



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA – PGFAR  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ALVARO VARGAS JÚNIOR**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DOS EXTRATOS AQUOSOS DE  
*Passiflora alata* DRYANDER E *Passiflora edulis* SIMS, NO MODELO DA  
PLEURISIA INDUZIDA POR CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS**

Florianópolis (SC), fevereiro de 2005.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA – PGFAR  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DOS EXTRATOS AQUOSOS DE  
*Passiflora alata* DRYANDER E *Passiflora Edulis* SIMS, NO MODELO DA  
PLEURISIA INDUSIDA POR CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS**

**Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmácia.**

Aluno: Alvaro Vargas Júnior

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tânia Silvia Fröde

Florianópolis (SC), fevereiro de 2005

***“Feliz aquele que transfere o que sabe  
e aprende o que ensina.”***

***Cora Coralina***

**Em especial a meus pais, Álvaro e Natalina, pela segurança, carinho, confiança e sabedoria, pela dedicação de parte de suas vidas as “minhas” realizações, e pelo importante apoio e incentivo em todas as escolhas que fiz.**

**A Andréia, pelo companheirismo,  
compreensão, paciência, amizade,  
incentivo e carinho, sempre sensata,  
calma e com palavras sábias.**

**A Professora Tânia Silvia Fröde pelo seu profissionalismo, dedicação e integridade. Pela incansável persistência na busca de condições para realização de “seus” projetos. Pela disponibilidade e vontade de ensinar, e claro, pela sua amizade.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela oportunidade de viver e compreender seus desígnios e crescer em minha vocação.

A vida, que reserva a todos um destino.

A meus pais, Álvaro Paim de Vargas e Natalina Trentin de Vargas, pela amizade, segurança, compreensão e incentivo que sempre me confortaram, pelo exemplo de dignidade e caráter e por ter imprimido em mim o desejo de crescer.

A minha namorada, Andréia Ângela Bonassi (Duda), por iluminar minha vida com seu amor e companheirismo, sendo meu porto seguro nas adversidades e minha alegria em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Cinthia, Sandra, Sandro e Edson e a seus cônjuges e filhos, meus sobrinhos, pela amizade, compreensão e pelos momentos de alegria.

A minha afilhada Lavínia, pela ternura, felicidade, pelos momentos de descontração e bagunça, certamente este padrinho agradece.

Aos meus padrinhos e amigos Luis e Maria Lisete Fabris, que sempre estiveram presentes me incentivando a superar os desafios.

Agradeço aos amigos e colegas do mestrado, em especial a umas certas “figuras”: Patrik, Tiago, Róber, Teófilo, Joel, Eduardo, Alexandre, Bolívar, Irmã e Melissa pelos momentos de aprendizagem, descontração e alegria.

Pelo suporte no estudo, muitos livros, artigos e paciência, agradeço aos colegas e amigos Rodrigo e a Silvana.

Agradeço também aos grandes amigos Jarbas, Dalabilia, Fabrício, Fábio, Digão, Comin, Odílio, Ricardo, Kaline, Vanessa, Neila, Sandra, Larissa, aos amigos de infância, adolescência, juventude e..., Ivoberto, César, Erivelton, Éverson,

Dalagnol, Galupo, Richard, Bugre, Diego, Maurício e Dido que compartilharam esses anos de estudos e expectativas, e que presentes ou não, sempre auxiliaram, de alguma forma, com palavras amigas.

Agradeço em especial a Profa. Dra. Rosa M. Ribeiro do Valle Nicolau pelo incentivo e apoio para ingressar no PGFAR e pelo orientado Prof. Dr. Rodrigo Rebelo Peters, além de um importante professor em minha formação, um grande amigo.

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tânia Silvia Fröde, pela orientação, apoio e estímulo, pela confiança que sempre imprimiu às nossas discussões e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel, pelas orientações e sugestões que foram de grande valia para a realização deste trabalho.

Aos professores Dra. Grace Gosman e Dr. Flávio Reginatto e a seus orientados pelo suporte para realização deste trabalho.

