, benzoil, *p*-metoxi e *p*-cloro, administrados por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina por via intrapleural (1%, i.pl.), no modelo da pleurisia em camundongos, sobre leucócitos (A), neutrófilos (B) e exsudação (C). 89

Figura 26- Resumo do efeito anti-inflamatório da
Esenbeckia leiocarpa Engl. no modelo da pleurisia induzida
pela carragenina em camundongos..... 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação entre a concentração de fármacos e compostos em miligrama por quilograma (mg/kg) e micromolar (μM)	55
Tabela 2 – Concentração do DHC no EBH, frações e subfrações isoladas das cascas da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.....	63
Tabela 3 – Efeito anti-inflamatório dos análogos do DHC: acetil, <i>p</i> -metil, benzoil, <i>p</i> -metoxi e <i>p</i> -cloro sobre a migração leucocitária e exsudação, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A ₁	Receptor A1 de adenosina
A _{2A}	Receptor 2A de adenosina
A _{2B}	Receptor 2B de adenosina
A ₃	Receptor A3 de adenosina
AcOEt	Fração acetato de etila
ADA	Adenosina-deaminase
Alc	Fração alcaloídica
AlcAp	Subfração alcaloídica apolar
AlcP	Subfração alcaloídica polar
Aq	Fração aquosa
CCD	Cromatografia em camada delgada
CD	<i>Cluster of differentiation</i> = marcadores de diferenciação celular
Cg	Carragenina
CGS 21680	Molécula agonista do receptor de adenosina A _{2A}
Cl ⁻	Íons cloreto
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
Dexa	Dexametasona
DHC	Dihidrocorinanteol
DHC-acetil	Acetildihidrocorinanteol
DHC-p-metil	<i>p</i> -metilbenzoildihidrocorinanteol
DHC-benzoil	Benzoildihidrocorinanteol
DHC-p-metoxi	<i>p</i> -metoxibenzoildihidrocorinanteol
DHC-p-cloro	<i>p</i> -clorobenzoildihidrocorinanteol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
DPR	Desvio padrão relativo
EBH	Extrato bruto hidroalcoólico
ELISA	Enzimaimunoensaio
Enos	Óxido nítrico sintase constitutiva endotelial
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Hex	Fração n-hexano
HIBA	Ácido 2-hidroxiisobutírico
HOCI	Ácido hipocloroso
IgE	Imunoglobulina E

i.p.	Via intraperitoneal
i.pl.	Via intrapleural
i.v.	Via intravenosa
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IFN- α	Interferon alfa
IFN- β	Interferon beta
IFN- γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina-10
IL-11	Interleucina-11
IL-13	Interleucina-13
IL-15	Interleucina-11
IL-17A	Interleucina-17 subtipo A
IL-1Ra	Antagonista do receptor de interleucina-1
IL-1RI	Receptor de interleucina-1 tipo 1
IL-1RII	Receptor de interleucina-1 tipo 2
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-2	Interleucina-2
IL-3	Interleucina-3
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
Indo	Indometacina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
KC	Quemocina derivada de queratinócitos
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeos
LQPN	Laboratório de Química de Produtos Naturais
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócito-1
MIP-1	Proteína inflamatória de macrófago-1
MKP-1	Proteína quinase fosfatase-1 ativada por mitógenos
m/m	Massa/massa
MPO	Mieloperoxidase
N	Número
NaCl	Solução salina estéril
NADPH oxidase	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kappa B

NK	Célula Natural Killer
nNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NO _x	Metabólitos do óxido nítrico (nitrito/nitrato)
O ₂ ⁻	Radical ânion superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
OVA	Ovalbumina
PAF	Fator ativador de plaquetas
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandina F ₂ alfa
PGG ₂	Prostaglandina G ₂
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaglandina I ₂ ou prostaciclina
P-Selectina	Molécula de adesão epitelial
Py	Piridina
RANTES/CCL5	Quemocina secretada, expressa e regulada sob ativação de linfócitos T
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbonos
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de prótons
SOD	Superóxido dismutase
SP-A	Proteína surfactante A
TLR	Receptor <i>toll-like</i>
TNFR1	Receptor do tipo I do fator de necrose tumoral
TNFR2	Receptor do tipo II do fator de necrose tumoral
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAF2	Fator 2 associado ao receptor de TNF-α
Treg	Células T reguladoras
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano
TXA ₂	Tromboxano A ₂
VCAM-1	Molécula de adesão vascular-1
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VSR	Vírus sincicial respiratório

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 PLANTAS MEDICINAIS.....	27
1.1.1 Gênero <i>Esenbeckia</i> e atividades farmacológicas	28
1.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	30
1.3 FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS.....	37
1.4 MODELOS DE INFLAMAÇÃO.....	41
2 OBJETIVOS	45
2.1 OBJETIVO GERAL.....	45
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
3 METODOLOGIA	47
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	47
3.1.1 Coleta do material vegetal	47
3.1.2 Obtenção do extrato, frações, subfrações e compostos isolados	47
3.1.3 Eletroforese capilar do extrato bruto, frações e subfrações da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl	49
3.1.4 Elucidação estrutural do composto majoritário isolado da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl	50
3.1.5 Modificações estruturais do composto majoritário isolado da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl	51
3.2 ANIMAIS.....	53
3.2.1 Procedimento anestésico	53
3.2.2 Eutanásia dos animais	53
3.3 PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS.....	53
3.4 TÉCNICAS UTILIZADAS.....	56
3.4.1 Contagem total e diferencial dos leucócitos	56
3.4.1.1 Coloração dos esfregaços celulares.....	56
3.4.2 Determinação da exsudação	56
3.4.3 Determinação da atividade da mieloperoxidase	57
3.4.4 Determinação da atividade da adenosina-deaminase	57
3.4.5 Análise quantitativa do nitrito/nitrato	58
3.4.6 Determinação das concentrações de IL-1β e TNF-α	59
3.5 ESTUDO DA TOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO DA <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.....	59
3.6 FÁRMACOS E REAGENTES.....	59
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60

4 RESULTADOS	63
4.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	63
4.1.1 Eletroforese capilar do EBH, frações e subfrações da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.	63
4.1.2 Elucidação estrutural do composto	67
4.2 EFEITO DA <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR E A EXSUDAÇÃO.....	68
4.3 EFEITO DA <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. SOBRE A ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE.....	80
4.4 EFEITO DA <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. SOBRE A ATIVIDADE DA ADENOSINA-DEAMINASE.....	81
4.5 EFEITO DA <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE NITRITO/NITRATO.....	82
4.6 EFEITO DA <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE IL-1 β	83
4.7 EFEITO DA <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE TNF- α	84
4.8 ESTUDO DA TOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO DA <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.....	85
4.9 EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DAS MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DO ALCALOIDE DIHIDROCORINANTEOL (DHC) ISOLADO DA <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.....	86
6 CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS	101
ANEXO A - Protocolo de aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC) (PP00343).....	115
ANEXO B - Resumos apresentados em anais de congressos.....	116
ANEXO C - Abstract do artigo: “ <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. inhibits inflammation in a carrageenan-induced murine model of pleurisy”, publicado no <i>Journal of Pharmacy and Pharmacology</i>	118
ANEXO D - Comprovante de submissão do artigo: “Relationship of chemical structure to in vivo anti-inflammatory activity of dihydrocorynantheol alkaloid and its analogues”, ao periódico <i>Pharmacological Reports</i>	119

1 INTRODUÇÃO

1.1 PLANTAS MEDICINAIS

Produtos naturais são fonte importante de agentes terapêuticos desde a antiguidade (GOSSLAU et al., 2011). No século passado, diversas classes de produtos naturais foram isoladas e suas estruturas químicas foram caracterizadas (MISHRA; TIWARI, 2011). Estas descobertas, juntamente com a elucidação da diversidade biológica e do mecanismo de ação bioquímico, são fundamentais para o desenvolvimento da química orgânica e medicinal (LEE, 2010). A importância de pesquisas farmacológicas envolvendo produtos naturais pode ser observada em diversos estudos. Neste sentido, entre 1981 e 2010, foram descritas 1940 novas estruturas químicas com atividade antitumoral, sendo que 48,6% destas foram provenientes e/ou tiveram sua estrutura química baseada em produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 65% a 80% da população nos países em desenvolvimento dependem essencialmente da medicina tradicional como principal fonte de tratamento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). Entre as opções terapêuticas da medicina tradicional destaca-se o uso de plantas medicinais.

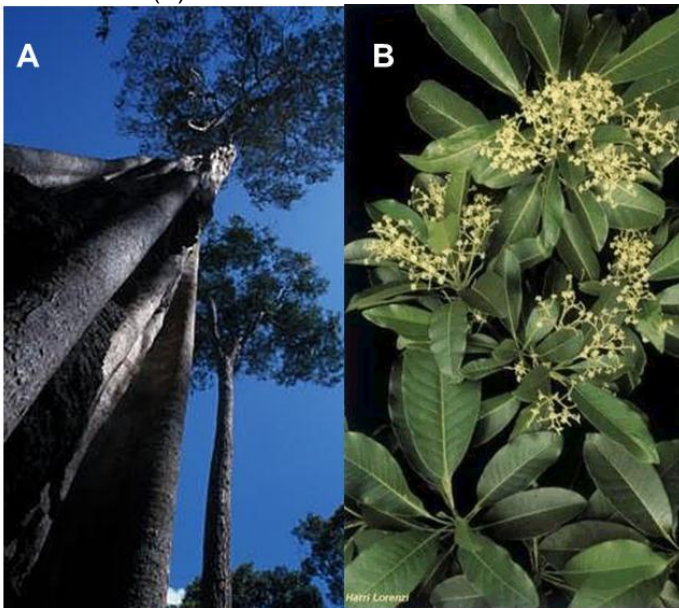
Além dos benefícios à saúde, o tratamento baseado no uso de plantas é a forma mais popular da medicina tradicional e gera lucros expressivos no mercado internacional. O lucro anual na Europa Ocidental atingiu 5 bilhões de dólares entre 2003 e 2004. Na China, as vendas de produtos naturais totalizaram 14 bilhões de dólares em 2005, e no Brasil, 160 milhões de dólares em 2007 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

Os países latino-americanos detêm grande parte da biodiversidade mundial. O Brasil possui aproximadamente 20 a 22% de todas as plantas e micro-organismos existentes, contando com mais de 56 mil espécies descritas, fato que estimula a pesquisa de novos fármacos de origem natural (CALIXTO, 2005; MELO; AMORIM; ALBUQUERQUE, 2009).

1.1.1 Gênero *Esenbeckia* e atividades farmacológicas

No Brasil, a *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Figura 1) é conhecida popularmente como Guarantã, pertence ao gênero *Esenbeckia*, família Rutaceae e subfamília Rutoideae. O gênero *Esenbeckia* inclui cerca de 30 espécies que são nativas de países da América tropical, tais como México e Brasil, incluindo principalmente os Estados brasileiros de São Paulo, Bahia, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul (DREYER et al., 1972).

Figura 1 – Imagem da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (A) e das suas folhas (B).



Fonte: Adaptado de Natureza Brasileira e Agricultura Orgânica.

Estudos farmacológicos *in vivo* e *in vitro* de algumas espécies do gênero *Esenbeckia* indicaram que a *Esenbeckia febrifuga* demonstrou atividade antimalárica e antiparasitária, e a *Esenbeckia yaaxhokob*, atividade antimicrobiana (CARVALHO et al., 1991; NAPOLITANO et al., 2004; AGUILAR-GUADARRAMA; RIOS, 2004; DOLABELA et al., 2008). Ainda, na medicina

tradicional brasileira, as cascas da *Esenbeckia febrifuga* são utilizadas como infusão para o tratamento de febre e/ou como agente antiparasitário no combate à malária pelos habitantes da Amazônia (BOTSARIS, 2007; DOLABELA et al., 2008).

Estudos químicos do gênero *Esenbeckia* indicaram a presença de diversos compostos, tais como os alcaloides do grupo das quinolonas (DREYER, 1980; DELLE MONACHE et al., 1989; NAKATSU et al., 1990; OLIVEIRA et al., 1996), limonoides (DREYER, 1980; OLIVEIRA et al., 1996), furanocumarinas e cumarinas (DREYER, 1980; OLIVEIRA et al., 1996; RIOS; DELGADO, 2002; TRANI et al., 2004), triterpenoides (MATA et al., 1998) e flavonoides (KUBO, 1991). Além disso, os alcaloides maculina, flindersiamina, kokusaginina, dictamnina, 4-metoxi-2-(3'-pentil)-1-quinolina, 1,4-dihidro-1-metil-2-(3'-pentil)quinolin-4-ona, 7-isopentenil indol, 6-isopentenil indol, 5-isopentenil indol, annonidina A, annonidina C, 7-indolcarbaldeído, leiocarpol, leiocarpadiol, leiocarpatriol A, leiocarpatriol B, leiocarpona também foram isolados das raízes da *Esenbeckia leiocarpa* Engl., e dois outros alcaloides quinolinonas: 3-metoxi-1-metil-2-propil-4-quinolona (leioquinina A) e 2 (1'-etilpropil)-1-metil-4-quinolona (leioquinina B), foram isolados das folhas dessa planta (DELLE MONACHE et al., 1989; DELLE MONACHE et al., 1990; NAKATSU et al., 1990).

Dentre os compostos citados anteriormente, estudos demonstraram que as furanocumarinas xantotoxina e felopterina, isoladas da *Esenbeckia grandiflora* por Januário e colaboradores (2009), e da *Esenbeckia ovata* por Rios e Delgado (2002), possuem atividade anti-inflamatória por inibirem o edema de pata induzido pela formalina ou pela carragenina em ratos, bem como por inibirem a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) induzida por lipopolissacarídeos em macrófagos isolados da cavidade peritoneal de ratos (CHEN et al., 1995; BAN et al., 2003). Em outro estudo, alcaloides classificados como quinolonas, classe de compostos que também foi isolada das folhas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. por Nakatsu e colaboradores (1990), inibiram a síntese de leucotrienos em um ensaio *in vitro* utilizando polimorfonucleares humanos estimulados por ionóforo de cálcio A23187 (ADAMS et al., 2004). O β-sitosterol e o dihidrocorinanteol (DHC), isolados das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl., também demonstraram efeito anti-inflamatório por reduzir a quimiotaxia de leucócitos, a exsudação, a atividade

das enzimas mieloperoxidase (MPO) e adenosina-deaminase (ADA), e a concentração de nitrito/nitrato e das citocinas interleucina-1 beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no modelo de inflamação induzida pela carragenina na bolsa de ar em camundongos (LIZ et al., 2011).

1.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é um mecanismo de reparo tecidual que ocorre após uma lesão, e consiste em uma cascata de eventos celulares e microvasculares que tem como objetivo a remoção de tecidos lesados e a geração de outros novos (SCHMID-SCHÖBEIN, 2006). Nessa cascata, observa-se aumento da permeabilidade microvascular, seguido pela adesão e infiltração de células no local da lesão, apoptose celular e crescimento de novos tecidos e vasos (MEDZHITOV, 2008; MEDZHITOV; HORNG, 2009).

A resposta inflamatória pode estar relacionada a doenças de caráter agudo, tais como alergias, e a diversas manifestações crônicas que incluem alterações metabólicas como diabetes, doenças autoimunes como a artrite reumatoide, e doenças neurogênicas ou degenerativas, entre outras (MEDZHITOV, 2008).

Na resposta imune inata ou não adaptativa, ocorre a ativação de células fagocíticas, dentre as quais se destacam os monócitos e os neutrófilos (MEDZHITOV, 2008).

Os neutrófilos são células do sistema imune inato que desempenham função protetora devido à sua capacidade de fagocitar e produzir importantes substâncias antimicrobianas, enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio, representando assim, a primeira linha de defesa contra micro-organismos patogênicos (NAUSEEF, 2007; MEDZHITOV, 2008; WITKO-SARSAT et al., 2011). As proteínas presentes nos grânulos dos neutrófilos são distribuídas em grânulos primários (azurófilos), secundários (específicos) e grânulos terciários, bem como em vesículas secretoras. Os grânulos e as vesículas são mobilizados sequencialmente durante a migração de neutrófilos do sangue para o local de inflamação (SOEHNLEIN; WEBER; LINDBOM, 2009). Nos grânulos primários, a enzima mieloperoxidase (MPO) destaca-se como um dos principais

componentes do sistema microbicida dos neutrófilos (PLIYEV, 2008).

A MPO está presente principalmente nos neutrófilos e, em menor quantidade, nos mononucleares (ARNHOLD; FLEMMIG, 2010). Esta enzima participa do mecanismo de defesa imune inato pela formação de agentes microbicidas e de espécies reativas de oxigênio (MALLE et al., 2007). Quando os neutrófilos ou macrófagos fagocitam bactérias, ocorre a formação do fagossoma. A ativação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase) e o influxo de íons no fagossoma favorecem a ativação da MPO e de outros constituintes dos grânulos azurófilos (ARNHOLD; FLEMMIG, 2010). Neste processo, há consumo intenso de oxigênio e a NADPH oxidase converte o oxigênio em radical ânion superóxido (O_2^-), o qual é dismutado a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD) (ARNHOLD; FLEMMIG, 2010). Simultaneamente, a MPO é liberada no fagossoma e catalisa a formação de ácido hipocloroso (HOCl) a partir do H_2O_2 e de íons cloreto (Cl^-) (ARNHOLD; FLEMMIG, 2010). O HOCl desempenha propriedades microbicida e oxidativa nos neutrófilos (MALLE et al., 2007; ARNHOLD; FLEMMIG, 2010). Entretanto, a ativação persistente do sistema MPO- H_2O_2 -HOCl pode gerar lesão tecidual, uma vez que o HOCl é capaz de iniciar reações oxidativas em lipídeos, no ácido desoxirribonucleico (DNA) e em lipoproteínas, podendo induzir, assim, à formação de tumores (MALLE et al., 2007; MIKA; GURUVAYOORAPPAN, 2011).

Em algumas doenças inflamatórias, como na artrite reumatoide, observa-se aumento da infiltração de neutrófilos com consequente aumento da atividade da MPO (VAN DER VEEN; WINTHER; HEERINGA, 2009). Estudos demonstraram também que a MPO pode ser utilizada como marcador de neutrofilia em condições de inflamação e sepse (FAITH et al., 2008). Além disso, observou-se que a concentração de MPO também está elevada em pacientes asmáticos (EKMEKCI et al., 2004).

Outras células importantes do sistema imune são os monócitos, os quais estão envolvidos no processo inflamatório tardio e que desempenham importante função na imunidade inata e adaptativa (AUFFRAY, SIEWEKE, GEISSMANN, 2009). A infiltração de monócitos é observada principalmente na inflamação crônica, podendo persistir por um longo período de

tempo (SCHMID-SCHÖBEIN, 2006; DALE; BOXER; LILES, 2008). Os monócitos são capazes de se diferenciarem em macrófagos após sua migração para os tecidos (AUFRAY; SIEWEKE; GEISSMANN, 2009). Além disso, macrófagos ativados podem secretar citocinas como: interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon alfa ou beta (INF- α/β) (DALE; BOXER; LILES, 2008).

A adenosina-deaminase (ADA) é outra enzima envolvida na resposta inflamatória. A ADA participa do metabolismo das purinas catalisando irreversivelmente a desaminação da desoxiadenosina e adenosina em desoxinosina e inosina, respectivamente (YEGUTKIN, 2008). A conversão da adenosina endógena em inosina reduz a disponibilidade de adenosina biologicamente ativa (DESROSIERS et al., 2007). A ADA também desempenha função importante na maturação e na ativação de monócitos e de linfócitos, podendo ser utilizada como marcador da atividade de células mononucleares (HASKÓ et al., 2007). Além disso, estudos demonstraram que a ADA desempenha importante função em muitas doenças inflamatórias, pois sua atividade e/ou concentração encontram-se elevadas em pacientes com artrite reumatoide, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), doença cardíaca coronariana, entre outras (CHAVAN; PATIL; KARNIK, 2007; BROWN; SPINA; PAGE, 2008; GOODARZI et al., 2010; ZAMANI; JAMALI; JAMALI, 2011).

A adenosina é um nucleosídeo endógeno que desempenha função importante em diferentes sistemas do organismo, incluindo os sistemas nervoso, reprodutor, cardiovascular, renal e respiratório (KUMAR; SHARMA, 2009). Os macrófagos ativados são as principais fontes de adenosina extracelular, entretanto, neutrófilos e células endoteliais também liberam grandes quantidades de adenosina em sítios inflamatórios, infecciosos e em condições de estresse oxidativo (HASKÓ et al., 2007). O efeito da adenosina nos diferentes tecidos é determinado pelo tipo de receptor ao qual se liga (KUMAR; SHARMA, 2009). Quatro receptores de adenosina, acoplados à proteína G, já foram identificados: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (FREDHOLM et al., 2001; FREDHOLM et al., 2011). Dentre estes receptores, A₁, A_{2A} e A₃ possuem alta afinidade pela adenosina, e os receptores A_{2B} possuem baixa afinidade (HASKÓ et al., 2009). Os receptores de adenosina são expressos em células,

tais como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, linfócitos T e B, macrófagos, células dendríticas, células do epitélio brônquico, fibroblastos e células endoteliais (FREDHOLM et al., 2001; BROWN; SHORT, 2008).

A ativação dos receptores de adenosina pode promover diversos efeitos biológicos, os quais algumas vezes são antagonísticos, ou seja, a ligação da adenosina em um determinado receptor pode promover um efeito anti-inflamatório ou pró-inflamatório. Por exemplo, a ligação da adenosina no receptor A_{2B} pode promover efeito pró-inflamatório. Este fato pode ser entendido pelo estudo realizado por Ryzhov e colaboradores (2008), no qual demonstraram que a ligação da adenosina nos receptores A_{2B} promoveu efeito pró-inflamatório em mastócitos da medula óssea, obtida do fêmur e da tíbia de camundongos *knockout* para este receptor, pois se observou diminuição significativa na liberação de interleucina-13 (IL-13) e do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). Da mesma forma, Anvari e colaboradores (2010) observaram que a ligação da adenosina no receptor A_{2B} também promoveu efeito pró-inflamatório pela liberação de citocinas, como TNF- α , IL-6 e derivada de queratinócitos (KC), RANTES e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) no lavado broncoalveolar, utilizando-se o modelo de isquemia-reperfusão pulmonar em camundongos. Entretanto, alguns estudos demonstraram que a ligação da adenosina no receptor A_{2B} também pode promover efeito anti-inflamatório. Neste sentido, Zhou e colaboradores (2011), evidenciaram que camundongos *knockout* para o receptor A_{2B} apresentaram aumento da inflamação pulmonar, quando expostos a bleomicina, no modelo de lesão pulmonar aguda.

Por outro lado, parece que a ligação da adenosina nos receptores A_1 , A_{2A} e A_3 promove efeito anti-inflamatório. Corroborando com este fato, Kim e colaboradores (2009) demonstraram que a deleção do receptor de adenosina A_1 aumentou a lesão renal em camundongos. Neste estudo, observou-se também o aumento do influxo de leucócitos e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como KC, TNF- α , MCP-1, proteína inflamatória de macrófagos-2 (MIP-2) e da expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), utilizando-se técnica de imunohistoquímica. Desta forma, este estudo sugere que a ligação da adenosina no receptor A_1 promove efeito anti-inflamatório e protetor para os rins (KIM et

al., 2009). Da mesma forma, Impellizzeri e colaboradores (2011) demonstraram que a ligação da adenosina no receptor A_{2A} também promoveu inibição da quimiotaxia de neutrófilos, da liberação de NO, de citocinas, tais como TNF- α e IL-1 β e da expressão de moléculas de adesão dos tipos ICAM-1 e P-selectinas no pulmão, utilizando-se o modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. Varani e colaboradores (2010) também demonstraram que a ligação da adenosina nos receptores de adenosina A_{2A} e A_3 promoveu efeito anti-inflamatório, pois diminuiu as concentrações de TNF- α e IL-8 em sinoviócitos humanos isolados das articulações de pacientes com osteoartrite. Em outro estudo, observou-se também que a ligação da adenosina no receptor A_3 promoveu efeito anti-inflamatório, pois camundongos deficientes deste receptor apresentaram aumento da migração de eosinófilos, bem como a liberação de citocinas, tais como CCL2, IL-6 e CXCL1 no pulmão, utilizando-se o modelo de inflamação induzida pela bleomicina (MORSCHL et al., 2008). Além disso, Gazoni e colaboradores (2010) demonstraram que a ligação da adenosina nos receptores A_1 , A_{2A} e A_3 promoveu efeito anti-inflamatório por meio da inibição da quimiotaxia de neutrófilos, da atividade da MPO e da liberação de TNF- α no pulmão, utilizando-se o modelo de isquemia-reperfusão em coelhos.