Ao extraordinário grupo de pesquisa da Profa. Dra Tânia Silvia Fröde, do qual faço e farei parte. Em especial aos meus amigos e colegas de laboratório: Marcelo, Denise, Eduardo, Silvana, Ana, Ziliani, Jucélia e Robson, “Doutores” em solidariedade e que se tornaram meus grandes amigos.

Aos funcionários do hospital universitário pela atenção que me dispensaram;

Aos meus vizinhos de laboratório pelo convívio e pela aptidão em ajudar nas mais diversas situações, a Profa. Dra. Cirene, ao Prof. Dr. Jairo a Elaine meus sinceros agradecimentos.

À Universidade Federal de Santa Catarina, aos professores, funcionários do Departamento de Pós-graduação em Farmácia pela oportunidade de conviver e adquirir novos e importantes conhecimentos;



Enfim, agradeço a todas as pessoas que a mim dedicaram seu tempo e esforço, pelas críticas que me ajudaram e certamente ainda ajudarão a crescer. Se fosse citá-las, correria o risco de omitir algumas, e por isso estendo estes agradecimentos no presente parágrafo.

Então, a todos que fazem parte de minha vida o meu muito obrigado.

# SUMÁRIO

PÁG.

Lista de abreviações	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Abstract	
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 PLANTAS MEDICINAIS	1
1.2 À FAMÍLIA PASSIFLORACEAE	2
<b>1.2.1 Constituintes químicos</b>	<b>4</b>
<b>1.2.2 Informações toxicológicas</b>	<b>5</b>
<b>1.2.3 Informações farmacológicas</b>	<b>6</b>
1.3 O PROCESSO INFLAMATÓRIO	8
<b>1.3.1 Mediadores do processo inflamatório</b>	<b>10</b>
<b>1.3.1.1 Proteases plasmáticas</b>	<b>10</b>
<b>1.3.1.2 Aminas vasoativas</b>	<b>11</b>
<b>1.3.1.3 Metabólitos do ácido araquidônico</b>	<b>12</b>
<b>1.3.1.4 Óxido nítrico</b>	<b>12</b>
<b>1.3.1.5 Radicais livres do Oxigênio</b>	<b>13</b>
<b>1.3.1.6 Constituintes lisossomais dos leucócitos</b>	<b>14</b>
<b>1.3.1.7 Citocinas</b>	<b>15</b>
<b>1.3.1.8 Proteínas de fase aguda da inflamação</b>	<b>16</b>
<b>1.3.2 Células envolvidas no processo inflamatório</b>	<b>17</b>
<b>1.3.2.1 Neutrófilos</b>	<b>17</b>
<b>1.3.2.2 Fagócitos mononucleares</b>	<b>18</b>
<b>1.3.2.3 Células endoteliais</b>	<b>19</b>
<b>1.3.3 Moléculas de adesão</b>	<b>19</b>
<b>1.3.4 Fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB)</b>	<b>20</b>
1.4 PLANTAS MEDICINAIS E OS ALVOS TERAPÊUTICOS	22
1.5 MODELOS DE INFLAMAÇÃO	23
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>27</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	30

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
<b>4. MATERIAIS e MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
4.1 MATERIAIS .....	31
<b>4.1.1 Material botânico.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1.1.1 Coleta e identificação.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1.1.2 Preparação dos extratos.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1.2 Fármacos e reagentes.....</b>	<b>32</b>
4.2 ANIMAIS.....	34
4.3 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO.....	34
4.4 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS.....	34
4.5 MÉTODOS.....	35
<b>4.5.1 Modelo de inflamação utilizado.....</b>	<b>35</b>
▪ <b>Pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.....</b>	<b>35</b>
<b>4.5.2 Técnicas utilizadas.....</b>	<b>36</b>
<b>4.5.2.1 Contagem total e diferencial dos leucócitos na cavidade pleural e no sangue total.....</b>	<b>36</b>
▪ <b>Coloração dos esfregaços celulares utilizando-se o corante May-Grünwald-Giemsa.....</b>	<b>37</b>
<b>4.5.2.2 Determinação do exsudato na cavidade pleural.....</b>	<b>37</b>
<b>4.5.2.3 Determinação da permeabilidade vascular em tecidos (pulmão, coração, baço, fígado e rins).....</b>	<b>38</b>
<b>4.5.2.4 Determinação dos níveis de mieloperoxidase (MPO) no lavado pleural.....</b>	<b>38</b>
<b>4.5.2.5 Determinação dos níveis de adenosina-deaminase (ADA) no lavado pleural.....</b>	<b>39</b>
<b>4.5.2.6 Determinação dos níveis de nitrito/nitrato (NO<sup>x</sup>) no lavado pleural.....</b>	<b>40</b>
<b>4.5.2.7 Determinação dos níveis de proteínas totais no exsudato e no soro.....</b>	<b>41</b>
<b>4.5.2.8 Determinação dos níveis de Proteína-C reativa (PCR) no soro .....</b>	<b>42</b>
<b>4.5.3 Protocolo experimental.....</b>	<b>43</b>