Além de enzimas e células que participam da resposta imune, outros mediadores também são liberados na resposta inflamatória.

O óxido nítrico (NO) é um radical livre de curta duração, liberado principalmente por células endoteliais e por macrófagos, que medeia diversos processos biológicos, tais como regulação do tônus das vias aéreas e dos vasos, inflamação, neurotransmissão e apoptose (NAGY et al., 2007; TRIPATHI et al., 2007). O NO participa da imunidade inata devido a sua ação tóxica contra organismos infecciosos e da imunidade específica, regulando a apoptose e a função de células do sistema imunológico (TRIPATHI et al., 2007; WANG et al., 2010).

Nos mamíferos, o NO é liberado a partir da conversão da arginina em citrulina por meio de uma reação catalisada por uma família de enzimas denominada óxido nítrico sintase (NOS) (THOMAS et al., 2008). Três isoformas de NOS já foram identificadas: uma induzível (iNOS, tipo II), que é ativada em resposta a estímulos inflamatórios, e duas isoformas

constitutivas, a neuronal (nNOS, tipo I) e a endotelial (eNOS, tipo III) (PERSICHINI et al., 2006; THOMAS et al., 2008). A iNOS pode ser induzida por macrófagos, células endoteliais, células da musculatura lisa vascular e miócitos, após estímulo por lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos, bem como por citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6, entre outros (PERSICHINI et al., 2006; PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007).

A concentração de NO e/ou dos seus metabólitos (nitrito/nitrato) está elevada em doenças inflamatórias, tais como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, osteoartrite, asma, entre outras (ABRAMSON, 2008; NAGY et al., 2010; ZEIGER et al., 2011).

Além do NO, as citocinas também são mediadores importantes que participam da resposta inflamatória (COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010). As citocinas são proteínas solúveis de baixo peso molecular, secretadas por diversas células, tais como neutrófilos, linfócitos, monócitos, macrófagos, mastócitos, células *natural killer* (NK), dendríticas, endoteliais, epiteliais, entre outras (COSTANTINI et al., 2009). De modo geral, as citocinas estão relacionadas a funções de crescimento, diferenciação e ativação celular, e desta forma, regulam e determinam o tipo de resposta imune (COSTANTINI et al., 2009; COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010). Dentre as citocinas pró-inflamatórias, destacam-se a IL-1 β e o TNF- α .

A IL-1 β pode ser secretada por queratinócitos, fibroblastos, células sinoviais, endotélio, neutrófilos, macrófagos, mastócitos e células de Schwann, micróglia e astrócitos, entre outros (REN; TORRES, 2009). Esta citocina está envolvida em diversos eventos inflamatórios, tais como febre, dor, vasodilatação e hipotensão, os quais estão relacionados com o efeito da IL-1 β sobre a indução da expressão gênica das enzimas ciclooxigenase-2 (COX-2), fosfolipase A₂ e óxido nítrico sintase induzida (iNOS), bem como o aumento da síntese e/ou liberação de prostaglandina E₂ (PGE₂), fator ativador de plaquetas (PAF) e óxido nítrico (NO) (DINARELLO, 2009). Outra propriedade pró-inflamatória importante da IL-1 β é a sua capacidade de aumentar a expressão de moléculas de adesão, tais como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), em células mesenquimais e a molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1), em células endoteliais, promovendo, desta forma, a quimiotaxia de

leucócitos para o sítio da inflamação (DINARELLO, 2009). Os efeitos da IL-1 β são mediados pela ativação de seus receptores: IL-1R tipo 1 (IL-1RI) ou IL-1R tipo 2 (IL-1RII) (GABAY et al., 2010). Além disso, os efeitos da IL-1 β podem ser regulados pelo antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) que pode se ligar ao receptor de IL-1, impedindo que esta citocina promova seus efeitos pró-inflamatórios (GABAY et al., 2010). Com base nisso, foi desenvolvido o medicamento Anakinra®, o qual mimetiza o IL-1Ra se ligando diretamente ao receptor de IL-1, e é utilizado para o tratamento da artrite reumatoide (HOFFMAN, 2009). A concentração de IL-1 β está aumentada em algumas doenças, tais como artrite reumatoide, esclerose múltipla, peritonite e asma (HUSSEIN et al., 2008; HASTIE et al., 2010; BADIU, et al., 2011; MARTINS et al., 2011).

O TNF- α é outra citocina pró-inflamatória liberada por neutrófilos, macrófagos, células T e B, células NK, mastócitos, células endoteliais, células musculares cardíacas e lisas, fibroblastos, osteoclastos e células do estroma, entre outras (BRADLEY, 2008; CANTAERT et al., 2010). Esta citocina é um importante indutor da expressão de molécula de adesão intercelular tipo 1 (ICAM-1), de molécula de adesão vascular tipo 1 (VCAM-1) e de E-Selectinas. As moléculas de adesão, por sua vez, estimulam a quimiotaxia de leucócitos para o local da inflamação (BRADLEY, 2008). Além disso, o TNF- α também é capaz de induzir a sua própria liberação ou a liberação de outras citocinas, como a IL-1 β (BRADLEY, 2008; CANTAERT et al., 2010). O TNF- α pode se ligar a dois receptores: TNFR1 ou TNFR2 e, juntamente com complexos proteicos, tais como o fator 2 associado ao receptor de TNF- α (TRAF2), promove a ativação do fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B). Este fator de transcrição, por sua vez, pode ativar cascatas de sinalização que promovem diferentes respostas biológicas, tais como apoptose, sobrevivência, diferenciação, proliferação e/ou migração celular (BRADLEY, 2008; NAUDÉ et al., 2011; WAJANT; SCHEURICH, 2011).

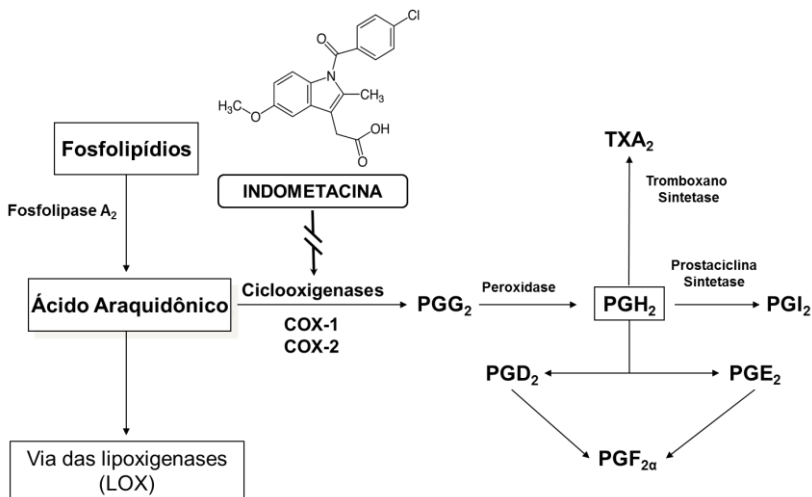
Uma das principais funções biológicas do TNF- α é a defesa contra infecções bacterianas, virais e parasitárias. Entretanto, a concentração do TNF- α está elevada em doenças inflamatórias, tais como artrite reumatoide, esclerose múltipla, psoríase, doença intestinal inflamatória, peritonite, asma e DPOC, o que indica a participação desta citocina em processos

inflamatórios (DALDEGAN; TEIXEIRA; TALVANI, 2005; MOUSA; GONCHARUCK; MILLER, 2007; HUSSEIN et al., 2008; ABDELHAMID et al., 2011; BADIU, et al., 2011; BOUGUEN; CHEVAUX; PEYRIN-BIROULET, 2011; MARTINS et al., 2011).

1.3 FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) são os medicamentos mais comumente utilizados no tratamento de doenças inflamatórias, uma vez que são eficazes contra os efeitos decorrentes da liberação de mediadores pró-inflamatórios, tais como citocinas, leucotrieno B₄, prostaglandina E₂, prostaglandina I₂, espécies reativas de oxigênio, entre outros. Os AINEs exercem seu efeito anti-inflamatório via inibição da enzima ciclooxigenase (COX), impedindo, desta forma, a síntese de eicosanoides, tais como a prostaglandina E₂ (PGE₂) (SÜLEYMAN; DEMIRCAN; KARAGÖZ, 2007; RAO; KNAUS, 2008). Neste estudo, utilizou-se a indometacina como fármaco anti-inflamatório de referência. A figura 2 ilustra a via do ácido araquidônico e o mecanismo de ação anti-inflamatória dos AINEs.

Figura 2 – Via do ácido araquidônico e mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs).



Os AINEs atuam inibindo a enzima ciclooxigenase (COX) que catalisa a síntese de prostaglandinas. PGG₂ = prostaglandina G₂, PGH₂ = prostaglandina H₂, PGI₂ = prostaglandina I₂ ou prostaciclina, PGD₂ = prostaglandina D₂, PGE₂ = prostaglandina E₂, PGF_{2α} = prostaglandina F₂ alfa, TXA₂ = tromboxano A₂.

Seta contínua (→) = conversão;

seta interrompida (—/—/→) = inibição.

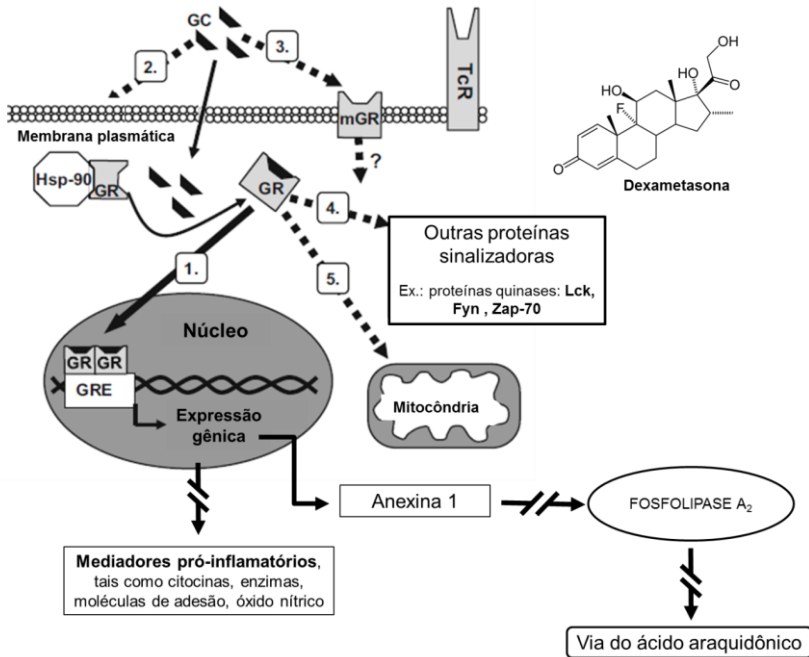
Fonte: Adaptado de DANNHARDT; KIEFER, 2001.

Assim como os anti-inflamatórios não-esteroidais, os glicocorticoides também são fármacos utilizados como agentes anti-inflamatórios (FLAMMER; ROGATSKY, 2011). No presente estudo, utilizou-se a dexametasona como fármaco anti-inflamatório de referência. O mecanismo de ação anti-inflamatória dos glicocorticoides é classificado em genômico e não-genômico (BARNES, 2010; FLAMMER; ROGATSKY, 2011). O efeito genômico ocorre por meio da ligação do glicocorticoide a um receptor específico presente na membrana citoplasmática celular, seguida da translocação do complexo glicocorticoide-receptor para o núcleo, onde o mesmo atua como um fator de transcrição, ligando-se a elementos responsivos aos glicocorticoides na região promotora de diversos genes alvos e,

desta forma, modula a expressão gênica de diversos mediadores por transrepressão ou transativação (BOLDIZSAR et al., 2010). Por meio da transrepressão gênica, o complexo receptor-glicocorticoide impede a transcrição de genes alvo, tais como de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, IL-13, IL-15, TNF- α), de enzimas pró-inflamatórias (iNOS, COX-2 e fosfolipase A₂), de fatores de crescimento, de moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1), além de inibir a expressão gênica do óxido nítrico, de prostanoídes, autacoídes, entre outros (PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009; BARNES et al., 2010).

Por outro lado, a transativação gênica promove a transcrição de genes de citocinas anti-inflamatórias, tais como da IL-10 e da IL-12, do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra), da anexina 1, do I κ B- α , que é um inibidor do NF- κ B, além de aumentar também a expressão gênica da proteína quinase fosfatase-1 ativada por mitógenos (MKP-1), a qual inibe a via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009; BARNES, 2010). Além disso, os glicocorticoides promovem também os efeitos não-genômicos, os quais podem ser classificados em 4 mecanismos: 1) sinalização por meio de um receptor de membrana citoplasmática, 2) efeito direto na membrana citoplasmática, 3) interação do receptor de glicocorticoide com outras proteínas sinalizadoras no citoplasma celular, tais como as proteínas quinases Lck, Fyn e Zap-70, e 4) translocação do receptor de glicocorticoide para a mitocôndria (BOLDIZSAR et al., 2010). O mecanismo de ação anti-inflamatória dos glicocorticoides está descrito resumidamente na figura 3.

Figura 3 – Vias de sinalização genômica e não-genômica dos glicocorticoides em células T.



1) via genômica clássica, demonstrando a transativação gênica da anexina 1, a qual inibe a enzima fosfolipase A₂, inibindo a via do ácido araquidônico, e a transrepressão gênica de mediadores pró-inflamatórios; 2) efeitos diretos na membrana; 3) sinalização por meio de um receptor de membrana (mGR); 4) interação do GR com proteínas sinalizadoras citoplasmáticas; 5) via mitocondrial. GC = glicocorticoide, GR = receptores de glicocorticoides, GRE = elementos responsivos aos glicocorticoides, TcR = receptor de células T.

Seta contínua (\longrightarrow) = vias de sinalização genômica;
 setas tracejadas ($-\ - \longrightarrow$) = vias de sinalização não-genômica;
 seta interrompida ($\not\longrightarrow$) = inibição.

Fonte: Adaptado de BOLDIZSAR et al., 2010.

1.4 MODELOS DE INFLAMAÇÃO

Diferentes modelos para a avaliação do efeito anti-inflamatório de fármacos e/ou plantas já foram descritos. Entre eles destacam-se a pleurisia, a bolsa de ar, o edema de pata, a artrite e o implante de esponjas embebidas em agentes irritantes (SEDGWICK; LEES, 1986).

Diversas doenças de caráter inflamatório induzem à formação de edema, à infiltração de leucócitos e à liberação de vários mediadores pró-inflamatórios. Dentre as doenças das vias aéreas que envolvem resposta inflamatória, destaca-se a asma brônquica, que, em relação à celularidade, pode ser do tipo eosinofílica ou neutrofílica.

Alguns animais, tais como cobaia, camundongos e ratos são utilizados em modelos experimentais de asma. Esses modelos permitem avaliar as alterações morfológicas, imunológicas e fisiológicas das vias respiratórias que podem mimetizar alguns eventos que ocorrem na asma humana (LEWKOWICH; WILLS-KARP, 2008).

Dentre os modelos experimentais para indução de inflamação pulmonar, pode-se destacar o modelo de inflamação eosinofílica. Como exemplo, Fukunaga e colaboradores (2007) utilizaram camundongos BALB/C ou C57BL/6, que foram sensibilizados com ovalbumina (OVA) e o adjuvante hidróxido de alumínio, uma vez que as vias aéreas dos camundongos sensibilizados com este agente flogístico apresentam resposta alérgica imediata e tardia, similar à asma alérgica que ocorre em humanos. Nesse modelo experimental, o lavado bronco-alveolar foi coletado um ou dois dias após o desafio, permitindo a avaliação de parâmetros inflamatórios, tais como eosinófilos e macrófagos, além da dosagem de imunoglobulina E (IgE) no soro do animal. Desta forma, esse modelo experimental com OVA pode ser utilizado para mimetizar os efeitos que ocorrem na asma humana eosinofílica (FUKUNAGA et al., 2007).

Outro modelo experimental de inflamação pulmonar utiliza a inoculação de vírus sincicial respiratório (VSR), uma vez que infecções virais do trato respiratório são comuns, e podem deflagrar a asma ou exacerbar os sintomas desta doença (DULEK; PEEBLES, 2011). Nesse sentido, Tourdot e colaboradores (2008) expuseram camundongos ao VSR, administrado por via intranasal, e avaliaram parâmetros

imunológicos sistêmicos e locais, tais como o estudo do remodelamento das vias aéreas, a liberação de diversos mediadores inflamatórios e a celularidade. A desvantagem desse modelo é que o uso de vírus necessita de maiores investimentos laboratoriais, considerando que o cultivo e os métodos de infecção, em geral, são mais complexos (TOURDOT et al., 2008).

Existem ainda modelos de inflamação pulmonar combinados, nos quais os camundongos são expostos a alérgenos (OVA) e a vírus (VSR), permitindo a avaliação da resposta inflamatória local e sistêmica (CHI et al., 2011). Este tipo de modelo é importante, pois estudos demonstraram que pacientes com asma alérgica, quando expostos a infecções virais, apresentam episódios de hiperresponsividade das vias aéreas e exacerbação da doença (KLOEPFER; GERN, 2010).

Além disso, existem modelos experimentais em camundongos que mimetizam a asma neutrofílica. Nesta condição, a resposta inflamatória pulmonar apresenta predomínio do influxo de neutrófilos (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). Dentre os modelos utilizados, destacam-se a indução de infecção pulmonar com *Pseudomonas aeruginosa* e o uso de lipopolissacarídeos (LPS) para estimular a resposta imune inata (HOFFMANN et al., 2005; DONG et al., 2009). Outro modelo que também mimetiza a asma neutrofílica é o da pleurisia induzida pela carragenina (Cg) em camundongos.

A Cg é uma mistura de polissacarídeos derivados principalmente das algas *Chondrus crispus*, cujo nome popular é musgo-irlandês (BRITO, 1989). Essa substância é o irritante mais utilizado para a indução de inflamação em estudos experimentais (BRITO, 1989). No modelo de inflamação induzida pela carragenina em camundongos, observa-se uma resposta inflamatória do tipo bifásica, sendo que na primeira fase (4 h) desta resposta ocorre a formação de exsudato e o aumento da infiltração de leucócitos, principalmente neutrófilos, na cavidade pleural dos camundongos. Na segunda fase (48 h), observa-se também aumento da exsudação, bem como de leucócitos do tipo mononucleares (SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1996). De acordo com Tsuji e colaboradores (2003), a carragenina promove sua ação pró-inflamatória por ativar receptores celulares do tipo *toll-like* 4 (TLR4) em macrófagos e linfócitos.

O modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos mimetiza a asma neutrofílica que ocorre em humanos, uma vez que neste modelo experimental evidencia-se uma resposta do tipo bifásica que também ocorre na asma humana. Além disso, a expressão gênica de receptores TLR2, TLR4, CD14 e proteína surfactante A (SP-A), encontra-se aumentada em pacientes com asma (REYNOLDS et al., 2007).

Neste trabalho, optou-se pelo modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, utilizando-se apenas a primeira fase da resposta inflamatória que corre 4 h após a indução da inflamação na cavidade pleural pelo agente flogístico carragenina, uma vez que foi avaliada grande quantidade de frações, subfrações e compostos isolados ou modificados quimicamente. A planta alvo deste estudo foi a *Esenbeckia leiocarpa* Engl., pois, além de ser uma planta nativa do Brasil, é rica em alcaloides, e várias destas substâncias são reconhecidas por possuírem efeito anti-inflamatório. Ainda, realizamos um estudo de relação estrutura-atividade entre o composto majoritário isolado da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. e cinco análogos, sendo importante este tipo de estudo para avaliar um possível grupo farmacofórico na estrutura do composto, além da obtenção de novas substâncias estruturalmente semelhantes, porém, que possam desempenhar efeitos biológicos, potência ou efeitos adversos diferentes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto hidroalcoólico, frações, subfrações e compostos isolados das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl., administrados sistemicamente, utilizando-se o modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto, frações, subfrações e composto isolado sobre a migração dos leucócitos (polimorfonucleares e mononucleares) e a exsudação;
- b) Investigar o efeito do extrato bruto, frações, subfrações e composto isolado sobre a atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e adenosina-deaminase (ADA);
- c) Investigar o efeito do extrato bruto, frações, subfrações e composto isolado sobre as concentrações de nitrito/nitrato (NO_x), fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) e interleucina-1 beta ($\text{IL-1}\beta$);
- d) Avaliar a toxicidade do extrato bruto hidroalcoólico da *E. leiocarpa* por meio da análise da curva de sobrevivência;
- e) Estabelecer relação estrutura-atividade entre o composto majoritário isolado da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. e compostos análogos, modificados quimicamente, por meio do estudo da inibição do influxo de leucócitos e da exsudação.

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAL VEGETAL

3.1.1 Coleta do material vegetal

As cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. foram coletadas pela Dra. Danielle Fontana Pereira no município de Arenópolis, Estado do Mato Grosso. A identificação da espécie foi realizada pela bióloga Dra. Celice Alexandre da Universidade Estadual do Mato Grosso (UNEMAT – Campus Tangará da Serra/MT). A excisata foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT - Cuiabá/MT) sob o número de registro 38639.

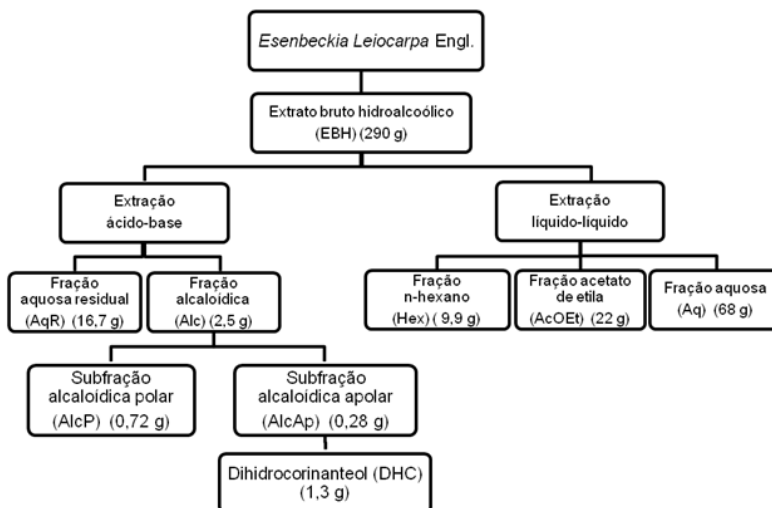
3.1.2 Obtenção do extrato, frações, subfrações e compostos isolados

As análises fitoquímicas foram realizadas pelo Dr. Heros Horst, no Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN) da UFSC, sob a orientação do professor Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti.

As cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. foram secas em temperatura ambiente (25 °C) e sob proteção da luz durante uma semana. Após a secagem, 5400 g foram triturados em partículas de 1,5 mm utilizando-se um moinho de facas (Mill TE-651, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil). O material vegetal moído foi extraído com 8 L de etanol a 96% (droga vegetal:etanol 1:8, m/v) em temperatura ambiente. Após dez dias, o extrato obtido foi filtrado em papel Whatman n^o 1 e o etanol foi removido em Rotavapor (Fisatom-802, São Paulo, SP, Brasil) a 55 °C, sob pressão reduzida (460 mmHg) (Vaccum Q-355A2, Quimis, Diadema, SP, Brasil). Esse procedimento de extração foi repetido três vezes durante um mês para obter-se o rendimento máximo do extrato bruto hidroalcoólico (EBH), que foi de 290 g. Uma amostra de 100 g do EBH foi fracionada por extração líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, resultando na obtenção das seguintes frações: n-hexano (Hex) (9,9 g), acetato de etila (AcOEt) (22 g) e aquosa (Aq) (68 g).

Na sequência, realizou-se uma análise preliminar do EBH utilizando-se cromatografia em camada delgada (CCD). Este extrato foi submetido a CCD em placas de sílica gel 60 F254 (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) com solvente acetona-hexano-hidróxido de amônio (30:65:5). As bandas originadas na CCD foram pulverizadas com o reagente de Dragendorff, resultando na cor laranja que indicou a presença de alcaloides. Após esta confirmação preliminar, parte do EBH foi submetida à extração ácido-base para produzir uma fração rica em alcaloides (Alc) (2,5 g) e uma fração aquosa residual (AqR) (16,7 g). Logo, a fração Alc foi extraída com éter etílico para originar duas subfrações alcaloídicas com diferentes polaridades: uma insolúvel em éter, alcaloídica polar (AlcP) (0,72 g), e a outra solúvel em éter, alcaloídica apolar (AlcAp) (0,28 g). Além disso, a subfração AlcAp (1 g) foi submetida a uma coluna cromatográfica de sílica gel 60 CC, com tamanho das partículas entre 0,063 e 0,2 mm (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil), para isolar o composto majoritário. O produto derivado dos procedimentos de extração das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. está ilustrado na figura 4.

Figura 4 – Diagrama da sequência de obtenção do extrato bruto hidroalcoólico, frações, subfrações e composto isolado das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl.



AcOEt = fração acetato de etila, Alc = fração alcaloídica, AlcAp = subfração alcaloídica apolar, AlcP = subfração alcaloídica polar, Aq = fração aquosa, AqR = fração aquosa residual, DHC = dihidrocorinanteol, EBH = extrato bruto hidroalcoólico, Hex = fração n-hexano.

3.1.3 Eletroforese capilar do extrato bruto, frações e subfrações da *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

Os experimentos envolvendo a separação dos compostos presentes no EBH, frações e subfrações foram realizados em sistema de eletroforese capilar (HP^{3D}CE, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) pela doutoranda Melina Heller, sob orientação do professor Dr. Gustavo Micke. Este sistema é equipado com um detector de arranjo de diodos (DAD) (215 nm), temperatura de 25 °C, e aquisição e tratamento dos dados em software (HP ChemStation, B.04.02). As amostras do EBH, frações (Hex, AcOEt, Aq, e Alc) e subfrações (Alc polar e Alc apolar) foram injetadas de maneira hidrodinâmica com pressão de 50 mBar durante 3 s, e o sistema eletroforético foi operado em polaridade normal com tensão constante de 30 kV desde a injeção. Em todos os experimentos, foi utilizado um capilar de

sílica fundida de 48,5 cm (40 cm de comprimento efetivo) x 50 µm ID x 375 µm OD (Polymicro, Phoenix, AZ, EUA). Além disso, a benzilamina foi utilizada como padrão interno, e os resultados foram expressos em porcentagem, considerando-se a massa total do composto majoritário em relação à massa do EBH, frações e subfrações (% m/m).

3.1.4 Elucidação estrutural do composto majoritário isolado da *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

O isolamento e a elucidação da estrutura química do composto majoritário foram determinados na subfração Alc apolar, pois esta subfração apresentou maior concentração do composto do que as demais frações ou subfrações. A elucidação estrutural baseou-se nas características físicas e em dados espectrais obtidos por análise de infravermelho (IR) (Perkin Elmer FTIR 16 PC, Beaconsfield, Bucks, Inglaterra) e ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C RMN) realizada no espectrômetro Varian AS-400 (Palo Alto, CA, EUA) utilizando-se as frequências de 400 e de 100 MHz, respectivamente. Medidas de rotação óptica foram realizadas no polarímetro Schmidt-Haensch E Polartronic (Berlim, Alemanha). Finalmente, a estrutura do composto isolado foi confirmada por comparação com dados da literatura (TAVEIRA et al., 1992).

A espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS) $[\text{M}+\text{H}]^+$ também foi utilizada como metodologia auxiliar na elucidação da estrutura do composto majoritário presente no EBH, frações e subfrações isolado das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. O espectrômetro de massas QTRAP 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, ON, Canadá) é um sistema híbrido Triplo Quadrupolo/ion trap linear, acoplado a uma bomba de infusão Harvard Plus 11 (Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA). A espectrometria de massas foi ajustada no modo negativo e positivo pela infusão da solução de polipropilenoglicol (PPG). Os experimentos foram realizados utilizando-se uma fonte de *electrospray* TurbolonSprayTM no modo íon positivo. A agulha capilar foi mantida em 5500 V, e o potencial de desagregação (DP) foi criado em 56 V. Ar sintético foi utilizado como gás nebulizante (GS1) a uma pressão de 15 psi e o nitrogênio (10 psi) foi utilizado como Cortina de GásTM na interface com a finalidade de

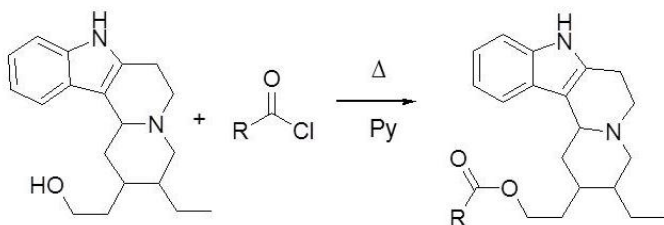
transformar a amostra para o estado gasoso. Uma alíquota do composto isolado foi diluída a 5,0 mg/mL em metanol/água (50/50 v/v) e foi injetada no espectrômetro de massas na velocidade de 10 mL/min.

3.1.5 Modificações estruturais do composto majoritário isolado da *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

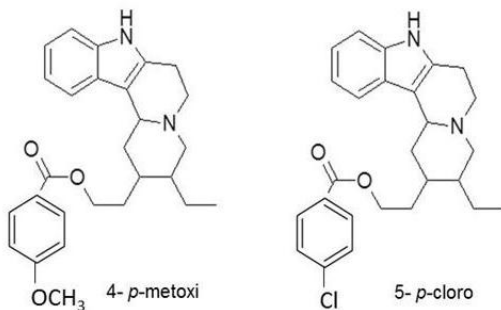
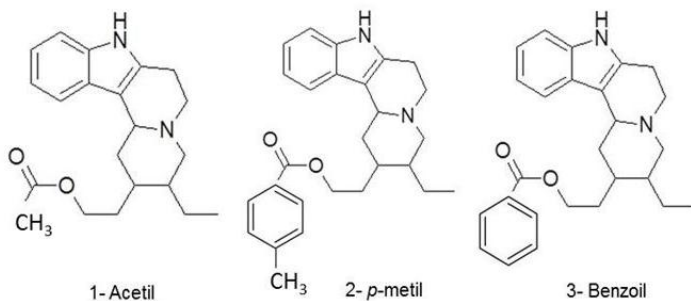
O alcaloide DHC foi submetido a modificações estruturais por meio de reações de substituição nucleofílica de acilação, realizadas pelo doutorando Leandro Espíndola, sob orientação do professor Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti (LQPN-UFSC). Para tal, o composto DHC (1 equivalente) foi dissolvido em piridina (Py) e tratado com cloreto de acila, cloreto de *p*-metilbenzoil, cloreto de benzoil, cloreto de *p*-metoxibenzoil e cloreto de *p*-clorobenzoil (*p*-Cl-benzoil) (1,2 equivalente) sob temperatura de 90 °C (Figura 5). O sistema reacional foi monitorado por CCD até que todo substrato fosse consumido. O produto da reação de síntese foi confirmado por análises de RMN de ¹H.

As modificações estruturais do composto foram parcialmente realizadas de acordo com a Árvore de Decisão de Topliss. Este diagrama consiste em um método para a obtenção de análogos, o qual se baseia em algumas características físico-químicas do composto, tais como hidrofobicidade e efeitos eletrônicos (TOPLISS, 1972).

Figura 5 – Reação química demonstrando as modificações estruturais do dihidrocorinanteol (DHC) e seus produtos.



R = 1. CH₃, 2. C₇H₇-*p*, 3. C₆H₅, 4. C₇H₇O-*p*, 5. C₆H₄Cl-*p*



1- Acetil = acetildihidrocorinanteol,
 2- *p*-metil = *p*-metilbenzoildihidrocorinanteol, 3- Benzoil =
 benzoildihidrocorinanteol, 4- *p*-metoxi =
p-metoxibenzoildihidrocorinanteol e 5- *p*-cloro =
p-clorobenzoildihidrocorinanteol. Py = piridina, Δ = 90 °C.

3.2 ANIMAIS

Nos experimentos *in vivo*, foram utilizados camundongos albinos *Swiss*, 1 mês de idade, fêmeas, pesando entre 18 e 25 g, fornecidos pelo Biotério Central da UFSC.

Os animais foram acomodados em gaiolas plásticas com serragem, sob temperatura ambiente e luz natural, e os mesmos receberam alimentação e água *ad libitum*. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – protocolo número PP00343/CEUA/2009) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.2.1 Procedimento anestésico

A anestesia foi induzida com pentobarbital (60 mg/kg), administrado por via intraperitoneal, a fim de possibilitar a administração do corante azul de Evans (25 mg/kg) administrado por via intravenosa (i.v.).

3.2.2 Eutanásia dos animais

Os animais foram submetidos à morte indolor assistida com *overdose* de pentobarbital (180 mg/kg).

3.3 PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS

A técnica da pleurisia foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por Saleh, Calixto e Medeiros (1996).

No dia do experimento, os animais receberam 0,1 mL de solução salina estéril (NaCl 0,95%) ou do agente flogístico carragenina (Cg, 1%), administrados na cavidade pleural direita através do espaço intercostal utilizando-se uma agulha 13 x 5 mm, adaptada a uma cânula de poliestireno. De acordo com cada protocolo experimental, os animais foram submetidos à morte indolor assistida com *overdose* de pentobarbital 4 h após a administração da carragenina. A seguir, os mesmos foram fixados em mesa cirúrgica, em declive de 30° a 45°, e realizou-se uma incisão transversal na pele e nos músculos abdominais. Logo, o apêndice xifoide foi pinçado e a cavidade pleural foi exposta através de duas incisões paralelas ao longo do esterno.

Imediatamente, a cavidade pleural foi lavada com duas alíquotas de 0,5 mL (totalizando 1 mL) de solução salina tamponada [pH 7,6, NaCl (130 mM), Na₂HPO₄ (5 mM), KH₂PO₄ (1 mM) e heparina (20 UI/mL)]. Alíquotas do lavado da cavidade pleural foram coletadas com auxílio de pipeta automática para a quantificação dos números total e diferencial de células. Conforme o protocolo experimental, 10 minutos antes da administração do EBH, frações, subfrações ou composto isolado, alguns grupos de animais receberam a injeção com a solução azul de Evans (25 mg/kg, 0,2 mL/animal, i.v.) que permite a determinação indireta da concentração da exsudação no lavado da cavidade pleural (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996).

Para análise da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e adenosina-deaminase (ADA), bem como da concentração das citocinas: interleucina 1-beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), e do nitrito/nitrato (NO_x), os animais não receberam a injeção com azul de Evans, uma vez que este corante pode interferir nas dosagens colorimétricas empregadas para a quantificação desses parâmetros.

A indometacina (5 mg/kg) e a dexametasona (0,5 mg/kg) foram utilizadas como fármacos de referência de ação anti-inflamatória, e foram administradas por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina.

Para o estudo da curva dose-resposta, diferentes grupos de animais foram tratados previamente à indução da inflamação com diferentes doses de EBH (10 - 100 mg/kg), fração Hex (10 - 50 mg/kg) fração AcOEt (10 - 50 mg/kg), fração Aq (2 - 10 mg/kg), fração Alc (1 - 10 mg/kg), subfração Alc Polar (0,5 - 5 mg/kg), subfração Alc Apolar (0,1 - 2 mg/kg) ou composto DHC (0,1 - 0,5 mg/kg) administrados por via intraperitoneal 0,5 h antes da administração da carragenina. Após 4 h, os animais foram submetidos à morte indolor assistida e a migração celular e a exsudação foram analisadas. Em relação aos solventes utilizados, a fração Aq foi solubilizada em NaCl (0,95%), enquanto que o EBH, outras frações, subfrações e compostos foram solubilizados em uma mistura de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) em NaCl (0,95%).

No estudo do perfil temporal, diferentes grupos de animais receberam a injeção de uma única dose do EBH, ou seja, a melhor dose (menor dose capaz de inibir o influxo de leucócitos e/ou exsudação) em diferentes períodos de tempo de tratamento

prévio à carragenina (0,5, 1 ou 2 h). A migração celular e a concentração da exsudação foram avaliadas também 4 h após a administração da carragenina. A partir do estudo da curva tempo-resposta, os resultados obtidos para o EBH foram aplicados para as frações, subfrações e composto isolado.

De acordo com os resultados obtidos nos estudos das curvas dose-resposta e tempo-resposta, foram utilizadas as doses de EBH (25 mg/kg), fração Hex (50 mg/kg), fração AcOEt (50 mg/kg), fração Aq (5 mg/kg), fração Alc (10 mg/kg), das subfrações AlcP (1 mg/kg) e AlcAp (0,5 mg/kg) ou do composto DHC (0,25 mg/kg), administrados 0,5 h antes da indução da inflamação pela Cg, para a análise do material vegetal sobre a atividade das enzimas MPO e ADA, e sobre as concentrações de NO_x, IL-1 β e TNF- α .

A Tabela 1 indica os valores das doses dos fármacos dexametasona e indometacina, bem como das melhores doses do DHC e seus compostos análogos: DHC-acetil, DHC-*p*-metil, DHC-benzoil, DHC-*p*-metoxi e DHC-*p*-cloro utilizadas neste estudo, em miligrama por quilograma (mg/kg) e em micromolar (μ M).

Tabela 1 – Relação entre a concentração de fármacos e compostos em miligrama por quilograma (mg/kg) e micromolar (μ M)

Fármaco/composto	Dose(s) (mg/kg)	Dose(s) (μM)
Dexametasona	0,5	0,32
Indometacina	5,0	3,5
DHC	0,25	0,21
DHC-acetil	0,25	0,19
DHC- <i>p</i> -metil	0,25	0,15
DHC-benzoil	0,25	0,16
DHC- <i>p</i> -metoxi	0,25	0,15
DHC- <i>p</i> -cloro	1,0	0,15

DHC = dihidrocorinanteol

3.4 TÉCNICAS UTILIZADAS

3.4.1 Contagem total e diferencial dos leucócitos

Alíquotas do lavado da cavidade pleural (200 μL) foram reservadas para a contagem celular total, utilizando-se líquido de Türk (1:20) e câmara de Neübauer com auxílio de microscópio ótico comum (aumento de 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), os mesmos foram corados pelo método de May-Grünwald-Giemsa. A contagem celular diferencial (polimorfonucleares e mononucleares) foi realizada também em microscópio ótico 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 ($\times 10^6$).

3.4.1.1 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 da cavidade pleural foram centrifugadas em citocentrífuga (Wescor-Cytopro, Logan, Utah, EUA) e 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 min. A seguir, adicionou-se água deionizada (1 mL) sobre as lâminas com auxílio de pipeta automática com capacidade de 1 mL. Após 3 min, o corante foi removido e as lâminas foram cobertas com corante Giemsa (diluído 1:20 em água deionizada) por 15 min. Por fim, as lâminas foram lavadas com água deionizada e secas à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em número total de células ($\times 10^6$).

3.4.2 Determinação da exsudação

Uma alíquota (200 μL) do lavado da cavidade pleural foi reservada para a determinação da concentração de azul de Evans. Este parâmetro, avaliado no lavado pleural, foi

mensurado por meio da densidade ótica em leitora de microplacas de enzaimunoensaio (ELISA) (Organon Teknica, Roseland, New Jersey, EUA), em comprimento de onda de 620 nm, de acordo com a metodologia descrita por Saleh, Calixto e Medeiros (1996). Para a quantificação das concentrações de azul de Evans, curvas padrão com concentrações previamente conhecidas do corante (0,1 - 25 µg/mL) tiveram suas densidades óticas determinadas em 620 nm, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos. Os valores das concentrações de azul de Evans foram expressos em µg/mL, com o auxílio da equação da reta.

3.4.3 Determinação da atividade da mieloperoxidase

A determinação da MPO foi realizada imediatamente após a coleta do lavado da cavidade pleural. Alíquotas de 20 µL do lavado ou do padrão [MPO de neutrófilos humanos (0,7 - 140 mU/mL)] foram transferidos para microplacas de ELISA e a reação enzimática foi iniciada com a adição de 180 µL de solução (0,167 mg/mL de orto-dianisidina 2HCl e 0,0005% de H₂O₂). Após 15 minutos de incubação, a temperatura ambiente, a reação foi interrompida com a adição de 30 µL de azida sódica (1%) (RAO et al., 1993). Em seguida, as microplacas contendo as amostras foram lidas em leitora de microplacas de ELISA (Organon Teknica, Roseland, New Jersey, EUA) em 450 nm. Curvas-padrão com atividades conhecidas da MPO (0,7 - 140 mU/mL) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos. Os valores da atividade da MPO foram expressos em mU/mL, com o auxílio da equação da reta.

3.4.4 Determinação da atividade da adenosina-deaminase

Inicialmente, amostras padrões com concentrações conhecidas (volume final 2500 µL) de NaH₂PO₄.H₂O (35 mM), Na₂HPO₄.12H₂O (15 mM) e NH₃SO₄ (15 mM) foram preparadas para se obter uma curva-padrão (10 - 50 U/L). As amostras do lavado da cavidade pleural (20 µL) foram transferidas para cubetas, iniciando-se a reação enzimática com a adição da solução de tampão fosfato [pH 6,5, 500 µL, composição: NaH₂PO₄.H₂O (35 mM), Na₂HPO₄.12H₂O (15 mM) e adenosina

(0,5 mM)]. A reação foi bloqueada após 1 h de incubação a 37 °C pela adição da solução de fenol (1 mM) (1000 µL), nitroprussiato de sódio (0,17 mM) e tampão fosfato (1000 µL: NaOCl: 11 mM) (GIUSTI; 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 leitora de microplacas de ELISA (Organon Teknica, Roseland, New Jersey, EUA) em 620 nm. Os valores da atividade da adenosina-deaminase (ADA) foram expressos em U/L, com auxílio da equação da reta.

3.4.5 Análise quantitativa do nitrito/nitrato

A concentração do óxido nítrico (NO) foi determinada pela formação de seus metabólitos nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), por meio da reação de Griess (GREEN et al., 1982). Para isto, alíquotas de 300 µL de cada amostra do lavado da cavidade pleural foram submetidas à desproteinização. Para cada amostra, foram adicionados 20 µL de solução de sulfato de zinco (20%) e estas foram incubadas em banho de gelo por 60 minutos. As amostras foram centrifugadas (2.500 rpm por 15 minutos) obtendo-se, desta forma, um sobrenadante límpido. A seguir, 100 µL do sobrenadante foram transferidos para uma cubeta e diluídos em solução contendo 200 µL de cloreto de vanádio (0,8%) (p/v) e ácido clorídrico (HCl) (3%) (p/v). Nesta mesma cubeta, foram adicionados 300 µL de solução de Griess [sulfanilamida 1% (p/v), ácido fosfórico 5% (v/v) e N-(1-naftil) etilenodiamina 0,1% (p/v)] e a mesma foi incubada por 40 minutos, a 37 °C (MIRANDA; ESPEY; WINK, 2001). A reação de NO_2^- com esse reagente produz uma coloração rósea, que foi quantificada por meio da leitura das densidades óticas em leitora de microplacas de ELISA (Organon Teknica, 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 a quantificação dos valores de nitrito/nitrato no lavado da cavidade pleural, em µM, com auxílio da equação da reta.

3.4.6 Determinação das concentrações de IL-1 β e TNF- α

Para estas determinações, amostras do lavado da cavidade pleural foram coletadas e processadas imediatamente, utilizando-se a técnica de ELISA tipo sanduíche (Immuno Biological Laboratories Co. Ltd. Japan). Neste protocolo, foram utilizados anticorpos monoclonais. Padrões com concentrações conhecidas foram também realizados de acordo com as instruções dos fabricantes .

As sensibilidades identificadas foram: IL-1 β = 5,0 pg/mL e TNF- α = 1,67 pg/mL. Os coeficientes de variação (CV) intraensaios para IL-1 β e TNF- α foram de $6,2 \pm 0,4\%$ e de $7,8 \pm 0,9\%$, respectivamente. Enquanto os CV interensaios para IL-1 β e TNF- α foram de $5,1 \pm 0,6\%$ e $9,6 \pm 2,1\%$, respectivamente. As densidades óticas de curvas-padrão com concentrações conhecidas de IL-1 β e TNF- α também foram determinadas, permitindo-se a quantificação dos valores desconhecidos com o auxílio da equação da reta. As leituras das citocinas IL-1 β e TNF- α e suas respectivas curvas-padrão foram realizadas em leitora de microplacas de ELISA (Organon Teknica, Roseland, New Jersey, EUA) em 450 nm. Os valores foram expressos em pg/mL.

3.5 ESTUDO DA TOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO DA *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

O estudo de toxicidade foi realizado por meio da análise da curva de sobrevivência. Neste estudo, grupos de animais foram tratados com diferentes doses do EBH (grupo 1, N = 10, dose = 250 mg/kg, i.p.; grupo 2, N = 10, dose = 500 mg/kg, i.p.; grupo 3, N = 10, dose = 1000 mg/kg, i.p.) e o número de óbitos foi observado diariamente, durante dez dias. Para a avaliação desse estudo, utilizou-se a análise de Kaplan Meier.