<b>4.5.3.1 Efeito dos extratos aquosos de <i>Passiflora alata</i> Dryander e <i>Passiflora edulis</i> Sims, sobre a migração de leucócitos, na cavidade pleural de camundongos com pleurisia .....</b>	<b>43</b>
<b>4.5.3.2 Efeito dos extratos aquosos de <i>Passiflora alata</i> Dryander e <i>Passiflora edulis</i> Sims, sobre a contagem total de leucócitos no sangue de camundongos com pleurisia.....</b>	<b>45</b>
<b>4.5.3.3 Efeito dos extratos aquosos de <i>Passiflora alata</i> Dryander e <i>Passiflora edulis</i> Sims, sobre a exudação, na cavidade pleural de camundongos com pleurisia.....</b>	<b>45</b>
<b>4.5.3.4 Efeito dos extratos aquosos de <i>Passiflora alata</i> Dryander e <i>Passiflora edulis</i> Sims, sobre a permeabilidade vascular, em tecidos (pulmão, coração, baço, fígado e rins) de camundongos com pleurisia.....</b>	<b>46</b>
<b>4.5.3.5 Efeito dos extratos aquosos de <i>Passiflora alata</i> Dryander e <i>Passiflora edulis</i> Sims, sobre os níveis da mieloperoxidase, na cavidade pleural de camundongos com pleurisia.....</b>	<b>47</b>
<b>4.5.3.6 Efeito dos extratos aquosos de <i>Passiflora alata</i> Dryander e <i>Passiflora edulis</i> Sims, sobre os níveis da adenosina-deaminase, na cavidade pleural de camundongos com pleurisia.....</b>	<b>47</b>
<b>4.5.3.7 Efeito dos extratos aquosos de <i>Passiflora alata</i> Dryander e <i>Passiflora edulis</i> Sims, sobre os níveis do nitrito/nitrato (NO<sup>x</sup>) na cavidade pleural de camundongos com pleurisia.....</b>	<b>48</b>
<b>4.5.3.8 Efeito dos extratos aquosos de <i>Passiflora alata</i> Dryander e <i>Passiflora edulis</i> Sims, sobre os níveis de proteínas totais no exsudato e no soro de camundongos com pleurisia.....</b>	<b>49</b>
<b>4.5.3.9 Efeito dos extratos aquosos de <i>Passiflora alata</i> Dryander e <i>Passiflora edulis</i> Sims, sobre os níveis de Proteína-C reativa no soro de camundongos com pleurisia.....</b>	<b>49</b>
<b>4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>50</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
<b>5.1 RESULTADOS OBTIDOS COM A <i>Passiflora alata</i> Dryander.....</b>	<b>51</b>