3.6 FÁRMACOS E REAGENTES

Neste estudo, foram utilizados os seguintes reagentes e fármacos: dexametasona (Prodome Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, SP, Brasil), carragenina- λ (grau IV), hidróxido de sódio (NaOH), mieloperoxidase de neutrófilos humanos, indometacina, o-dianisidina 2HCl (3,3'dimetoxibenzidina), azida

sódica, cloreto de vanádio (III) (VCl_3), sulfanilamida ($C_6H_8N_2O_2S$) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), peróxido de hidrogênio (H_2O_2 30 %) (Biotech, São Paulo, SP, Brasil), adenosina ($C_{10}H_{13}N_5O_4$) (Fluka, Ronkonkoma, Nova York, EUA), heparina (Liquemine®, Roche, São Paulo, SP, Brasil), fosfato de sódio ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$), sulfato de zinco ($ZnSO_4$) (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil), fenol (C_6H_5OH), fosfato de hidrogênio dissódico dodecahidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), nitroprussiato ($C_5FeN_5Na_2O \cdot 2H_2O$) (Nuclear, São Paulo, SP, Brasil), sulfato de amônio (NH_3SO_4) (Labsynth, São Paulo, SP, Brasil), HCl, metanol PA, etanol PA, clorofórmio PA, acetato de etila PA, hexano PA, acetona PA, piridina PA (Synth, Diadema, SP, Brasil), líquido de Türk, May-Grünwald (Newprov, Pinhais, PR, Brasil), Giemsa (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil), Azul de Evans ($C_{34}H_{24}N_6O_{14}S_4Na_4$) (Acros-Organics, Geel, Antwerp, Bélgica); Dihidrocloreto de N-(1-naftil)-etilenodiamina ($C_{12}H_{16}Cl_2N_2$) (Merck, Frankfurter, Darmstadt, Alemanha). Neste protocolo foram utilizados ainda, anticorpos específicos e padrões com concentrações conhecidas de citocinas de acordo com as instruções dos fabricantes, TNF- α (Cat. № 559732), IL-1 β (Immuno Biological Laboratories Co. Ltd. Japan - Cat. № 27193). Reagentes em grau de pureza analítica (PA): álcool de cereal (Quimidrol, Joinville, SC, Brasil); hidróxido de amônio, anidrido acético, cloreto de acila, cloreto de *p*-metilbenzoil, cloreto de benzoil, cloreto de *p*-metoxibenzoil e cloreto de *p*-clorobenzoil (Nuclear, Diadema, SP, Brasil). Outros sais e reagentes, de grau de pureza analítica, foram obtidos de diferentes fontes comerciais.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos parâmetros inflamatórios estudados (migração celular, exsudação, MPO, ADA, NO_x , TNF- α e IL-1 β) foram expressos utilizando-se a média \pm erro padrão (e.p.m.) e valores percentuais. O programa estatístico GraphPad Prism® versão 3.00 (San Diego, Califórnia, EUA) foi utilizado para essas análises. As diferenças estatísticas dos parâmetros analisados entre os grupos controle e animais tratados com o EBH, frações, subfrações e compostos isolados foram realizadas por meio do teste paramétrico de Análise de Variância (ANOVA) bicaudal, seguido, quando necessário, do teste *post hoc* de Newman-Keuls

ou do teste t de *Student*. Além disso, no estudo da curva de sobrevida, utilizou-se a análise de Kaplan Meier. Para todas as análises estatísticas, valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA

4.1.1 Eletroforese capilar do EBH, frações e subfrações da *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

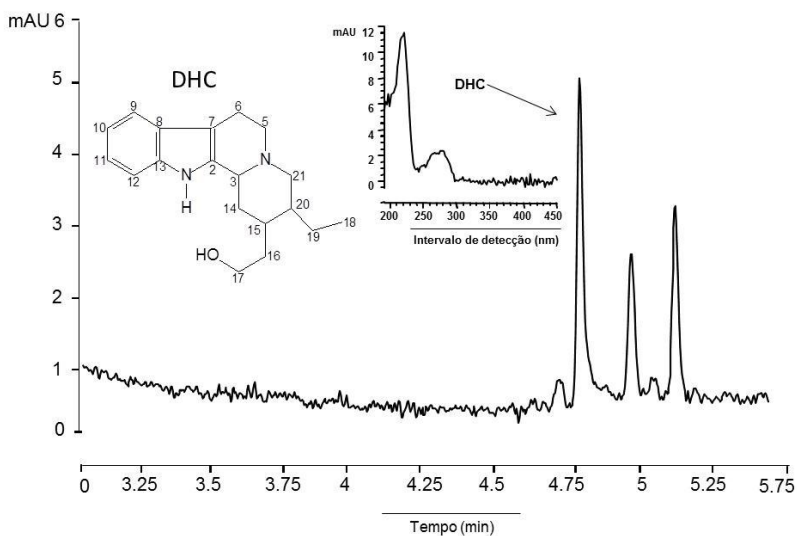
As figuras 6 a 8 descrevem os eletroferogramas do EBH, frações e subfrações, isoladas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl., obtidos por meio da análise de eletroforese capilar. O alcaloide dihidrocorinanteol (DHC) foi identificado nas seguintes proporções: EBH (8,54%) (Figura 6, Tabela 2), fração Hex (0,067%) (Figura 7A, Tabela 2), fração AcOEt (14,11%) (Figura 7B, Tabela 2), fração Aq (1,1%) (Figura 7C, Tabela 2), fração Alc (23,83%) (Figura 8A, Tabela 2), subfração AlcP (20,22%) (Figura 8B, Tabela 2) e subfração AlcAp (26,87%) (Figura 8C, Tabela 2). É importante mencionar que as frações Hex e Aq apresentaram quantidade reduzida de DHC, 0,067% e 1,1%, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 – Concentração do DHC no EBH, frações e subfrações isoladas das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

Extratos	DHC (% m/m)	DPR
Extrato bruto hidroalcoólico	8,54	1,14
Fração n-hexano	0,067	4,7
Fração acetato de etila	14,11	3,17
Fração aquosa	1,1	2,54
Fração alcaloídica	23,83	1,24
Subfração alcaloídica polar	20,22	2,62
Subfração alcaloídica apolar	26,87	1,95

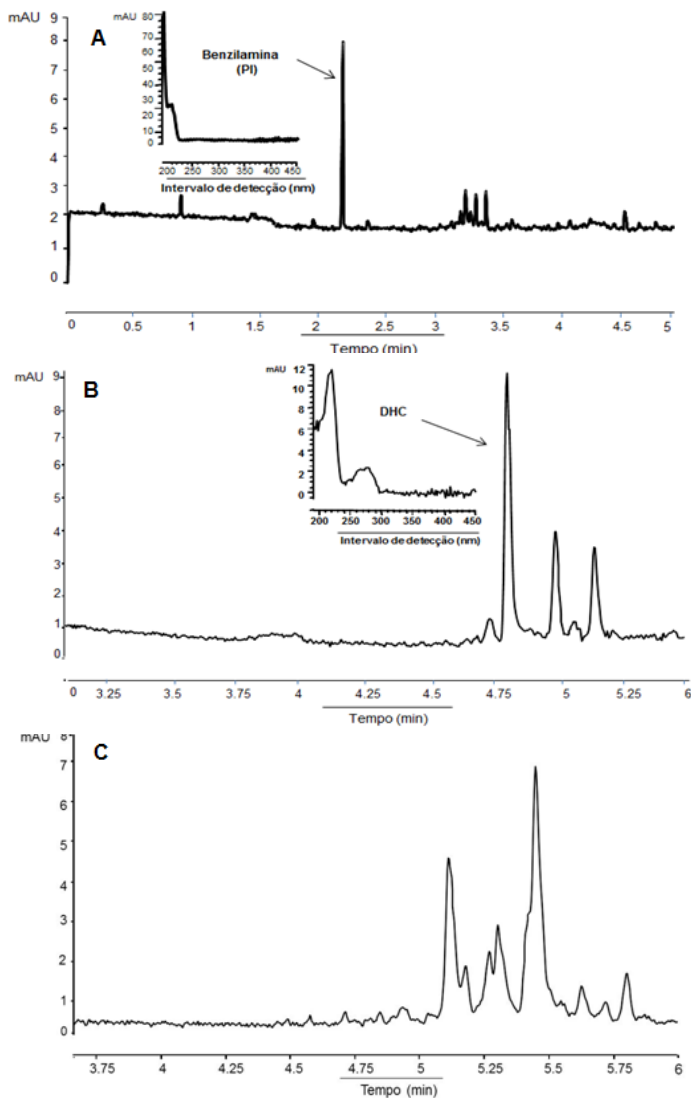
DHC: dihidrocorinanteol, DPR: desvio padrão relativo.

Figura 6 – Eletroferograma para determinação do alcaloide dihidrocorinanteol (DHC) no extrato bruto hidroalcoólico (EBH).



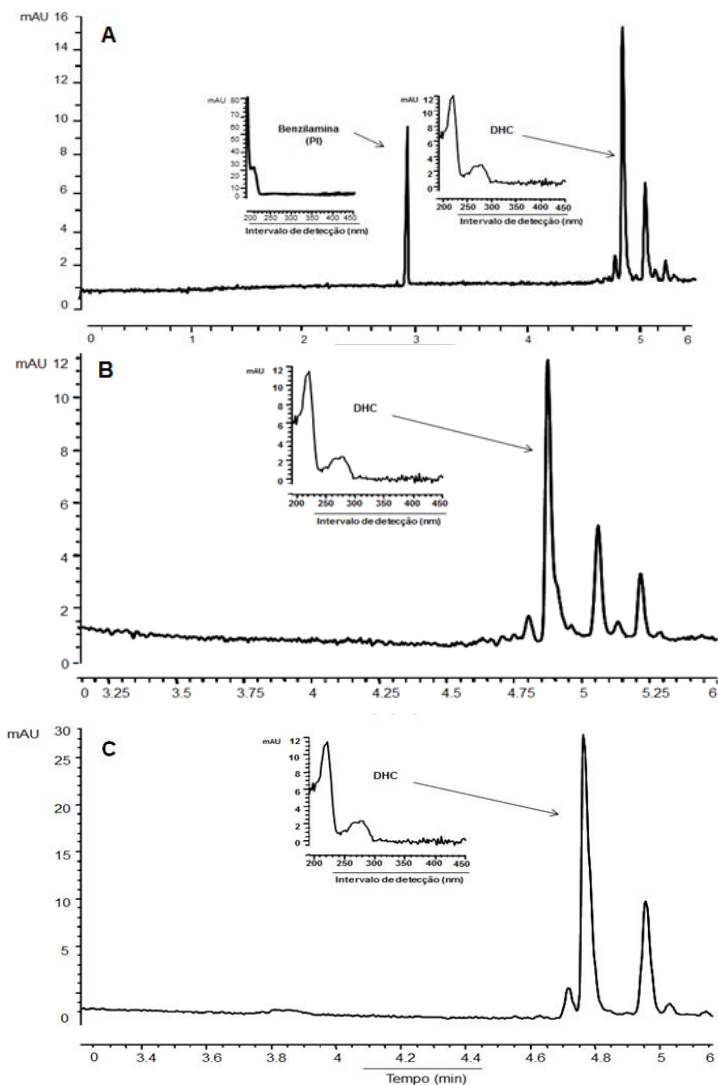
Eletroferograma de 50 mg/L de DHC. Eletrólito de corrida: 40 mM de tris-(hidroximetil) aminometano (TRIS) e 50 mM de ácido 2-hidroxiiisobutírico (HIBA) (pH 4,5). Outras condições: injeção hidrodinâmica: 50 mBar por 3 s; tensão aplicada: 30 kV; temperatura: 25 °C; detecção direta em 215 nm.

Figura 7 – Eletroferograma para determinação do alcaloide dihidrocorinanteol (DHC) nas frações n-hexano (Hex) (A), acetato de etila (AcOEt) (B) e aquosa (Aq) (C).



Eletrólito de corrida: 40 mM de tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS) e 50 mM de ácido 2-hidroxiisobutírico (HIBA) (pH 4,5). Outras condições: injeção hidrodinâmica: 50 mBar por 3 s; tensão aplicada: 30 kV; temperatura: 25 °C; detecção direta em 215 nm. PI: padrão interno.

Figura 8 – Eletroferograma para determinação do alcaloide dihidrocorinanteol (DHC) na fração alcaloídica (Alc) (A), subfração alcaloídica polar (AlcP) (B) e subfração alcaloídica apolar (AlcAp) (C).



Eletrólito de corrida: 40 mM de tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS) e 50 mM de ácido 2-hidroxiisobutírico (HIBA) (pH 4,5). Outras condições: injeção hidrodinâmica: 50 mBar por 3 s; tensão aplicada: 30 kV; temperatura: 25 °C; detecção direta em 215 nm. PI: padrão interno.

4.1.2 Elucidação estrutural do composto

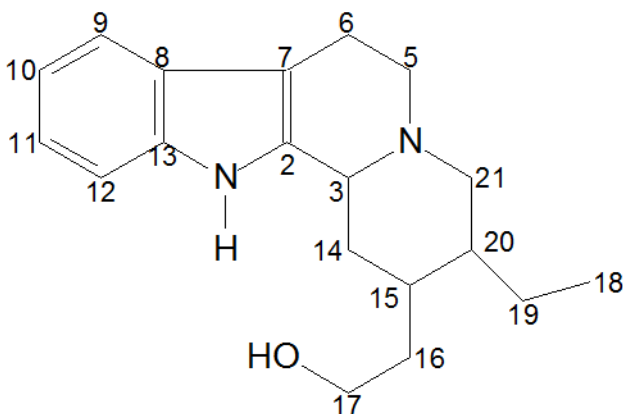
O fracionamento da subfração AlcAp isolada das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. resultou no isolamento do alcaloide indólico dihidrocorinanteol (DHC), o qual ainda não havia sido descrito para essa planta. O composto foi analisado por meio de espectroscopia de infravermelho (IR), que indicou a presença de grupos O-H e N-H pela absorção em 3460 cm^{-1} e 3385 cm^{-1} . Nenhuma banda de carbonila foi observada no espectro de IR, e a espectrometria de massas (ESI-MS $[M+H]^+$) resultou em um pico do íon molecular de $m/z = 299,4$. Na sequência, as técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C foram utilizadas para confirmar a estrutura do alcaloide. Os deslocamentos químicos na RMN de ^1H e ^{13}C indicaram a presença do composto DHC. Esta substância é um sólido amorfo (70 mg), com faixa de fusão entre 173 e $176\text{ }^\circ\text{C}$, com rotação ótica de $[\alpha]^{25}_{\text{D}} = -1,52^\circ$ (c 0,05, CHCl_3) (TAVEIRA et al., 1992).

A partir dos dados de RMN do DHC foi possível propor a elucidação da estrutura de um alcaloide com núcleo indólico. O espectro de RMN de ^{13}C demonstrou a presença de 19 carbonos, apresentando 11 sinais na região de 10 a 65 ppm e 8 sinais de carbonos desblindados. Por meio da análise de RMN de DEPT 135, todos os carbonos protonados foram identificados, destacando-se a presença de um sinal para metila (C18) em $\delta_{\text{C}} 10,96$ ppm. De 7 carbonos metilênicos (CH_2), 2 ligados ao átomo de nitrogênio N4 com $\delta_{\text{C}} 53,04$ (C5) e $60,09$ (C21), e um CH_2 carbinólico (C17) em $\delta_{\text{C}} 60,33$ ppm; 3 sinais de carbonos metínicos (CH) na região de alta frequência com respectivos deslocamentos em $\delta_{\text{C}} 37,21$ (C15), $41,57$ (C20) e $59,82$ ppm (C3); 4 carbonos metínicos (CH) na região de baixa frequência atribuídos aos átomos de carbonos hidrogenados aromáticos e, finalmente a presença de 4 carbonos quaternários na região de $\delta_{\text{C}} 107$ a 137 ppm, que foram atribuídos aos átomos de carbonos do sistema indólico.

O espectro de RMN de ^1H indicou um grupo de sinais característicos do sistema indólico, constituído de um anel aromático orto-substituído com sinais na forma de um par de dupletos centrados em $\delta_{\text{H}} 7,50$ e $7,31$ ppm, com constante de acoplamento $J_{9,12} = 8,00$ Hz atribuídos aos átomos de hidrogênios ligados aos átomos de carbono C9 e C12. Também foram identificados dois duplo dupletos centrados em $\delta_{\text{H}} 7,10$ e

7,14 ppm, atribuídos aos átomos de hidrogênios ligados aos átomos de carbonos C10 e C11. Os deslocamentos químicos dos carbonos: C9, C10, C11 e C12 são δ_C 118,01; 119,15; 121,07 e 110,83 ppm, respectivamente. O deslocamento químico do C12 é justificado pelo efeito mesomérico do nitrogênio N1, tornando esse carbono mais blindado do que o esperado. A estrutura química do DHC está descrita na figura 9.

Figura 9 – Estrutura química do dihidrocorinanteol (DHC).



4.2 EFEITO DA *Esenbeckia leiocarpa* Engl. SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR E A EXSUDAÇÃO

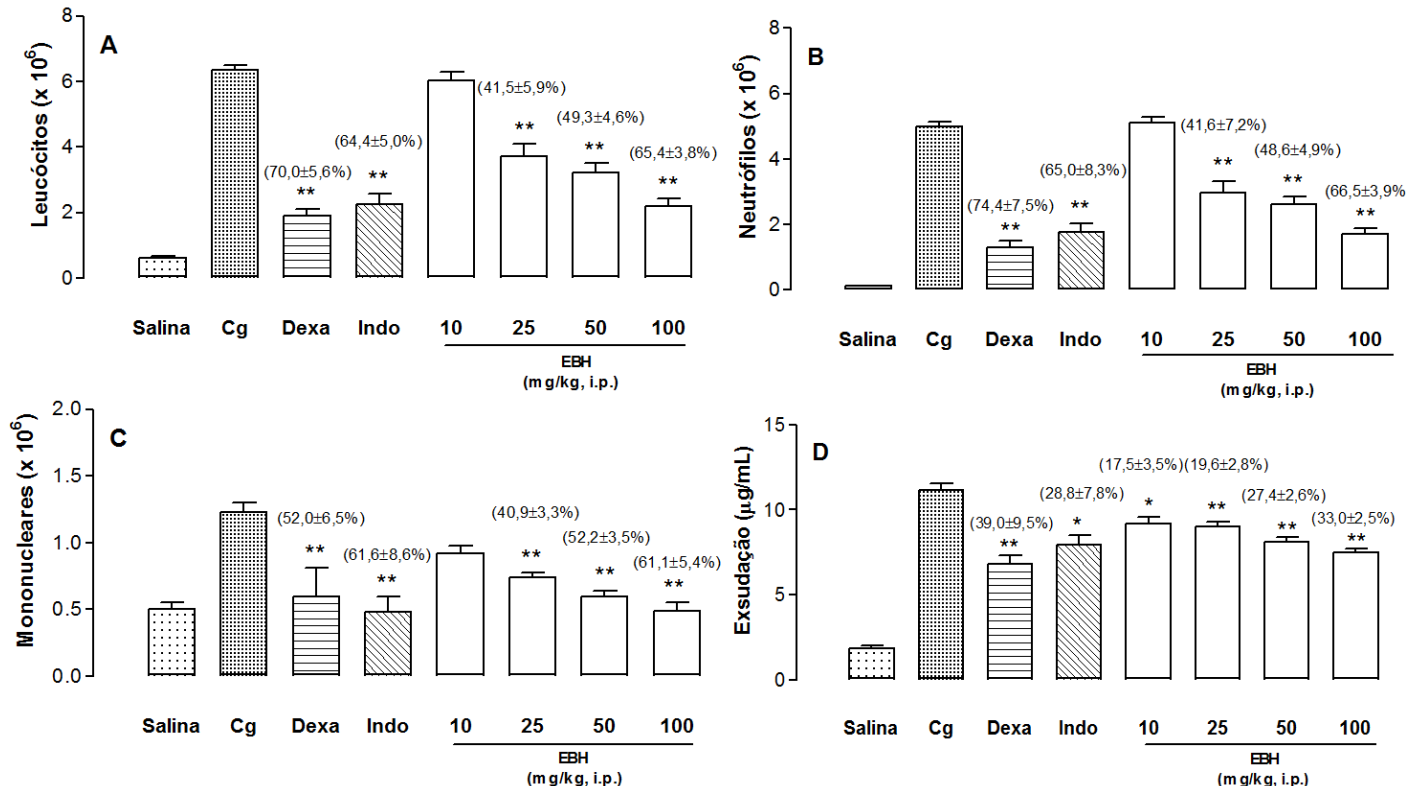
O extrato bruto hidroalcoólico (EBH) obtido das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. reduziu significativamente a migração de leucócitos, neutrófilos e mononucleares nas doses de 25 a 100 mg/kg ($P < 0,01$) (Figuras 10A, 10B e 10C). Além disso, o EBH (10 - 100 mg/kg) inibiu também a exsudação ($P < 0,05$) (Figura 10D).

A fração n-hexano (Hex), nas doses de 25 e 50 mg/kg, também demonstrou importante efeito anti-inflamatório, pois inibiu significativamente a migração leucocitária e os neutrófilos ($P < 0,05$) (Figuras 11A e 11B). A fração Hex também reduziu os mononucleares nas doses de 10 a 50 mg/kg ($P < 0,01$) (Figura

11C). Além disso, a dose de 50 mg/kg desta fração inibiu a exsudação ($P < 0,01$) (Figura 11D).

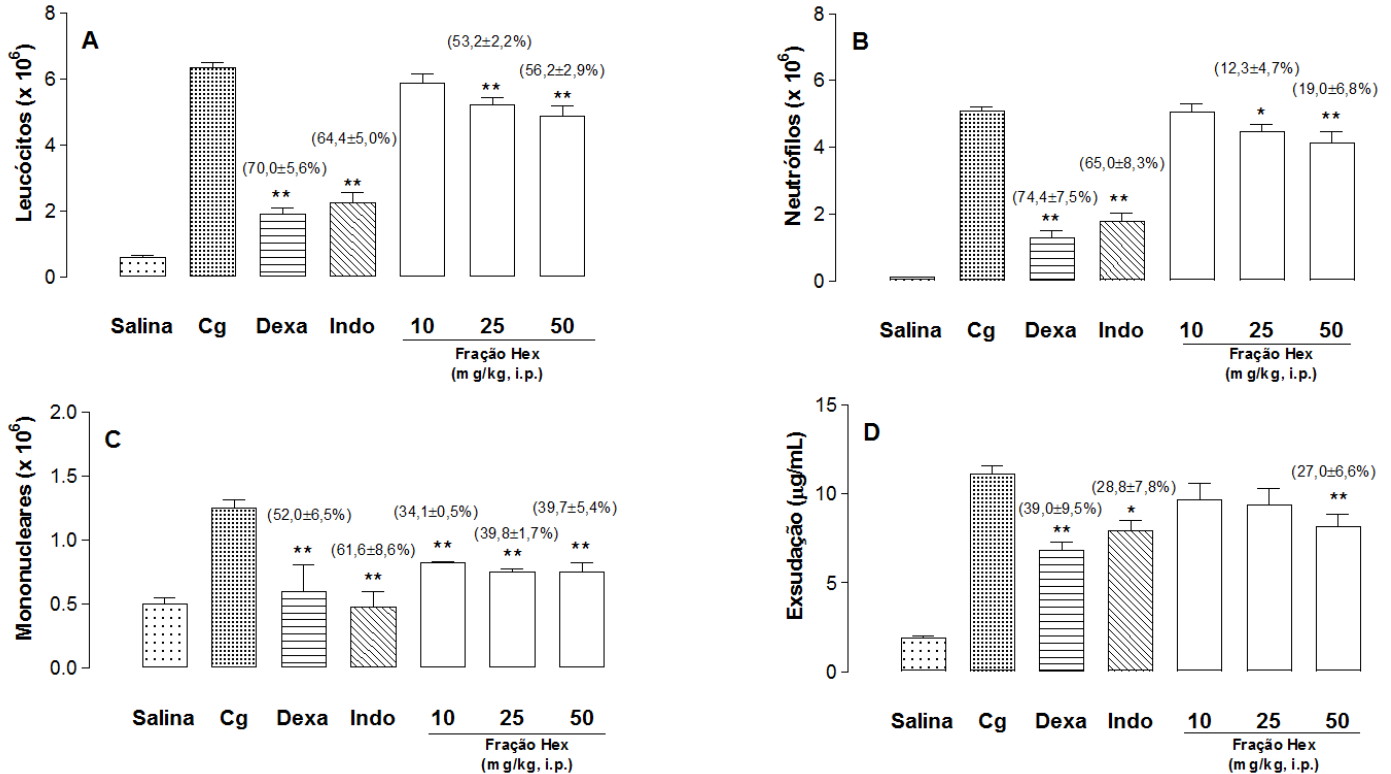
A fração acetato de etila (AcOEt) demonstrou efeito anti-inflamatório similar ao da fração Hex. Nas doses de 25 e 50 mg/kg, inibiu significativamente a migração leucocitária e os neutrófilos ($P < 0,01$) (Figuras 12A e 12B). A fração AcOEt também inibiu a migração de mononucleares nas doses de 10 a 50 mg/kg ($P < 0,05$) (Figura 12C). Além disso, assim como observado para a fração Hex, apenas a dose de 50 mg/kg da fração AcOEt inibiu a exsudação ($P < 0,01$) (Figura 12D).

Figura 10 – Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) (10 - 100 mg/kg) administrado por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleural (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.



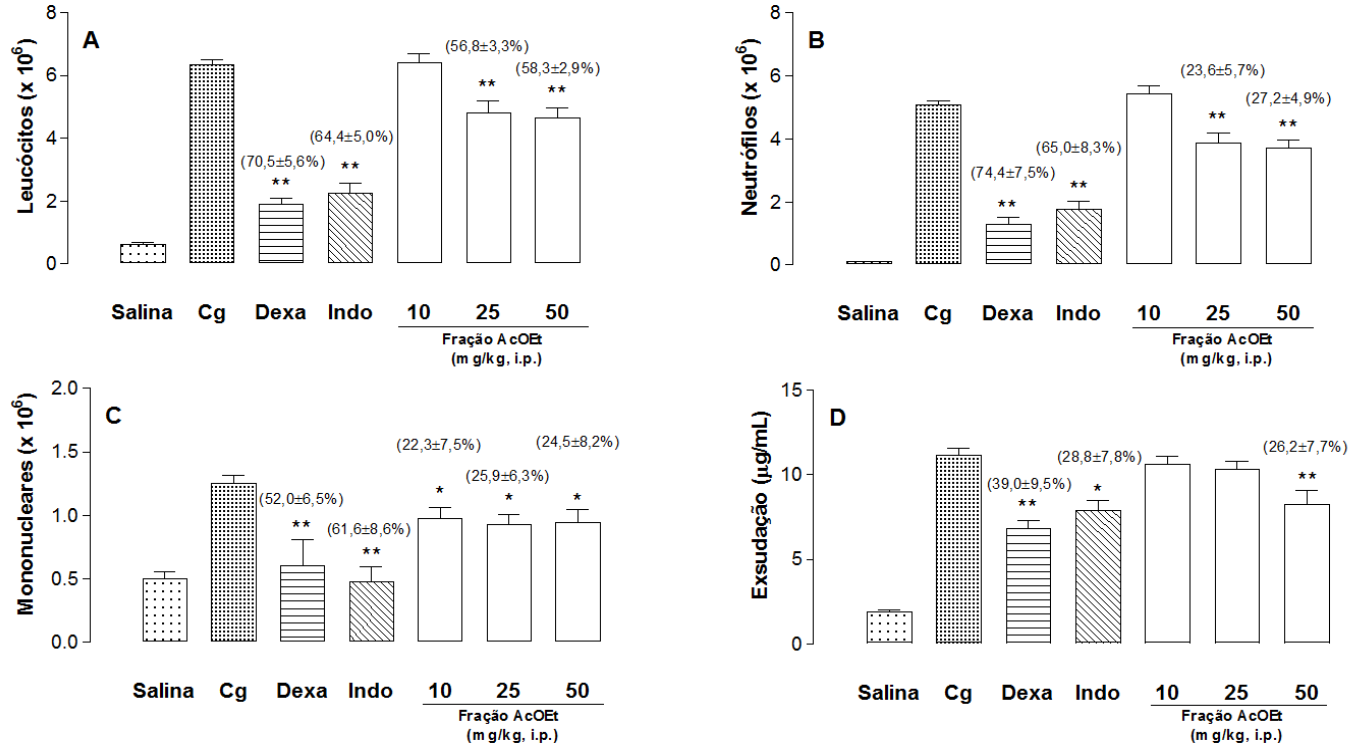
Efeito do EBH sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Salina = grupo controle negativo (animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.p.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados somente com carragenina 1%, i.p.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste t de *Student*). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. * P < 0,05, ** P < 0,01

Figura 11 – Efeito da fração n-hexano (Hex) (10 - 50 mg/kg) administrada por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleurar (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.



Efeito da fração Hex sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Salina = grupo controle negativo (animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados somente com carragenina 1%, i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.), As colunas verticais representam a média ± e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste *t* de Student). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. * P < 0,05, ** P < 0,01.

Figura 12 – Efeito da fração acetato de etila (AcOEt) (10 - 50 mg/kg) administrada por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleuraral (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.



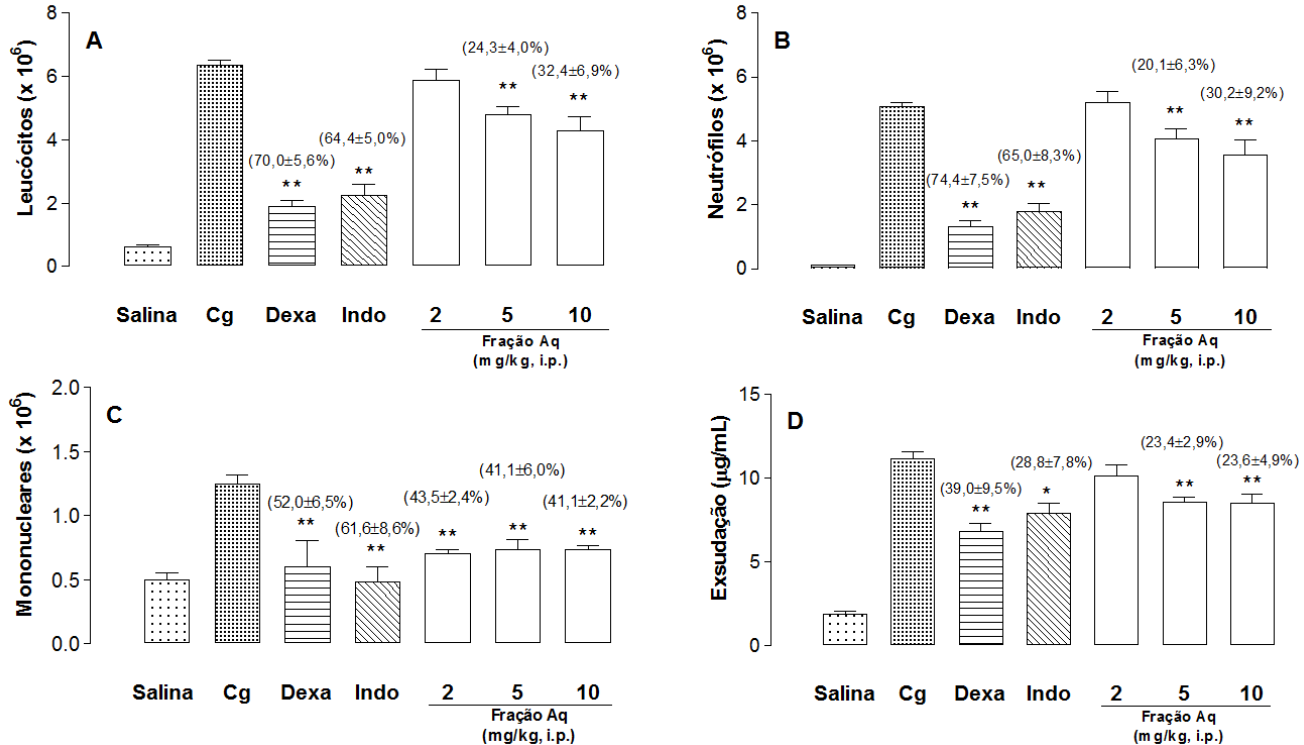
Efeito da fração AcOEt sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Salina = grupo controle negativo (animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.p.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados somente com carragenina 1%, i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.), As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste *t* de Student). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. * P < 0,05, ** P < 0,01.

A fração aquosa (Aq) apresentou melhor efeito anti-inflamatório que as frações Hex e AcOEt. As doses de 5 e 10 mg/kg promoveram inibição significativa de leucócitos e de neutrófilos, bem como da exsudação ($P < 0,01$) (Figuras 13A, 13B e 13D). Ainda, a fração Aq inibiu também o influxo de mononucleares nas doses de 2 a 10 mg/kg ($P < 0,01$) (Figura 13C).

A fração alcaloídica (Alc) demonstrou efeito anti-inflamatório similar aos observados com a fração de Aq. A fração Alc inibiu a migração leucocitária, os neutrófilos e os mononucleares nas doses de 5 e 10 mg/kg ($P < 0,05$) (Figuras 14A, 14B e 14C). Além disso, a dose de 10 mg/kg desta fração também inibiu a exsudação ($P < 0,05$) (Figura 14D).

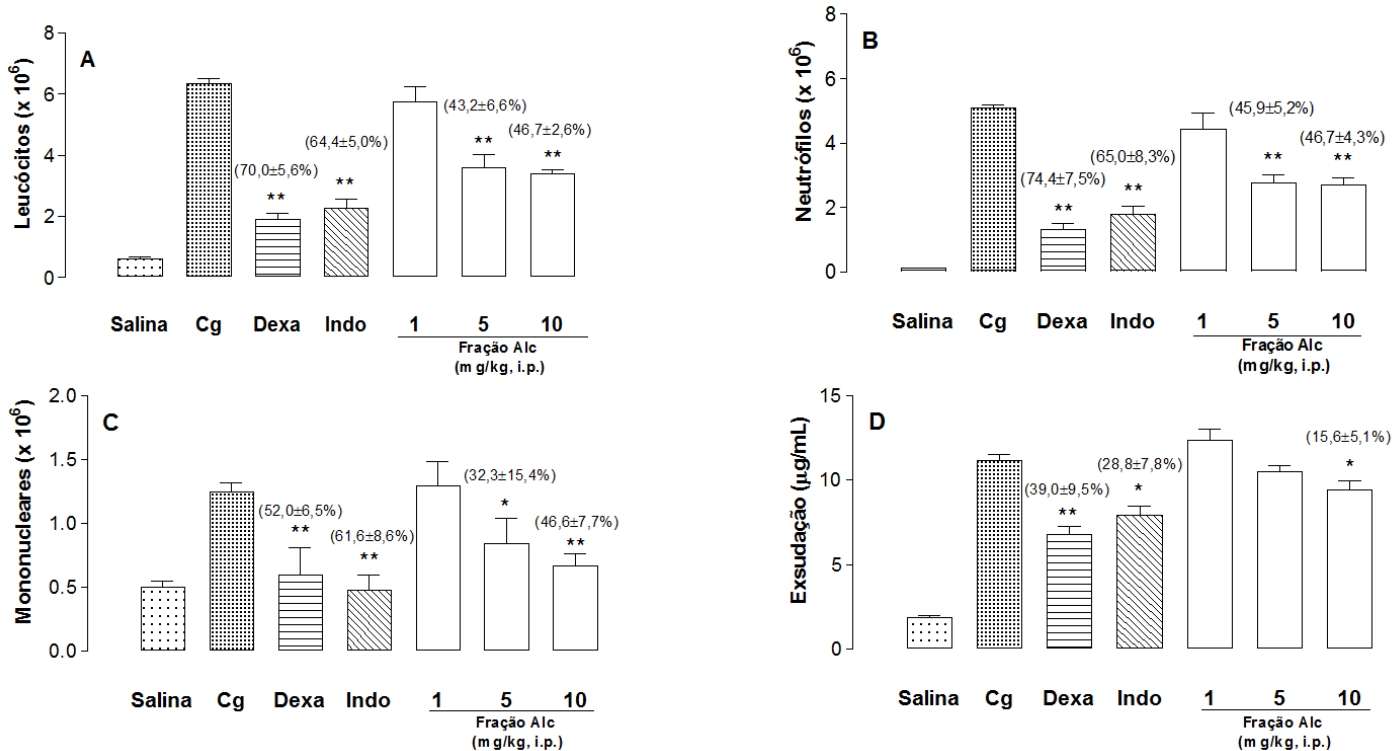
A subfração alcaloídica polar (AlcP), nas doses de 1 a 5 mg/kg, inibiu a migração leucocitária, os neutrófilos, bem como o influxo de mononucleares ($P < 0,05$) (Figuras 15A, 15B e 15C). Além disso, a subfração AlcP também foi capaz de inibir a exsudação nas doses de 0,5 a 5 mg/kg ($P < 0,01$) (Figura 15D).

Figura 13 – Efeito da fração aquosa (Aq) (2 - 10 mg/kg) administrada por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleurial (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.



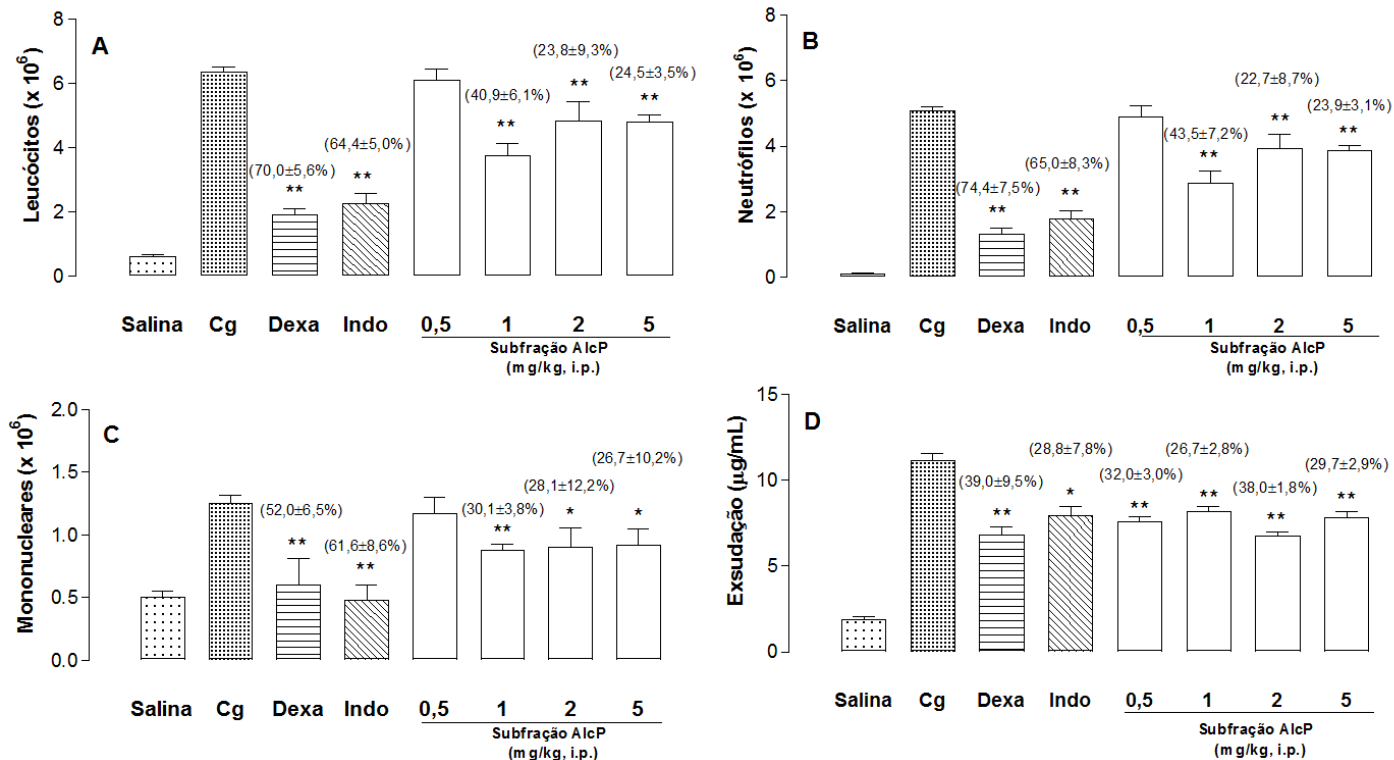
Efeito da fração Aq sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Salina = grupo controle negativo (animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados somente com carragenina 1%, i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste *t* de Student). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. * P < 0,05, ** P < 0,01.

Figura 14 – Efeito da fração alcaloídica (Alc) (1 - 10 mg/kg) administrada por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleurar (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.



Efeito da fração Alc sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Salina = grupo controle negativo (animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.p.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados somente com carragenina 1%, i.p.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste *t* de Student). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. * P < 0,05, ** P < 0,01.

Figura 15 – Efeito da subfração alcaloídica polar (AlcP) (0,5 - 5 mg/kg) administrada por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleurar (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.



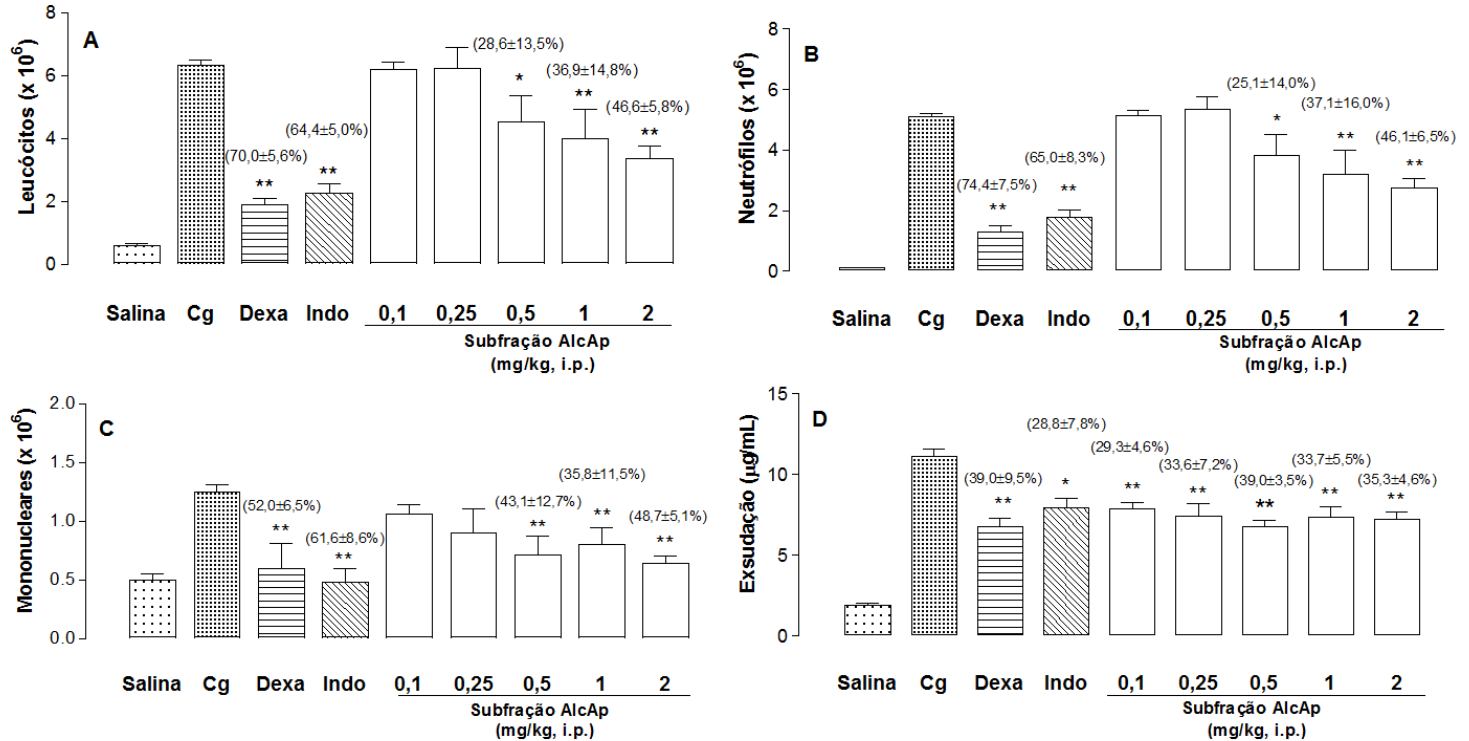
Efeito da subfração AlcP sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Salina = grupo controle negativo (animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.p.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados somente com carragenina 1%, i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste *t* de Student). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. * P < 0,05, ** P < 0,01.

A subfração alcaloídica apolar (AlcAp), nas doses de 0,5 a 2 mg/kg, inibiu significativamente a migração leucocitária, os neutrófilos, bem como o influxo de mononucleares ($P < 0,05$) (Figuras 16A, 16B e 16C). Além disso, a subfração AlcAp (0,1 - 2 mg/kg) também inibiu a exsudação em todas as doses estudadas ($P < 0,01$) (Figura 16D).

O alcaloide dihidrocorinanteol (DHC), nas doses de 0,25 e 0,5 mg/kg, inibiu significativamente a migração leucocitária e os neutrófilos ($P < 0,01$) (Figuras 17A e 17B). O DHC, nas doses de 0,1 a 0,5 mg/kg, também inibiu o influxo de mononucleares e a exsudação ($P < 0,05$) (Figuras 17C e 17D).

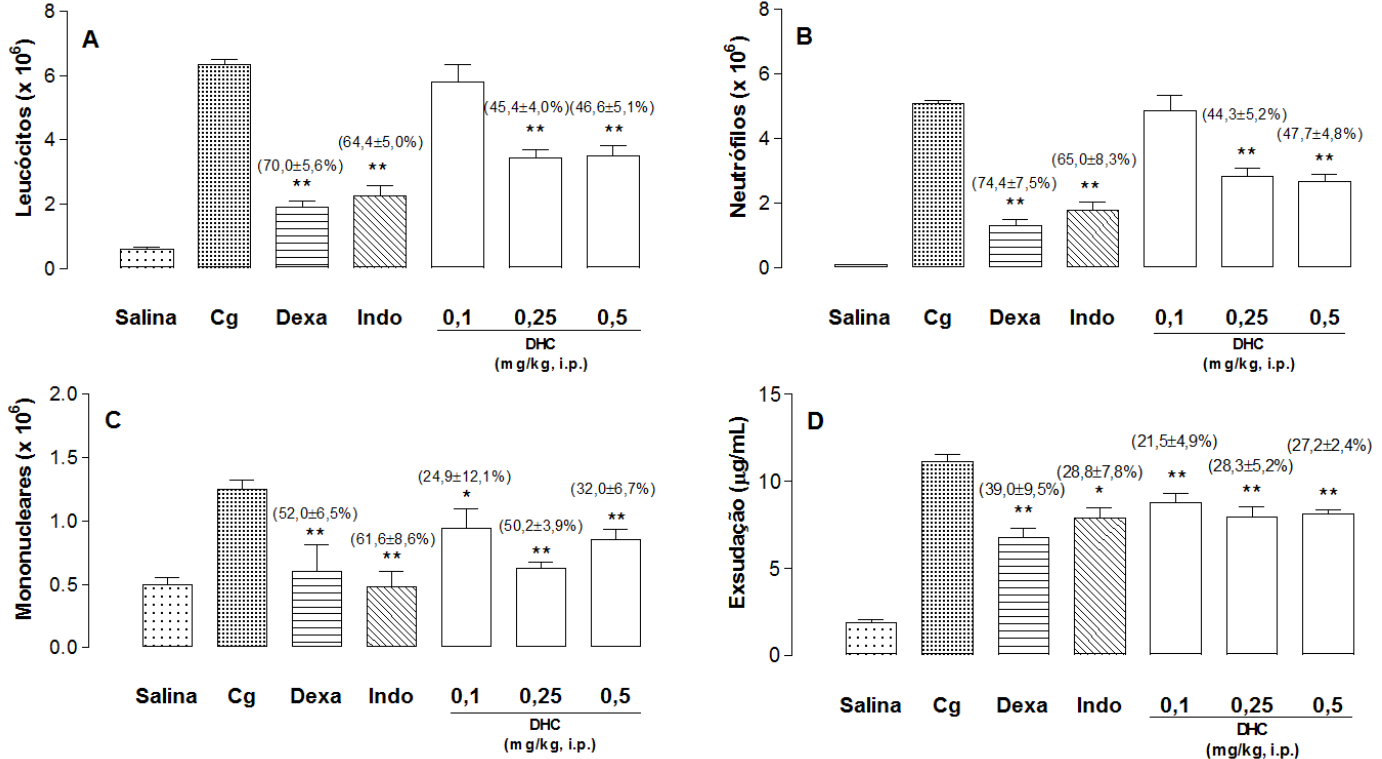
Como esperado, os fármacos de referência, dexametasona (0,5 mg/kg) e indometacina (5,0 mg/kg), inibiram significativamente a migração de leucócitos, os neutrófilos, os mononucleares e a exsudação ($P < 0,05$) (Figuras 10 a 17).

Figura 16 – Efeito da subfração alcaloídica apolar (AlcAp) (0,1 - 2 mg/kg) administrada por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleurar (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.