<b>5.1.1 Efeito do extrato aquoso de <i>Passiflora alata</i> Dryander sobre a migração de leucócitos, na cavidade pleural de camundongos com pleurisia.....</b>	<b>51</b>
<b>5.1.2 Efeito do extrato aquoso de <i>Passiflora alata</i> Dryander sobre os níveis de leucócitos, no sangue de camundongos com pleurisia.....</b>	<b>54</b>
<b>5.1.3 Efeito do extrato aquoso de <i>Passiflora alata</i> Dryander sobre a exsudação, na cavidade pleural de camundongos com pleurisia.....</b>	<b>56</b>
<b>5.1.4 Efeito do extrato aquoso de <i>Passiflora alata</i> Dryander sobre a permeabilidade vascular em tecidos (pulmão, coração, baço, fígado e rins) de camundongos com pleurisia.....</b>	<b>59</b>
<b>5.1.5 Efeito do extrato aquoso de <i>Passiflora alata</i> Dryander sobre os níveis de mieloperoxidase (MPO), adenosina-deaminase (ADA) e nitrato/nitrito (ON<sup>x</sup>) no lavado pleural de camundongos com pleurisia.....</b>	<b>60</b>
<b>5.1.6 Efeito do extrato aquoso de <i>Passiflora alata</i> Dryander sobre os níveis de proteínas totais no exsudato e no soro de camundongos com pleurisia .....</b>	<b>62</b>
<b>5.1.7 Efeito do extrato aquoso de <i>Passiflora alata</i> Dryander sobre os níveis de proteína-C reativa no soro de camundongos com pleurisia.....</b>	<b>64</b>
<b>5.2 RESULTADOS OBTIDOS COM A <i>Passiflora edulis</i> Sims.....</b>	<b>68</b>
<b>5.2.1 Efeito do extrato aquoso de <i>Passiflora edulis</i> Sims sobre a migração de leucócitos, na cavidade pleural de camundongos com pleurisia.....</b>	<b>68</b>
<b>5.2.2 Efeito do extrato aquoso de <i>Passiflora edulis</i> Sims sobre os níveis de leucócitos, no sangue de camundongos com pleurisia.....</b>	<b>72</b>
<b>5.2.3 Efeito do extrato aquoso de <i>Passiflora edulis</i> Sims sobre a exsudação na cavidade pleural de camundongos com pleurisia.....</b>	<b>74</b>
<b>5.2.4 Efeito do extrato aquoso de <i>Passiflora edulis</i> Sims sobre a permeabilidade vascular em tecidos (pulmão, coração, baço, fígado e rins) de camundongos com pleurisia.....</b>	<b>76</b>

<b>5.2.5 Efeito do extrato aquoso de <i>Passiflora edulis</i> Sims sobre os níveis de mieloperoxidase (MPO), adenosina-deaminase (ADA) e nitrato/nitrito (ON<sup>x</sup>) no lavado pleural de camundongos com pleurisia.....</b>	<b>77</b>
<b>5.2.6 Efeito do extrato aquoso de <i>Passiflora edulis</i> Sims sobre os níveis de proteínas totais no exsudato e no soro de camundongos com pleurisia.....</b>	<b>79</b>
<b>5.2.7 Efeito do extrato aquoso de <i>Passiflora edulis</i> Sims sobre os níveis de proteínas-C reativa no soro de camundongos com pleurisia.....</b>	<b>81</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>85</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>104</b>
<b>8. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>106</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>107</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>127</b>
▪Protocolo e cadastro da Comissão Ética no Uso de Animais (CEUA).....	128