Efeito da subfração AlcAp sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Salina = grupo controle negativo (animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados somente com carragenina 1%, i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste *t* de Student). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. * P < 0,05, ** P < 0,01.

Figura 17 – Efeito do composto dihidrocorinanteol (DHC) (0,1 - 0,5 mg/kg, i.p.) administrado por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleurar (i.p.) no modelo da pleurisia em camundongos.



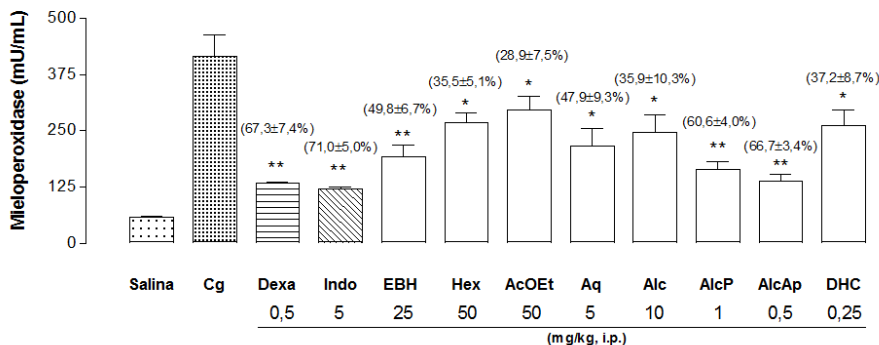
Efeito do DHC sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Salina = grupo controle negativo (animais tratados somente com NaCl 0,95%), i.p., Cg = grupo controle positivo (animais tratados somente com carragenina 1%, i.p.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste *t* de Student). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. * P < 0,05, ** P < 0,01.

O estudo da curva dose-resposta demonstrou que as melhores doses do EBH, frações, subfrações e do dihidrocorinanteol (DHC) que inibiram os parâmetros inflamatórios estudados foram as seguintes: 25 mg/kg para o EBH, 50 mg/kg para a fração Hex, 50 mg/kg para a fração AcOEt, 5 ou 10 mg/kg para a fração Aq, 10 mg/kg para a fração Alc, 1 ou 2 mg/kg para a subfração AlcP, 0,5 mg/kg para a subfração AlcAp e 0,25 mg/kg para o DHC. Além disso, a análise da curva tempo-resposta demonstrou que o EBH foi eficaz de inibir os parâmetros inflamatórios quando administrado no período de 0,5 h antes da carragenina, sendo este resultado utilizado como parâmetro para as frações, subfrações e para o DHC. A seguir, as análises do efeito do EBH, frações, subfrações e DHC sobre MPO, ADA, NO_x, IL-1 β e TNF- α foram realizadas utilizando a melhor dose e o tempo de tratamento prévio de 0,5h.

4.3 EFEITO DA *Esenbeckia leiocarpa* Engl. SOBRE A ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE

O tratamento prévio dos animais com o EBH, frações, subfrações e o DHC resultou em inibição significativa da atividade da MPO ($P < 0,05$) (Figura 18). Os fármacos de referência dexametasona e indometacina também inibiram a atividade desta enzima ($P < 0,01$) (Figura 18).

Figura 18 – Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH: 25 mg/kg), fração n-hexano (Hex: 50 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), fração alcaloídica (Alc: 10 mg/kg), subfração alcaloídica polar (AlcP: 1 mg/kg), subfração alcaloídica apolar (AlcAp: 0,5 mg/kg), dihidrocorinanteol (DHC: 0,25 mg/kg) isolados das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. e administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleural (1%, i.pl.) sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO).

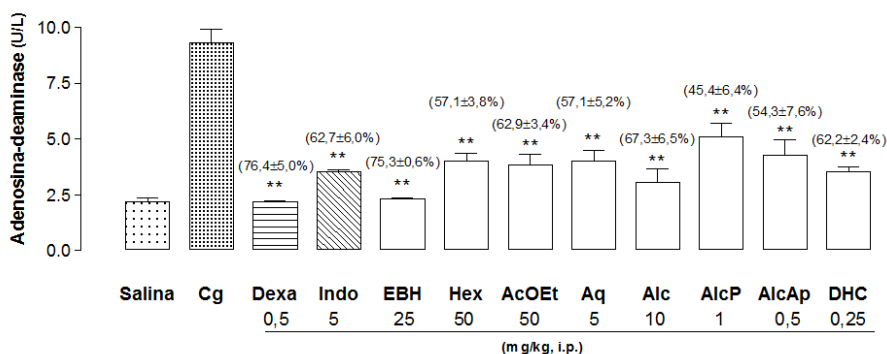


Salina = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina 1%, i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e Teste *t* de *Student*). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. * P < 0,05 e ** P < 0,01.

4.4 EFEITO DA *Esenbeckia leiocarpa* Engl. SOBRE A ATIVIDADE DA ADENOSINA-DEAMINASE

A atividade da ADA também foi inibida pelo EBH, frações, subfrações e pelo alcaloide DHC (P < 0,01) (Figura 19). Tanto a dexametasona quanto a indometacina também inibiram a atividade desta enzima (P < 0,01) (Figura 19).

Figura 19 – Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH: 25 mg/kg), fração n-hexano (Hex: 50 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), fração alcaloídica (Alc: 10 mg/kg), subfração alcaloídica polar (AlcP: 1 mg/kg), subfração alcaloídica apolar (AlcAp: 0,5 mg/kg), dihidrocorinanteol (DHC: 0,25 mg/kg) isolados das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. e administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleural (1%, i.pl.) sobre a atividade da adenosina-deaminase (ADA).

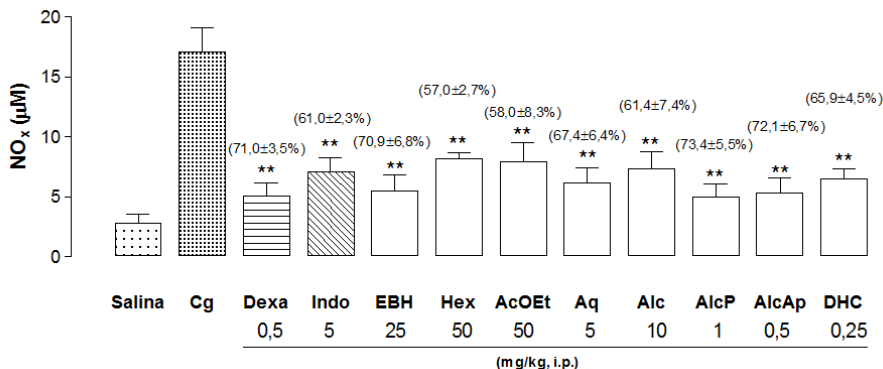


Salina = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina 1%, i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e Teste *t* de Student). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. ** P < 0,01.

4.5 EFEITO DA *Esenbeckia leiocarpa* Engl. SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE NITRITO/NITRATO

O tratamento prévio dos animais com o EBH, frações, subfrações e o alcaloide DHC resultou na diminuição da concentração de nitrito/nitrato (NO_x) (P < 0,01) (Figura 20). Dexametasona e indometacina também reduziram a concentração de NO_x (P < 0,01) (Figura 20).

Figura 20 – Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH: 25 mg/kg), fração n-hexano (Hex: 50 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), fração alcaloídica (Alc: 10 mg/kg), subfração alcaloídica polar (AlcP: 1 mg/kg), subfração alcaloídica apolar (AlcAp: 0,5 mg/kg), dihidrocorinanteol (DHC: 0,25 mg/kg) isolados das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. e administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleural (1%, i.pl.) sobre a concentração de nitrito/nitrato (NO_x).

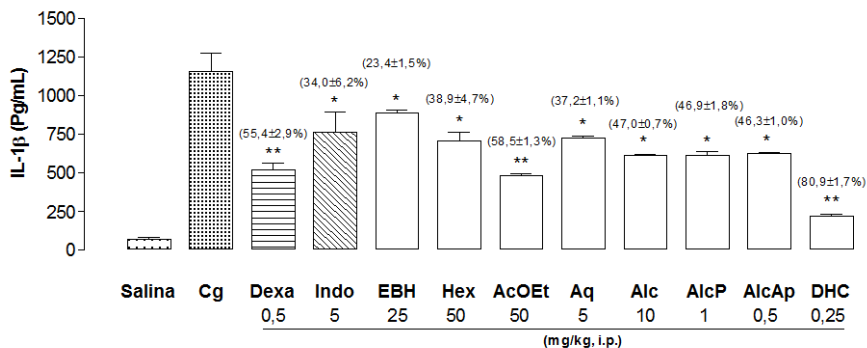


Salina = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo animais tratados apenas com carragenina 1%, i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e Teste *t* de Student). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. ** P < 0,01.

4.6 EFEITO DA *Esenbeckia leiocarpa* Engl. SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE IL-1 β

O EBH, frações, subfrações e o DHC, isolados da *Esenbeckia leiocarpa* Engl., inibiram significativamente IL-1 β (P < 0,05) (Figura 21). Dexametasona e indometacina também diminuíram a concentração dessa citocina pró-inflamatória (P < 0,05) (Figura 21).

Figura 21 – Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH: 25 mg/kg), fração n-hexano (Hex: 50 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg) ou fração alcaloídica (Alc: 10 mg/kg), subfração alcaloídica polar (AlcP: 1 mg/kg), subfração alcaloídica apolar (AlcAp: 0,5 mg/kg), dihidrocorinanteol (DHC: 0,25 mg/kg) isolados das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* e administrada por via intrapleural (1%, i.pl.) sobre as concentrações de interleucina-1 beta (IL-1 β).

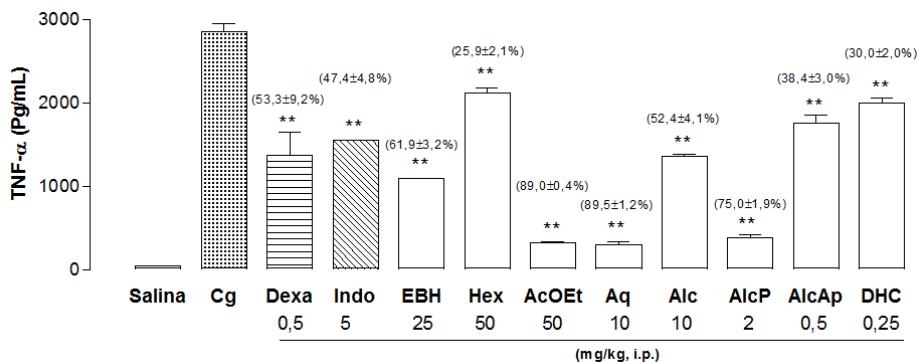


Salina = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,95%, i.p.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina 1%, i.p.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e Teste *t* de *Student*). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. ** P < 0,01.

4.7 EFEITO DA *Esenbeckia leiocarpa* Engl. SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE TNF- α

Esenbeckia leiocarpa Engl. também diminuiu a concentração de TNF- α (P < 0,01) (Figura 22). Para a determinação da atividade das enzimas MPO e ADA, bem como das concentrações de NO $_x$ e IL-1 β foram utilizadas doses de 5 mg/kg para fração Aq e de 1 mg/kg para subfração AlcP. Entretanto, doses maiores da fração Aq (10 mg/kg) e da subfração AlcP (2 mg/kg) foram necessárias para a inibição do TNF- α (P < 0,01) (Figura 22). Dexametasona e indometacina também diminuíram a concentração dessa citocina (P < 0,01) (Figura 22).

Figura 22 – Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH: 25 mg/kg), fração n-hexano (Hex: 50 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 10 mg/kg) ou fração alcaloídica (Alc: 10 mg/kg), subfração alcaloídica polar (AlcP: 2 mg/kg), subfração alcaloídica apolar (AlcAp: 0,5 mg/kg), dihidrocorinanteol (DHC: 0,25 mg/kg) isolados das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* e administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina administrada por via intrapleural (1%, i.pl.) sobre as concentrações de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).

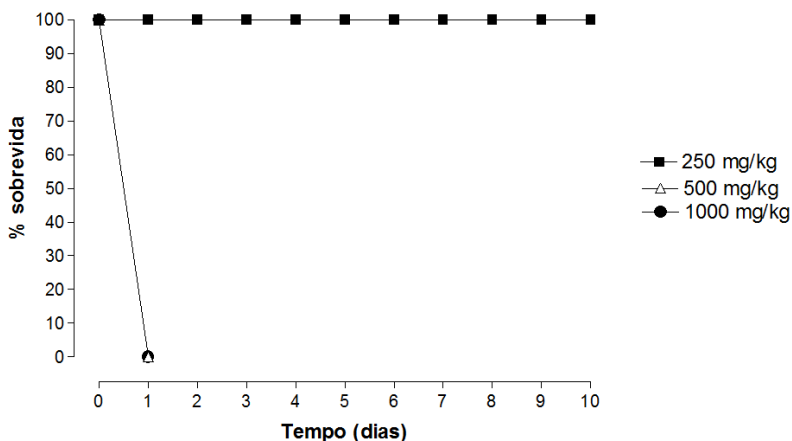


Salina = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina 1%, i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e Teste *t* de Student). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. ** P < 0,01.

4.8 ESTUDO DA TOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO DA *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

Neste protocolo experimental, a dose de 250 mg/kg demonstrou-se segura, pois resultou em 100% de sobrevivência dos animais após 10 dias de observação (Figura 23). Entretanto, nas doses de 500 e 1000 mg/kg, todos os animais morreram no primeiro dia de observação (Figura 23).

Figura 23 – Curva de sobrevida realizada após a administração do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. nas doses de 250, 500 e 1000 mg/kg, i.p, utilizando-se a análise de Kaplan Meier.



4.9 EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DAS MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DO ALCALOIDE DIHIDROCORINANTEOL (DHC) ISOLADO DA *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

A inserção dos substituintes acetil, *p*-metilbenzoil, benzoil, *p*-metoxibenzoil e *p*-clorobenzoil na hidroxila do alcaloide DHC originou os compostos DHC-acetil, DHC-*p*-metil, DHC-benzoil, DHC-*p*-metoxi e DHC-*p*-cloro, respectivamente. Estes compostos inibiram significativamente os leucócitos e neutrófilos, quando administrados pela via intraperitoneal, em doses que variaram de 0,1 a 1 mg/kg ($P < 0,05$) (Tabela 3). Nenhum dos compostos acima citados foi capaz de inibir a exsudação nas doses estudadas ($P > 0,05$) (Tabela 3).

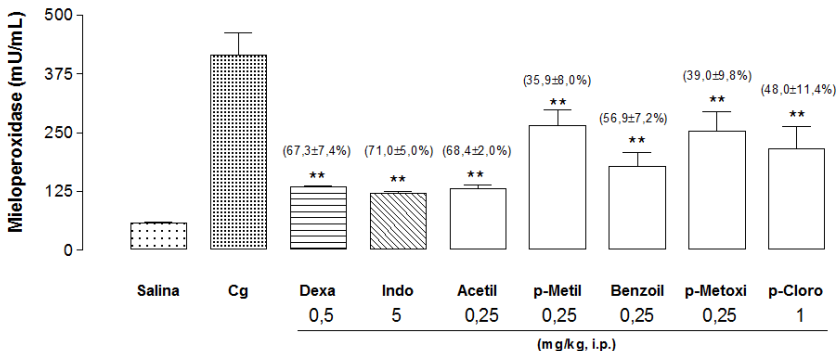
Tabela 3 – Efeito anti-inflamatório dos análogos do DHC: acetil, *p*-metil, benzoil, *p*-metoxi e *p*-cloro sobre a migração leucocitária e exsudação, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.

Composto	Dose (mg/kg)	Leucócitos (x10 ⁶) (% de inibição)	Neutrófilos (x10 ⁶) (% de inibição)	Exsudação (µg/mL) (% de inibição)
Salina	0,95% ^a	0,6 ± 0,06	0,11 ± 0,01	1,9 ± 0,2
Cg	1% ^a	6,3 ± 0,16	5,09 ± 0,11	11,1 ± 0,4
Dexa	0,5 ^b	1,9 ± 0,2 (70,0 ± 5,6)**	1,3 ± 0,2 (74,4 ± 7,5)**	6,8 ± 0,5 (39,0 ± 9,5)**
Indo	5 ^b	2,3 ± 0,3 (64,4 ± 5,0)**	1,8 ± 0,25 (65,0 ± 8,3)**	7,9 ± 0,6 (28,8 ± 7,8)*
DHC	0,1 ^b	5,8 ± 0,5	4,9 ± 0,5	8,8 ± 0,5 (21,5 ± 4,9)**
	0,25 ^b	3,4 ± 0,2 (45,4 ± 4,0)**	2,8 ± 0,3 (44,3 ± 5,2)**	8,0 ± 0,6 (28,3 ± 5,2)**
	0,5 ^b	3,5 ± 0,3 (44,6 ± 5,1)**	2,7 ± 0,2 (47,7 ± 4,8)**	8,1 ± 0,3 (27,2 ± 2,4)**
DHC-acetil	0,05 ^b	6,0 ± 0,4	5,1 ± 0,3	12,8 ± 0,7
	0,1 ^b	5,4 ± 0,2 (14,5 ± 3,9)**	4,7 ± 0,2	11,6 ± 0,8
	0,25 ^b	4,8 ± 0,4 (23,6 ± 5,6)**	4,3 ± 0,3 (15,5 ± 6,6)*	10,9 ± 0,7
	0,5 ^b	4,7 ± 0,5 (24,6 ± 7,3)**	4,2 ± 0,4 (18,2 ± 7,7)*	11,7 ± 0,7
DHC- <i>p</i> -metil	0,1 ^b	6,0 ± 0,2	4,8 ± 0,2	11,3 ± 0,2
	0,25	4,9 ± 0,3 (23,3 ± 4,0)**	3,8 ± 0,2 (24,8 ± 4,7)**	10,6 ± 0,4
	0,5 ^b	5,3 ± 0,4 (16,9 ± 6,8)*	4,2 ± 0,4 (17,4 ± 8,6)**	9,9 ± 0,5
	1,0 ^b	4,7 ± 0,6 (25,9 ± 9,5)**	3,5 ± 0,4 (30,5 ± 8,2)**	9,9 ± 0,5
DHC-benzoil	0,1 ^b	6,1 ± 0,4	5,4 ± 0,5	12,4 ± 0,8
	0,25 ^b	4,9 ± 0,2 (22,7 ± 3,3)**	4,3 ± 0,3 (15,1 ± 5,4)*	11,1 ± 1,4
	0,5 ^b	4,8 ± 0,7 (23,8 ± 6,5)**	4,0 ± 0,7 (21,1 ± 13,7)*	10,2 ± 1,2
DHC- <i>p</i> -metoxi	0,1 ^b	6,1 ± 0,2	4,9 ± 0,2	11,3 ± 0,3
	0,25 ^b	5,4 ± 0,5 (14,5 ± 7,3)*	4,3 ± 0,4 (14,3 ± 8,0)*	12,0 ± 1,1
	0,5 ^b	4,8 ± 0,2 (25,1 ± 3,9)**	3,6 ± 0,2 (30,9 ± 3,5)**	10,7 ± 0,4
	1,0 ^b	3,7 ± 0,5 (42,0 ± 8,0)**	3,0 ± 0,4 (41,5 ± 8,6)**	10,5 ± 1,0
DHC- <i>p</i> -cloro	0,25 ^b	5,8 ± 0,3	5,0 ± 0,3	12,9 ± 0,8
	0,5 ^b	5,5 ± 0,5	4,8 ± 0,5	12,3 ± 0,3
	1,0 ^b	4,9 ± 0,5 (21,8 ± 8,7)*	4,2 ± 0,4 (16,4 ± 7,9)*	12,8 ± 0,3

Salina = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,95%), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina 1%), DHC = Dihidrocorinanteol; Dexa = dexametasona, Indo = indometacina, a = administrado pela via intrapleural, b = administrado pela via intraperitoneal, * P < 0,05 e ** P < 0,01; N = 5 animais.

O tratamento prévio dos animais com os análogos do DHC resultou em inibição significativa da atividade da enzima MPO ($P < 0,01$) (Figura 24). Os fármacos de referência dexametasona e indometacina também inibiram a atividade desta enzima ($P < 0,01$) (Figura 24).

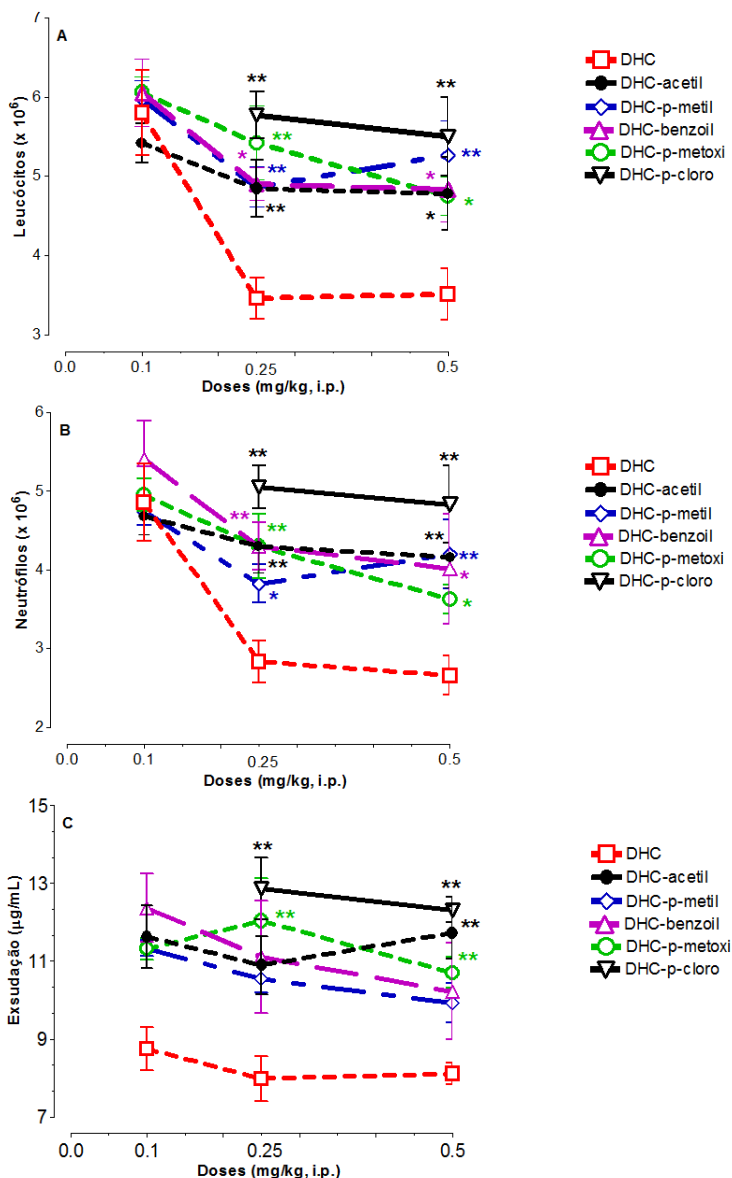
Figura 24 – Efeito do DHC-acetil (0,25 mg/kg), DHC-*p*-metil (0,25 mg/kg), DHC-benzoil (0,25 mg/kg), DHC-*p*-metoxi (0,25 mg/kg) e DHC-*p*-cloro (1 mg/kg) administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina, administrada por via intrapleural (1%, i.pl.), sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO).



Salina = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina 1%, i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e Teste *t* de Student). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. ** $P < 0,01$.

A figura 25 demonstra a comparação entre o alcaloide DHC e seus análogos sobre a migração leucocitária, de neutrófilos e exsudação nas doses de 0,1 mg/kg, 0,25 mg/kg e 0,5 mg/kg. Neste estudo, observou-se que o DHC foi mais eficaz em inibir a inflamação quando comparado com os análogos acetil, *p*-metil, benzoil, *p*-metoxi e *p*-cloro ($P < 0,01$). De forma geral, não foram observadas diferenças estatísticas significativas ao comparar os mesmos parâmetros inflamatórios entre os análogos acetil, *p*-metil, benzoil, *p*-metoxi e *p*-cloro ($P > 0,05$). Entretanto, observou-se que o *p*-metil, na dose de 0,25 mg/kg, foi mais efetivo em inibir neutrófilos do que o *p*-cloro ($P < 0,05$).

Figura 25 – Efeito do dihidrocorinanteol (DHC) e seus análogos acetil, *p*-metil, benzoil, *p*-metoxi e *p*-cloro, administrados por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina por via intrapleuraral (1%, i.pl.), no modelo da pleurisia em camundongos, sobre leucócitos (A), neutrófilos (B) e exsudação (C).



As linhas representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas de cada análogo em relação ao DHC (Newman-Keuls e teste *t* de Student), * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, $N = 5$ animais.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliado o efeito anti-inflamatório do extrato bruto hidroalcoólico (EBH), das frações n-hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt), aquosa (Aq) e alcaloídica (Alc), subfrações alcaloídicas polar (AlcP) e apolar (AlcAp) e do alcaloide indólico dihidrocorinanteol (DHC), obtidos das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl., utilizando-se o modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. Neste estudo, também foram comparadas as atividades anti-inflamatórias sobre os parâmetros leucócitos e exsudação do alcaloide DHC e de cinco compostos análogos: DHC-acetil, DHC-*p*-metil, DHC-benzoil, DHC-*p*-metoxi e DHC-*p*-cloro, utilizando-se o mesmo protocolo experimental.

Inicialmente, avaliou-se se *Esenbeckia leiocarpa* Engl poderia ser tóxica para os animais, e para tanto, o efeito do EBH foi avaliado na sobrevida dos mesmos. Os resultados demonstraram que a planta parece ser segura somente na dose de 250 mg/kg, uma vez todos os animais sobreviveram dez dias após a administração sistêmica do EBH. É importante destacar que a dose considerada segura pelo estudo da curva de sobrevida (250 mg/kg) foi 10 vezes superior a melhor dose (25 mg/kg) resultante do estudo da curva de dose-resposta para o EBH.

Os resultados deste estudo evidenciaram ainda, que a *Esenbeckia leiocarpa* Engl. demonstrou efeito anti-inflamatório por meio da inibição da migração leucocitária e da exsudação, bem como inibição de enzimas e/ou mediadores pró-inflamatórios, tais como MPO, ADA, NO_x, IL-1β e TNF-α.

Em relação à migração leucocitária e à exsudação, observou-se que o extrato bruto hidroalcoólico da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. e suas frações foram efetivos em inibir estes parâmetros inflamatórios, destacando-se que a inibição de leucócitos ocorreu principalmente à custa de neutrófilos.

Ao comparar as frações isoladas da planta, observou-se que a fração Aq e a Alc apresentaram os melhores efeitos anti-inflamatórios, uma vez que doses menores das mesmas (5 mg/kg para a fração Aq e 10 mg/kg para a Alc) foram capazes de inibir a migração leucocitária e a exsudação quando comparadas a dose superior (50 mg/kg) das frações Hex e AcOEt.

De forma geral, o EBH e as frações obtidos da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. demonstraram efeito similar aos fármacos de referência utilizados neste estudo, dexametasona e indometacina, em relação a inibição da migração leucocitária e exsudação.

As enzimas mieloperoxidase e adenosina-deaminase são importantes, principalmente, como marcadores da ativação de neutrófilos e de mononucleares, respectivamente (FAITH et al., 2008; KRENKE; KORCZYNSKI, 2010). Neste contexto, o efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. foi avaliado sobre a atividade das enzimas MPO e ADA a fim de se entender o mecanismo de ação na modulação da ativação e quimiotaxia dos leucócitos. De acordo com os resultados deste estudo, observou-se que a *Esenbeckia leiocarpa* Engl. inibiu a atividade de ambas as enzimas. Estes resultados revelaram ainda, que a planta inibiu tanto a migração de leucócitos quanto a ativação destas células no sítio do processo inflamatório (FRÖDE; MEDEIROS, 2001).

Entre as frações estudadas, a fração Aq e a Alc demonstraram melhor resultado de efeito anti-inflamatório em relação à inibição da atividade da MPO e da ADA, uma vez que foram capazes de inibir a atividade destas enzimas quando administrados em doses inferiores (5 mg/kg para Aq ou 10 mg/kg para Alc) quando comparadas com as frações Hex e AcOEt que inibiram este parâmetro somente na dose de 50 mg/kg.

Em relação aos fármacos de referência, observou-se que o EBH e as frações isoladas exibiram padrão anti-inflamatório similar ao da dexametasona e da indometacina sobre a inibição da atividade da MPO e da ADA.

Além de inibir a atividade das enzimas MPO e ADA, o extrato bruto hidroalcoólico da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. e suas frações também reduziram as concentrações de nitrito/nitrato (NO_x) no lavado da cavidade pleural. O óxido nítrico (NO) é um importante mediador pró-inflamatório liberado durante a resposta inflamatória aguda ou crônica e está relacionado com a exsudação e a quimiotaxia celular (TRIPATHI et al., 2007). Neste sentido, Elazar e colaboradores (2010) demonstraram que a liberação de NO está diretamente relacionada ao aumento do influxo de neutrófilos, no modelo de mastite induzido por infecção com *Escherichia coli*, em camundongos. Além disso, Sakaguchi e colaboradores (2006) também evidenciaram relação entre a redução da concentração de NO_x e da exsudação após a

administração do inibidor da NOS, L-NAME, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em ratos. As frações Aq e Alc foram mais potentes em inibir NO_x , uma vez que doses inferiores (5 mg/kg para fração Aq e 10 mg/kg para a fração Alc) destas frações inibiram este mediador pró-inflamatório quando comparadas com as frações Hex e AcOEt as quais foram efetivas na inibição do NO_x somente em doses superiores (50 mg/kg).

Assim como observado nos outros parâmetros inflamatórios, evidenciou-se também que o EBH e suas frações demonstraram padrão anti-inflamatório similar aos fármacos de referência utilizados sobre a redução da concentração de NO_x .

Além dos mediadores pró-inflamatórios citados anteriormente, as concentrações das citocinas IL-1 β e TNF- α também foram determinadas no lavado da cavidade pleural. Estudos demonstraram a participação das citocinas IL-1 β e TNF- α no processo inflamatório. Neste sentido, Mazon e colaboradores (2008) relacionaram a diminuição da concentração TNF- α com a inibição de leucócitos, exsudação, redução de NO, IL-1 β , expressão da iNOS, P-selectina e molécula de adesão intercelular (ICAM-1), no pulmão de camundongos *knockout* para o receptor de TNF- α , TNF-R1, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina. De acordo com os resultados obtidos, a *Esenbeckia leiocarpa* Engl. reduziu as concentrações de IL-1 β e TNF- α , sendo que, entre as frações estudadas, a Aq e a Alc demonstraram os melhores efeitos na inibição de IL-1 β e do TNF- α , pois doses menores das mesmas (Aq: 5 mg/kg ou 10 mg/kg; Alc: 10 mg/kg) foram capazes de reduzir as concentrações destas citocinas quando comparadas com outras frações (Hex e AcOEt) as quais inibiram esses mesmos parâmetros inflamatórios na dose de 50 mg/kg.

O extrato bruto hidroalcoólico e as frações demonstraram ser capazes ainda de reduzir as concentrações de IL-1 β e TNF- α de forma similar à dexametasona e à indometacina.

A fração Aq foi mais potente em inibir os parâmetros inflamatórios estudados do que as outras frações. Este fato pode ser devido à presença do alcaloide glicosilado desoxicordifolina na fração Aq, o qual foi isolado e identificado, porém não teve sua atividade anti-inflamatória avaliada até o momento. Entretanto, como a fração Alc apresentou maior concentração de alcaloides do que a fração Aq, essa fração foi selecionada para o

isolamento de duas subfrações, uma polar (AlcP) e outra apolar (AlcAp), que foram submetidas à análise dos mesmos parâmetros inflamatórios. Neste sentido, evidenciou-se que a subfração AlcAp demonstrou melhor efeito na inibição da migração leucocitária, exsudação, MPO, ADA, NO_x, IL-1β e TNF-α, quando comparada com a subfração AlcP, uma vez que a dose de 0,5 mg/kg da subfração AlcAp foi capaz de inibir a inflamação, enquanto a subfração AlcP necessitou de doses superiores (1 ou 2 mg/kg) para se obter o mesmo efeito anti-inflamatório.

De forma geral, observou-se que as subfrações promoveram efeito anti-inflamatório similar aos fármacos anti-inflamatórios de referência utilizados sobre os parâmetros inflamatórios estudados.

Em relação à atividade das enzimas e às concentrações de NO_x e citocinas, observou-se que a subfração AlcP (1 mg/kg) foi 5 vezes mais potente do que a indometacina (5 mg/kg) em inibir MPO, NO_x e IL-1β. Ainda, a subfração AlcP (2 mg/kg) foi 2,5 vezes mais potente do que a indometacina (5 mg/kg) em reduzir a concentração do TNF-α. Da mesma forma, a subfração AlcAp (0,5 mg/kg) foi tão potente quanto a dexametasona (0,5 mg/kg) e 10 vezes mais potente do que a indometacina (5 mg/kg) em inibir MPO, NO_x, IL-β e TNF-α.

Após o estudo do efeito anti-inflamatório do material vegetal, a próxima etapa foi verificar o efeito de compostos isolados sobre os mesmos parâmetros inflamatórios.

De acordo com alguns estudos, plantas do gênero *Esenbeckia* apresentam grande concentração de alcaloides na sua constituição (DREYER, 1980; DELLE MONACHE et al., 1989; NAKATSU et al., 1990; OLIVEIRA et al., 1996). Corroborando com estes estudos, a presença de alcaloides foi confirmada no EBH, frações e subfrações obtidos da *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

Na sequência, o alcaloide indólico dihidrocorinanteol (DHC) foi isolado e identificado como composto majoritário da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. Como as frações (Alc) e subfrações (AlcP e AlcAp) que apresentaram grande concentração deste alcaloide demonstraram potente atividade anti-inflamatória, a próxima etapa deste estudo foi analisar o efeito do composto isolado sobre os parâmetros inflamatórios: migração leucocitária e exsudação. De acordo com os resultados, o DHC apresentou

efeito anti-inflamatório importante sobre leucócitos e a exsudação, pois inibiu estes parâmetros inflamatórios na dose de 0,25 mg/kg.

De forma geral, o efeito do DHC sobre a inibição da migração leucocitária e a exsudação foi similar ao observado com os fármacos de referência. Entretanto, é importante destacar que o DHC (0,1 mg/kg ou 0,25 mg/kg) foi 2 e 50 vezes mais potente do que a dexametasona (0,5 mg/kg) e a indometacina (5 mg/kg), respectivamente, em inibir a exsudação.

Além da migração leucocitária e da exsudação, o efeito do DHC também foi avaliado sobre a atividade das enzimas MPO e ADA. Desta forma, observou-se que o DHC inibiu a atividade dessas enzimas na dose de 0,25 mg/kg. O DHC foi 2 e 20 vezes mais potente do que a dexametasona (0,5 mg/kg) e a indometacina (5 mg/kg), respectivamente, em inibir MPO, ADA, NO_x, IL-1 β e TNF- α .

É importante ressaltar que o DHC possui estrutura química similar a da indometacina, uma vez que ambos possuem um anel indólico na sua estrutura. Desta forma, sugere-se que o DHC, possivelmente, exerça mecanismo de ação anti-inflamatória semelhante ao da indometacina.

Os resultados do presente estudo estão de acordo com a pesquisa realizada por Olajide, Ajayi e Wright (2009), na qual demonstraram efeito anti-inflamatório do alcaloide indólico criptolepina, classe a qual pertence o DHC isolado neste estudo, por meio da inibição do edema de pata induzido pela carragenina em ratos. Além disso, Adams e colaboradores (2004) também evidenciaram que alcaloides da classe das quinolonas, a qual também foi identificada na *Esenbeckia leiocarpa* Engl. por Nakatsu e colaboradores (1990), possuem atividade anti-inflamatória *in vitro*, pois inibiram a síntese de leucotrienos em neutrófilos humanos estimulados por ionóforo de cálcio A23187.

Na literatura há apenas um estudo sobre a atividade anti-inflamatória da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. Neste estudo, o alcaloide DHC e o β -sitosterol foram isolados das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (LIZ et al., 2011). Estes autores também observaram que o DHC inibiu a migração leucocitária, a exsudação, a atividade das enzimas MPO e ADA, e as concentrações de nitrito/nitrato e das citocinas IL-1 β e TNF- α , utilizando-se o modelo de inflamação induzida pela carragenina, na bolsa de ar, em camundongos. Além disso, o β -sitosterol

também inibiu os mesmos parâmetros inflamatórios avaliados no presente estudo.

Uma vez que o composto isolado DHC demonstrou ser eficiente como agente anti-inflamatório, realizaram-se modificações na sua estrutura química com objetivo de verificar se estas modificações estruturais poderiam alterar seu efeito anti-inflamatório. Cinco compostos análogos ao DHC foram obtidos: DHC-acetil (composto 1), DHC-*p*-metil (composto 2), DHC-benzoil (composto 3), DHC-*p*-metoxi (composto 4) e DHC-*p*-cloro (composto 5), os quais foram analisados sobre a migração leucocitária, exsudação e atividade da MPO.

Com base nos resultados deste estudo, observou-se que o DHC foi significativamente mais efetivo do que seus análogos DHC-acetil, DHC-*p*-metil, DHC-benzoil, DHC-*p*-metoxi e DHC-*p*-cloro em inibir a inflamação pela via intraperitoneal. Ressaltando que o DHC-acetil foi mais potente na inibição de leucócitos do que o DHC e os outros análogos. Além disso, observou-se também que o DHC-*p*-cloro inibiu estes parâmetros somente na dose de 1 mg/kg, que foi 4 vezes superior a dose efetiva para o DHC e outros análogos. É importante destacar ainda, que somente o DHC inibiu a exsudação nas doses estudadas, enquanto seus análogos não foram efetivos em inibir este parâmetro inflamatório.

De forma geral, os resultados do estudo do efeito anti-inflamatório dos análogos do DHC demonstram a importância do grupo hidroxila como sítio doador e/ou aceptor de ligações hidrogênio (H) no carbono 17 do DHC, visto que a substituição do grupo hidroxila pelos substituintes acetil, *p*-metil, benzoil, *p*-metoxi ou *p*-clorobenzoil diminuiu a atividade anti-inflamatória do composto. Além disso, o átomo de cloro (DHC-*p*-cloro), devido a sua grande eletronegatividade, atrai os elétrons para si e, desta forma, o oxigênio torna-se menos apto a aceitar ligações de hidrogênio, o que pode reduzir a atividade anti-inflamatória do DHC (THOMAS, 2003). Desta forma, os efeitos eletrônicos promovidos pela inserção do cloro na molécula modificam a sua distribuição eletrônica, o que pode influenciar diretamente na ligação do composto aos alvos biológicos. Este fato foi verificado por meio da diminuição do efeito anti-inflamatório do DHC-*p*-cloro quando comparado com o DHC, DHC-acetil, DHC-*p*-metil, DHC-benzoil e DHC-*p*-metoxi. Além disso, é possível que alterações físico-químicas no DHC, tais como tamanho, hidrofobicidade,

forma da molécula (efeito estérico) e eletronegatividade modifiquem o efeito anti-inflamatório do alcaloide DHC.

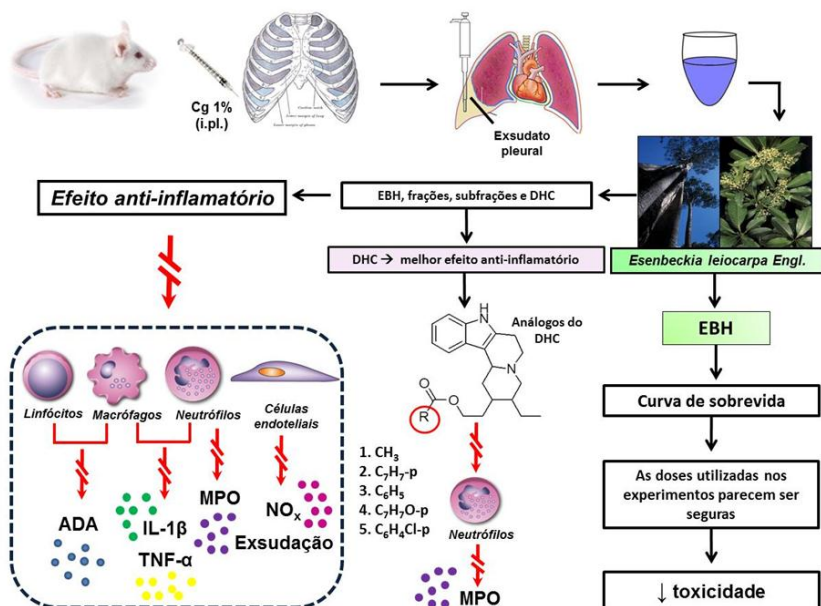
Assim como o DHC, seus análogos também inibiram a atividade da enzima mieloperoxidase. Desta forma, é possível que os compostos: DHC-acetil, DHC-*p*-metil, DHC-benzoil, DHC-*p*-metoxi e DHC-*p*-cloro sejam capazes de inibir tanto a migração de leucócitos quanto a ativação destas células no sítio inflamatório (FRÖDE; MEDEIROS, 2001).

Neste estudo, comparou-se também o efeito anti-inflamatório do DHC e de seus análogos com dois fármacos anti-inflamatórios de referência: dexametasona e indometacina. De acordo com os resultados, tanto o DHC quanto os seus análogos DHC-acetil, DHC-*p*-metil, DHC-benzoil, DHC-*p*-metoxi e DHC-*p*-cloro demonstram efeito anti-inflamatório similar à dexametasona e à indometacina em relação à inibição de leucócitos.

6 CONCLUSÕES

- I. O efeito anti-inflamatório da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. parece estar relacionado principalmente à inibição do influxo de leucócitos, bem como à diminuição da exsudação;
- II. A inibição dos leucócitos e da exsudação parece estar relacionada à inibição de enzimas (MPO e ADA) e de mediadores pró-inflamatórios (NO_x, IL-1β e TNF-α);
- III. O alcaloide DHC parece ser, em parte, responsável pelo efeito anti-inflamatório apresentado pela *Esenbeckia leiocarpa* Engl.;
- IV. As doses de extrato bruto hidroalcoólico utilizadas nos experimentos parecem ser seguras nos estudos *in vivo*.
- V. O DHC foi mais efetivo do que os seus análogos DHC-acetil, DHC-*p*-metil, DHC-benzoil, DHC-*p*-metoxi e DHC-*p*-cloro na inibição da resposta inflamatória, e as alterações físico-químicas ocorridas no DHC após a inserção dos substituintes acetil, *p*-metilbenzoil, benzoil, *p*-metoxibenzoil e *p*-clorobenzoil na hidroxila do carbono 17, determinam a efetividade do efeito anti-inflamatório.

Figura 26 – Resumo do efeito anti-inflamatório da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.



ADA = adenosina-deaminase, Cg = carragenina, DHC = dihidrocorinanteol, EBH = extrato bruto hidroalcoólico, IL-1 β = interleucina-1 beta, MPO = mieloperoxidase, NO $_x$ = metabólitos do óxido nítrico, TNF- α = fator de necrose tumoral alfa, seta contínua (\longrightarrow) = sequência, seta interrompida (\longrightarrow) = inibição

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMID, M.F. et al. Serum levels of interleukin-8, tumor necrosis factor- α and γ -interferon in Egyptian psoriatic patients and correlation with disease severity. *The Journal of Dermatology*, v. 38 n. 5, p. 442 - 446, 2011.
- ABRAMSON, S.B. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, v. 10, n. 2, p. 1 - 7, 2008.
- ADAMS, M. et al. Inhibition of leukotriene biosynthesis by quinolone alkaloids from the fruits of *Evodia rutaecarpa*. *Planta Medica*, v. 70, n. 10, p. 904 - 908, 2004.
- AGRICULTURA ORGÂNICA. Disponível em: agriculturaorganica.xpg.com.br/fotos%20Esenbeckia_leiocarpa.gif. Acesso em: 02 de novembro de 2012.
- AGUILAR-GUADARRAMA, A.B, RIOS, M.Y. Geranyl N-dimethylallylanthranilate, a new compound from *Esenbeckia yaaxhokob*. *Planta Medica*, v. 70, n. 1, p. 85 - 86, 2004.
- ANVARI, F. et al. Tissue-derived proinflammatory effect of adenosine A_{2B} receptor in lung ischemia–reperfusion injury. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, v. 140, n. 4, p. 871 - 877, 2010.
- ARNHOLD, J.; FLEMMIG, J. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 500, n. 1, p. 92 - 106, 2010.
- AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M.H.; GEISSMANN, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, v. 27, p. 669 - 692, 2009.
- BADIU, D.C. et al. Proinflammatory cytokines in peritonitis. *Journal of Medicine and Life*, v. 4, n. 2, p. 158 - 162, 2011.

- BAN, H.S. et al. Inhibitory effects of furanocoumarins isolated from the roots of *Angelica dahurica* on prostaglandin E2 production. *Planta Medica*, v. 69, n. 5, p. 408 - 412, 2003.
- BARNES, P.J. Inhaled Corticosteroids. *Pharmaceuticals*, v. 3, p. 514 - 540, 2010.
- BOLDIZSAR, F. et al. Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. *Immunobiology*, v. 215, n. 7, p. 521 - 526, 2010.
- BOTSARIS, A.S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v. 3, p. 1 - 8, 2007.
- BOUGUEN, G.; CHEVAUX, J.B.; PEYRIN-BIROULET, L. Recent advances in cytokines: therapeutic implications for inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*, v. 17, n. 5, p. 547 - 556, 2011.
- BRADLEY, J.R. TNF-mediated inflammatory disease. *Journal of Pathology*, v. 214, n. 2, p. 149 - 160, 2008.
- BRITO, F.D. Pleurisy and pouch models of acute inflammation. In: Liss, A.A.R. (Ed.), *Pharmacological methods in the control of inflammation*. Rhone Poulenc, Dagenham, p. 173 - 228, 1989.
- BROWN, R.A.; SPINA, D.; PAGE, C.P. Adenosine receptors and asthma. *British Journal of Pharmacology*, v. 153, n. 1, p. 446 - 456, 2008.
- BROWN, R.M., SHORT, J.L. Adenosine A (2A) receptors and their role in drug addiction. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 60, n. 11, p. 1409 - 1430, 2008.
- CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, n. 1-2, p. 131 - 134, 2005.

CANTAERT, T. et al. Type I IFN and TNF- α cross-regulation in immune-mediated inflammatory disease: basic concepts and clinical relevance. *Arthritis Research & Therapy*, v. 12, n. 5, p. 219 - 229, 2010.

CARVALHO, L.H. et al. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied in vivo in *Plasmodium berghei*-infected mice and in vitro against *Plasmodium falciparum* in culture. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 24, n. 11, p. 1113 - 1123, 1991.

CHAVAN, V., PATIL, N., KARNIK, N.D. Study of leukocyte hydrolytic enzymes in patients with acute stage of coronary heart disease. *Indian Journal of Medical Sciences*, v. 61, p. 73 - 82, 2007.

CHEN, Y.F. et al. Anti-Inflammatory and analgesic activities from roots of *Angelica pubescens*. *Planta Medica*, v. 61, n. 1, p. 2 - 8, 1995.

CHI, X.Y. et al. Effect of glucocorticoid in mice of asthma induced by ovalbumin sensitisation and RSV infection. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, v. 29, n. 2, p. 176-180, 2011.

COMMINS, S.P.; BORISH, L.; STEINKE, J.W. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 125, n. 2, p. 53 - 72, 2010.

COSTANTINI, S. et al. Cytokine DB: a database collecting biological information. *Bioinformatics*, v. 4, n. 3, p. 92 - 93, 2009.

DALDEGAN, M.B.; TEIXEIRA, M.M.; TALVANI, A. Concentration of CCL11, CXCL8, and TNF- α in sputum and plasma of patients undergoing asthma or chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 38, n. 9, p. 1359 - 1365, 2005.

DALE, D.C.; BOXER, L.; LILES, W.C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*, v. 112, n. 4, p. 935 - 945, 2008.

DANNHARDT, G.; KIEFER, W. Cyclooxygenase inhibitors – current status and future prospects. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 36, n. 2, p. 109 - 126, 2001.

DELLE MONACHE, F. et al. Isopentenylindole derivatives and other components of *Esenbeckia leiocarpa*. *Gazzetta Chimica Italiana*, v. 119, p. 435 - 439, 1989.

DELLE MONACHE, F. et al. *Esenbeckia leiocarpa*: IIa. Further components. *Gazzetta Chimica Italiana*, v. 120, p. 378 - 389, 1990.

DESROSIERS, M.D. et al. Adenosine deamination sustains dendritic cell activation in inflammation. *Journal of Immunology*, v. 179, n. 3, p. 1884 - 1892, 2007.

DINARELLO, C.A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology*, v. 27, p. 519 - 550, 2009.

DOLABELA, M.F. et al. *Esenbeckia febrifuga*, a plant traditionally used to treat malaria in the Brazilian Amazon. *Phytomedicine*, v. 15, n. 5, p. 367 - 372, 2008.

DONG, L. et al. Different doses of lipopolysaccharides regulate the lung inflammation of asthmatic mice via TLR4 pathway in alveolar macrophages. *The Journal of Asthma*, v. 46, n. 3, p. 229 - 233, 2009.

DREYER, D.L. Alkaloids, limonoids and furocoumarins from three Mexican *Esenbeckia* species *Phytochemistry*, v. 19, n. 5, p. 941 - 944, 1980.

DREYER, D.L. et al. Distribution of limonoids in the Rutaceae. *Phytochemistry*, v. 11, n. 2, p. 705 - 713, 1972.

DULEK, D.E.; PEEBLES, R.S. Jr. Viruses and asthma. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1810, n. 11, p. 1080-1090, 2011.

EKMEKCI, O.B. et al. Iron, nitric oxide, and myeloperoxidase in asthmatic patients. *Biochemistry (Moscow)*, v. 69, n. 4, p. 462 - 467, 2004.

ELAZAR, S. et al. Essential role of neutrophils but not mammary alveolar macrophages in a murine model of acute *Escherichia coli* mastitis. *Veterinary Research*, v. 41, p. 53, 2010.

FAITH, M. et al. How reliable an indicator of inflammation is myeloperoxidase activity? *Clinica Chimica Acta*, v. 396, n. 1-2, p. 23 - 25, 2008.

FLAMMER, J.R.; ROGATSKY, I. Minireview: Glucocorticoids in autoimmunity: unexpected targets and mechanisms. *Molecular Endocrinology*, v. 25, n. 7, p. 1075 - 1086, 2011.

FREDHOLM, B.B. et al. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological Reviews*, 53, n. 4, p. 527-552, 2001.

FREDHOLM, B.B. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors - an update. *Pharmacological Reviews*, v. 63, n. 1, p. 1 - 34, 2011.

FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators of Inflammation*, v. 10, n. 4, p. 223 - 227, 2001.

FUKUNAGA, J. et al. Comparative study to elucidate the mechanism underlying the difference in airway hyperresponsiveness between two mouse strains. *International of Immunopharmacology*, v. 7, n. 14, p. 1852 - 1861, 2007.

GABAY, C. et al. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 6, n. 4, p. 232 - 241, 2010.

GAZONI, L.M. et al. Activation of A₁, A_{2A}, or A₃ adenosine receptors attenuates lung ischemia-reperfusion injury. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, v. 140, n. 2, p. 440 - 446, 2010.

GIUSTI, G.; GALANTI, B. Adenosine deaminase: colourimetric method. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, 1984, p. 315 - 323.

GOODARZI, M.T. et al. Adenosine deaminase activity in COPD patients and healthy subjects. *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology*, v. 9, n. 1, p. 7 - 12, 2010.

GOSSLAU, A. et al. The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 55, n. 1, p. 74 - 82, 2011.

GREEN, I.C. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v. 126, p. 131 - 138, 1982.

HASKÓ, G. et al. A_{2B} adenosine receptors in immunity and inflammation. *Trends in Immunology*, v. 30, n. 6, p. 263 - 270, 2009.

HASKÓ, G. et al. Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 113, p. 264 - 275, 2007.

HASTIE, A.T. et al. Analyses of asthma severity phenotypes and inflammatory proteins in subjects stratified by sputum granulocytes. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 125, n. 5, p. 1028 - 1036, 2010.

HOFFMANN, N. et al. Novel mouse model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection mimicking cystic fibrosis. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 4, p. 2504 - 2514, 2005.

HOFFMAN, H.M. Therapy of autoinflammatory syndromes. *Clinical reviews in allergy and immunology*, v. 124, n. 6, p. 1129 - 1138, 2009.

HUSSEIN, M.R. et al. Alterations of the CD4(+), CD8 (+) T cell subsets, interleukins-1beta, IL-10, IL-17, tumor necrosis factor-alpha and soluble intercellular adhesion molecule-1 in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: preliminary observations. *Pathology Oncology Research*, v. 14, n. 3, p. 321 - 328, 2008.

IMPELLIZZERI, D. et al. CGS 21680, an agonist of the adenosine (A_{2A}) receptor, decreases acute lung inflammation. *European Journal of Pharmacology*, v. 668, n. 1-2, p. 305 - 316, 2011.

JANUÁRIO, A.H. Alcaloides β -indolopiridoquinazolínicos de *Esenbeckia grandiflora* Mart. (Rutaceae). *Química Nova*, v. 32, n. 8, p. 2034 - 2038, 2009.

KIM, M. et al. Kidney-specific reconstitution of the A₁ adenosine receptor in A₁ adenosine receptor knockout mice reduces renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney International*, v. 75, n. 8, p. 809 - 823, 2009.

KLOEPFER, K.M.; GERN, J.E. Virus/allergen interactions and exacerbations of asthma. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, v. 30, n. 4, p. 553 - 563, 2010.

KRENKE, R.; KORCZYNSK, P. Use of pleural fluid levels of adenosine deaminase and interferon gamma in the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, v. 16, n. 4, p. 367 - 375, 2010.

KUBO, I. Recent applications of counter-current chromatography to the isolation of bioactive natural products. *Journal of Chromatography*, v. 538, p. 187 - 191, 1991.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *European Journal of Pharmacology*, v. 616, n. 1 - 3, p. 7 - 15, 2009.

LEE, K.H. Discovery and development of natural product-derived chemotherapeutic agents based on a medicinal chemistry approach. *Journal of Natural Products*, v. 73, n. 3, p. 500 - 516, 2010.

LEWKOWICH, I.P.; WILLS-KARP, M. Animal models of allergen-induced asthma. In: Middleton's allergy: principles and practice. 7. ed. London: Elsevier, p. 437 - 450, 2008.

LIZ, R. et al. Protected effect of *Esenbeckia leiocarpa* upon the inflammatory response induced by carrageenan in a murine air pouch model. *International Immunopharmacology*, v. 11, n. 12, p. 1991 - 1999, 2011.

MALLE, E. et al. Myeloperoxidase: a target for new drug development? *British Journal of Pharmacology*, v. 152, n. 6, p. 838 - 854, 2007.

MARTINS, T.B. et al. Analysis of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine serum concentrations in patients with multiple sclerosis by using a multiplexed immunoassay. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 136, n. 5, p. 696 - 704, 2011.

MATA, R. et al. Phytotoxic compounds from *Esenbeckia yaxhoob*. *Phytochemistry*, v. 49, n. 2, p. 441 - 447, 1998.

MAZON, E. et al. Effect of tumour necrosis factor- α receptor 1 genetic deletion on carrageenan-induced acute inflammation: a comparison with etanercept. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 153, n. 1, p. 136 - 149, 2008.

MEDZHITOV, R. Review Article Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, n. 24, p. 428 - 435, 2008.

MEDZHITOV, R.; HORNG, T. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nature Reviews Immunology*, v. 9, n. 10, p. 692 - 703, 2009.

MELO, J.G.; AMORIM, E.L.C; ALBUQUERQUE, U.P. Native medicinal plants commercialized in Brazil – priorities for conservation. *Environmental Monitoring Assessment*, v. 156, n. 1-4, p. 567 - 580, 2009.

MIKA, D.; GURUVAYOORAPPAN, C. Myeloperoxidase: the yin and yang in tumour progression. *Journal of experimental and therapeutics & oncology*, v. 9, n. 2, p. 93 - 100, 2011.

MIRANDA, K.M.; ESPEY, M.G.; WINK, D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, v. 5, n. 1, p. 62 - 71, 2001.

MISHRA, B.B.; TIWARI, V.K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, n. 10, p. 4769 - 4807, 2011.

MORSCHL, E. et al. A₃ adenosine receptor signaling influences pulmonary inflammation and fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, v. 39, n. 6, p. 697 - 705, 2008.

MOUSA, S.A.; GONCHARUK, O.; MILER, D. Recent advances of TNF-alpha antagonists in rheumatoid arthritis and chronic heart failure. *Expert opinion on biologic therapy*, v. 5, p. 617 - 625, 2007.

NAGY, G. et al. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*, v. 12, n. 3, p. 210 - 216, 2010.

NAGY, G. et al. Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity. *Immunology Letters*, v. 111, n. 1, p. 1 - 5, 2007.

NAKATSU, T. et al. Isolation, structure, and synthesis of novel 4-quinolinone alkaloids from *Esenbeckia leiocarpa*. *Journal of Natural Products*, v. 53, p. 1508 - 1513, 1990.

NAPOLITANO, H.B. et al. Aurapten, a coumarin with growth inhibition against *Leishmania major* promastigotes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, p. 1847 - 1852, 2004.

NATUREZA BRASILEIRA. Disponível em: http://www.naturezabrasileira.com.br/fotos/watermark/wm_IMG6074.jpg. Acesso em: 02 de novembro de 2012.

NAUDÉ, P.J. Tumor necrosis factor receptor cross-talk. *FEBS Journal*, v. 278, n. 6, p. 888 - 898, 2011.

NAUSEEF, W. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunological Reviews*, v. 219, p. 88 - 102, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, M.G. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, v. 75, n. 3, p. 311 - 335, 2012.

OLAJIDE, O.A.; AJAYI, A.M.; WRIGHT, C.W. Anti-inflammatory properties of cryptolepine. *Phytotherapy Research*, v. 23, n. 10, p. 1421 - 1425, 2009.

OLIVEIRA, F.M. et al. Alkaloids and coumarins from *Esenbeckia* species. *Phytochemistry*, v. 41, n. 2, p. 647 - 649, 1996.

PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, v. 87, n. 1, p. 315 - 424, 2007.

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 9, n. 1, p. 62 - 70, 2009.

PERSICHINI, T. et al. Cross-talk between constitutive and inducible NO synthase: an update. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 8, n. 5 - 6, p. 949 - 954, 2006.

PLIYEV, B.K. Chemotactically active proteins of neutrophils. *Biochemistry (Moscow)*, v. 73, n. 9, p. 970 - 984, 2008.

RAO, P.; KNAUS, E.E. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *Journal Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 11, n. 2, p. 81s - 110s, 2008.

RAO, T.S. et al. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)- induced dermal inflammation. *Inflammation*, v. 17, p. 723 - 741, 1993.

REN, K.; TORRES, R. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. *Brain Research Reviews*, v. 60, n. 1, p. 57 - 64, 2009.

REYNOLDS, C. et al. Toll-like receptors 2 and 4 and innate immunity in neutrophilic asthma and idiopathic bronchiectasis. *Thorax*, v. 62, n. 3, p. 279, 2007.

RIOS, M.Y.; DELGADO, G. Furocoumarins, terpenes and sterols from *Esenbeckia ovata* Kunth (Rutaceae). *Biochemical Systematic and Ecology*, v. 30, n. 7, p. 697 - 699, 2002.

RYZHOV, S. et al. Effect of A_{2B} Adenosine receptor gene ablation on proinflammatory adenosine signaling in mast cells. *The Journal of Immunology*, v. 180, p. 7212 - 7220, 2008.

SAKAGUCHI, Y. et al. Effect of combination of nitric oxide synthase and cyclooxygenase inhibitors on carrageenan-induced pleurisy in rats. *Life Sciences*, v. 79, n. 5, p. 442–447, 2006.

SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y. S. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *British Journal of Pharmacology*, v. 118, p. 811 - 819, 1996.

SCHMID-SCHÖBEIN, G.W. Analysis of Inflammation. *Annual Review of Biomedical Engineering*, v. 8, p. 93 - 151, 2006.

SEDGWICK, A.D.; LEES, P. A comparison of air pouch, songe and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. *Agents and Actions*, v. 18, n. 3-4, p. 439 - 446, 1986.

SOEHNLEIN, O.; WEBER, C.; LINDBOM, L. Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends in Immunology*, v. 30, n. 11, p. 538 - 546, 2009.

SÜLEYMAN, H.; DEMIRCAN, B.; KARAGÖZ, Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacological Reports*, v. 59, n. 3, p. 247 - 258, 2007.

TAVEIRA, J.J. et al. Indole alkaloids from *Aspidosperma pruinosum*. *Phytochemistry*, v. 31, n. 7, p. 2507 - 2511, 1992.

THOMAS, D.D. et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 45, n. 1, p. 18 - 31, 2008.

THOMAS, G. The SAR and QSAR approaches to drug design. In: *Fundamentals of Medicinal Chemistry*. Londres: John Wiley & Sons, p. 71 -92, 2003.

TOPLISS, J.G. Utilization of operational schemes for analog synthesis in drug design. *Journal of Medical Chemistry*, v. 15, n. 10, p. 1006 - 1011, 1972.

TOURDOT, S. et al. Respiratory syncytial virus infection provokes airway remodelling in allergen-exposed mice in absence of prior allergen sensitization. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 38, n. 6, p. 1016 - 1024, 2008.

TRANI, M. et al. Dihydrochalcones and coumarins of *Esenbeckia grandiflora* subsp. *brevipetiolata*. *Fitoterapia*, v. 75, n. 1, p. 99 - 102, 2004.

TRIPATHI, P. et al. The role of nitric oxide in inflammation reactions. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 51, n. 3, p. 443 - 452, 2007.

TSUJI, R.F. et al. Suppression of allergic reaction by lambda-carrageenan: toll-like receptor 4/MyD88-dependent and -independent modulation of immunity. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 33, n. 2, p. 249 - 258, 2003.

VAN DER VEEN, B.S.; WINTHER, M.P.J.; HEERINGA, P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 11, n. 11, p. 1 - 39, 2009.

VARANI, K. et al. Expression and functional role of adenosine receptors in regulating inflammatory responses in human synoviocytes. *British Journal of Pharmacology*, v. 160, n. 1, p. 101 - 115, 2010.

WAJANT, H.; SCHEURICH, P. TNFR1-induced activation of the classical NF- κ B pathway. *FEBS Journal*, v. 278, n. 6, p. 862 - 876, 2011.

WANG, Y. et al. Nitric oxide: promoter or suppressor of programmed cell death? *Protein Cell*, v. 1, n. 2, p. 133 - 142, 2010.

WITKO-SARSAT, V. et al. Regulating neutrophil apoptosis: new players enter the game, *Trends in Immunology*, v. 32, n. 3, p. 117 - 124, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Traditional medicine, Fact sheet, n. 134, 2008. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>>. Acesso em: 15/09/2012.

YEGUTKIN, G.G. Nucleotide-and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signaling cascade. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1783, n. 5, p. 673 - 694, 2008.

ZAMANI, B.; JAMALI, R.; JAMALI, A. Serum adenosine deaminase may predict disease activity in rheumatoid arthritis. *Rheumatology International*, v. 32, n. 7, p. 1967-1975, 2012.

ZEIGER, S. et al. Elevated exhaled nitric oxide is a clinical indicator of future uncontrolled asthma in asthmatic patients on inhaled corticosteroids. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 28, n. 2, p. 412 - 414, 2011.

ZHOU, Y. et al. Distinct roles for the A2B adenosine receptor in acute and chronic stages of bleomycin-induced lung injury. *Journal of Immunology*, v. 186, n. 2, p. 1097 - 1106, 2011.

ANEXO A - Protocolo de aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC) (PP00343)

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00343

TítuloESTUDO DO EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO, ANTIAGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA E ANTIMICROBIANO DÁ *Esenbeckia leiocarpa***Data de Entrada**

28/04/2009

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

05/06/2009

Considerações

Ofício nº 085/CEUA/PRPE/2009

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Tânia Sílvia Fröde, 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 02 (dois) anos, para a utilização de 2011 (dois mil e onze) camundongos (*Mus musculus*).

A CEUA recomenda a indicação do vínculo dos pesquisadores e estudantes envolvidos (vide parecer 02 em anexo).

- Processo cadastrado sob o número: 23080.018998/2009-06

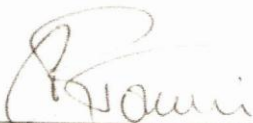
Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ONLINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 16/09/2011

Data 16/06/2009

Parecer(es):

Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE

ANEXO B - Resumos apresentados em anais de congressos

1. FRÖDE, T. S ; **POZZATTI, P.**; REIS, G. O. ; PEREIRA, D. F.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M. Systemic administration of *Esenbeckia leiocarpa* attenuates the inflammatory response induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy.. In: AACC Annual Meeting, 2009, Chicago. Clinical Chemistry. AACC Press: Washington, 2009, v. 55. p. 3.
2. **POZZATTI, P.** BENINCA, J. P.; BUSS, Z. S.; PEREIRA, D. F.; PIZZOLATTI, M.; HORST, H.; FRÖDE, T. S. Anti-inflammatory efficacy of *Esenbeckia leiocarpa* in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan. In: XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2009, Águas de Lindóia. Programa XXIV Reunião Anual FeSBE, 2009.
3. REIS, G. O.; **POZZATTI, P.**; PEREIRA, D. F.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M.; FRÖDE, T. S. Anti-inflammatory effect of *Esenbeckia leiocarpa* in a murine experimental model. In: Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, 2010, Águas de Lindóia. XXV Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental - CD ROM, 2010.
4. REIS, G. O.; LIZ, R.; **POZZATTI, P.**; PEREIRA, D. F.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M. G.; FRÖDE, T. S. Estudo do efeito e do mecanismo de ação anti-inflamatória da *Esenbeckia leiocarpa* em modelo experimental *in vivo*. In: 20º Seminário de Iniciação Científica da UFSC, 2010, Florianópolis. 20º Seminário de Iniciação Científica da UFSC - Web Site, 2010.
5. REIS, G. O.; **POZZATTI, P.**; PEREIRA, D. F.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M. G.; FRÖDE, T. S. Structure-activity study of dihydrocorynantheol alkaloid and its anti-inflammatory efficacy in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan. In: IMMUNOFOZ - XXXVI Brazilian Congress of Immunology, 2011, Foz do Iguaçu. Anais do XXXVI Brazilian Congress of Immunology, CD-ROM, 2011.

6. VICENTE, G.; REIS, G. O.; **POZZATTI, P.**; PEREIRA, D. F.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M. G.; FRÖDE, T. S. Análise do efeito anti-inflamatório do extrato bruto e frações obtidas da *Esenbeckia leiocarpa* (Rutaceae) no modelo pleurisia induzida por carragenina, em camundongos. In: 21º Seminário de Iniciação Científica da UFSC (SIC-UFSC), 2011, Florianópolis. Anais do 21º Seminário de Iniciação Científica da UFSC (SIC-UFSC), Web Site, 2011.

ANEXO C - Abstract do artigo publicado no *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.

JPP 2011, 63: 1091–1102
© 2011 The Authors
JPP © 2011 Royal
Pharmaceutical Society
Received August 24, 2010
Accepted May 3, 2011
DOI
10.1111/j.2042-7158.2011.01311.x
ISSN 0022-3573

Esenbeckia leiocarpa Engl. inhibits inflammation in a carrageenan-induced murine model of pleurisy

Patrícia Pozzatti^a, Gustavo Oliveira dos Reis^a,
Danielle Fontana Pereira^b, Melina Heller^c, Gustavo Amadeu Micke^c,
Heros Horst^c, Moacir Geraldo Pizzolatti^c and Tânia Sílvia Fröde^a

^aDepartment of Clinical Analysis, Centre for Health Sciences, ^bDepartment of Biochemistry, Centre for Biological Sciences and ^cDepartment of Chemistry, Centre for Physical and Mathematical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, SC, Brazil

Abstract

Objectives The aim of this study was to investigate the anti-inflammatory effects of the crude hydroalcoholic extract (CHE) isolated from *Esenbeckia leiocarpa* Engl., and fractions and subfractions derived from it.

Methods Dried *E. leiocarpa* Engl. bark was macerated and extracted with ethanol to obtain the CHE. The *n*-hexane, ethyl acetate, aqueous and alkaloid fractions, as well as two alkaloid subfractions (polar and nonpolar) were obtained from the CHE. A preliminary analysis using thin-layer chromatography was performed. Capillary electrophoresis, physical characteristics and spectral data produced by IR analysis and nuclear magnetic resonance (¹H and ¹³C NMR), and mass spectrometry analysis were used to identify and elucidate the structure of the major compounds. Swiss mice were used in a carrageenan-induced pleurisy model. Pro-inflammatory parameters (leukocyte and exudate concentrations, myeloperoxidase and adenosine-deaminase activity, and nitrate/nitrite, interleukin 1 β and tumour necrosis factor α levels) were quantified in exudates at 4 h after carrageenan-induced pleurisy in mice.

Key findings The dihydrocorynantheol alkaloid was isolated as the majority compound in the CHE, ethyl acetate and alkaloid fractions, and in the polar and nonpolar alkaloid subfractions. The CHE, fractions and subfractions inhibited the increases in leukocyte and exudate concentrations, myeloperoxidase and adenosine-deaminase activity, and nitrite/nitrate, interleukin 1 β , and tumour necrosis factor α levels ($P < 0.05$) in the fluid secreted from the pleural cavity of the carrageenan-treated mice.

Conclusions *E. leiocarpa* Engl. showed significant *in vivo* anti-inflammatory action by inhibiting the inflammation caused by carrageenan. This effect may be, in part, due to the dihydrocorynantheol alkaloid, which was identified as the majority compound isolated from *E. leiocarpa* bark.

Keywords adenosine-deaminase; anti-inflammatory activity; *Esenbeckia leiocarpa* Engl.; myeloperoxidase; nitric oxide; pro-inflammatory cytokines

ANEXO D - Comprovante de submissão do artigo: "Relationship of chemical structure to in vivo anti-inflammatory activity of dihydrocorynantheol alkaloid and its analogues", ao periódico *Pharmacological Reports*.

----- Original Message -----

From: "Pharmacological Reports" <editor@if-pan.krakow.pl>

To: "Tânia Silvia Fröde" <saleh@ccs.ufsc.br>

Sent: Monday, September 24, 2012 11:49 AM

Subject: Pharmacological Reports, manuscript no. 5216

> Dear Dr. Fröde,

>

>

>

> We have received the manuscript entitled "Relationship of chemical structure
> to in vivo anti-inflammatory activity of dihydrocorynantheol alkaloid and
> its analogues" by Patricia Pozzatti, Gustavo O. dos Reis, Danielle F.
> Pereira, Heros Horst, Leandro Espindola, Melina Heller, Gustavo A. Micke,
> Moacir G. Pizzolatti, Tânia S. Fröde and registered it under the no. 5216.

>

> Please quote this number and the title in the following correspondence.

>

>

>

> You will be informed about the acceptance of your paper as it is reviewed by
> the referees.

>

>

>

> Yours sincerely,

>

>

>

> Beata Kreiner

>

> PHARMACOLOGICAL REPORTS