## LISTA DE ABREVIÇÕES

$\alpha_x\beta_2$	Molécula de adesão da família das integrinas, expressa em granulócitos e monócitos. Sinônimo: CD11c/CD18
$\alpha_1\beta_2$	Molécula de adesão da família das integrinas, expressa em todos os leucócitos. Sinônimos: CD11a/CD18 ou LFA-1
$\alpha_4\beta_1$	Molécula de adesão da família das integrinas expressa em linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. Sinônimos: CD49d/CD29 ou VLA-4
$\alpha_4\beta_7$	Ligante da molécula de adesão da família das imunoglobulinas (MAdCAM-1)
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{g/g}$	Micrograma por grama
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitros
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\alpha_M\beta_2$	Molécula de adesão da família das integrinas, expressa em granulócitos e monócitos. Sinônimos: CD11b/CD18 ou Mac-1
(R)	Regressão linear
(r)	Correlação paramétrica de Pearson
(r)	Correlação não-paramétrica de Spearman
$\alpha_v\beta_3$	Ligante da molécula de adesão da família das imunoglobulinas (PECAM-1)
12-LOX	12-lipooxigenase
15-LOX	15-lipooxigenase
5 HETE	Ácido 5-hidroxi-eicosatetraenóico
5-HT	5-Hidroxitriptamina, serotonina
5-LOX	5-lipooxigenase
6-ceto $\text{PGF}_1$	Prostaglandina F1
$A_1, A_{2A}, A_{2B}$ e $A_3$	Receptores para a adenosina 1; 2A, 2B e 3
A2780	Linhagem de células ovarianas denominadas A2780
AA	Ácido araquidônico
ADA	Adenosina-deaminase
$\text{AlCl}_3$	Cloreto de alumínio
ANOVA	Teste estatístico paramétrico
Anti-PCR	Anticorpo anti-PCR ligado a partículas de látex
$B_1$ e $B_2$	Receptores para a bradicinina 1 e 2
Bk	Bradicinina
$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$	Adenosina
$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2$	Dihidrocloreto de N-(1-naftil)-etilenodiamina
$\text{C}_{34}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_{14}\text{S}_4\text{Na}_4$	Azul de Evans
C3a	Componente do complemento C3a
$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$	Éter etílico
$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{K}_2$	Tartarato duplo de sódio e potássio (ácido tartárico)
C57BL/6	Raça de camundongo denominada C57BL/6
C5a	Componente do complemento C5a
$\text{C}_5\text{FeN}_5\text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Nitroprussiato de sódio
$\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$	Fenol
$\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$	Sulfanilamida
CCD	Cromatografia em camada delgada

CCPA	Agonista seletivo do receptor a adenosina A <sub>1</sub>
CD102	Molécula de adesão da família das imunoglobulinas expressa no endotélio
CD106	Molécula de adesão da família das imunoglobulinas expressa no endotélio
CD11a	Molécula de adesão da família das integrinas, expressa em linfócitos, granulócitos, monócitos e macrófagos
CD11b	Molécula de adesão da família das integrinas expressa em células mielóides e células matadoras naturais ( <i>natural killer</i> )
CD11c	Molécula de adesão da família das integrinas, expressa em células mielóides
CD18	Molécula de adesão da família das integrinas, expressa em todos os leucócitos
CD29	Molécula de adesão da família das integrinas, expressa nos linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos
CD31	Molécula de adesão da família das imunoglobulinas, expressa em todos os leucócitos, endotélio e plaquetas
CD34	Molécula de adesão da família das integrinas, expressa em células progenitoras hematopoiéticas
CD49d	Molécula de adesão da família das integrinas, expressa nos linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos
CD49d/ $\beta_7$	Molécula de adesão da família das integrinas, expressa em linfócitos e eosinófilos. Sinônimo: LPAM-1
CD54	Molécula de adesão da família das imunoglobulinas, expressa no endotélio e nos eosinófilos
CD62E	Molécula de adesão da família das selectinas, expressa no endotélio
CD62L	Molécula de adesão da família das selectinas, expressa em todos os leucócitos
CD62P	Molécula de adesão da família das selectinas, expressa em células endoteliais e plaquetas
CEUA	Comitê de Ética na Utilização de Animais
Cg	Carragenina
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CGS 21680	Agonista seletivo para o receptor da adenosina A <sub>2A</sub>
CH <sub>3</sub> NO	Formamida
CH <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	Formato de amônio
cm	Centímetros
COX-1	Ciclooxigenase tipo 1
COX-2	Ciclooxigenase tipo 2
CPR	Protein-C reactive (proteína-C reativa)
c-Rel	Membro da família do NF-kappa B, denominado c-Rel
CTC	Solução de Cobre 0,1 %, tartarato duplo de sódio e potássio 0,2 %, carbonato de sódio 10 % e água
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Sulfato de cobre
DL <sub>50</sub>	Dose letal 50%
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPCPX	Antagonista para o receptor A1
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
E.C.ATCC	<i>Escherichia coli</i> (American type culture collection)



E.D.T.A	Ácido etilenodiaminotetracético
E.P.M.	Erro padrão da média
EI	Receptor para a prostaglandina PGI <sub>2</sub>
ELAM	Molécula de adesão da família das selectinas expressa no endotélio
eNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva, expressa em células endoteliais
EP1 e EP2	Receptores para a prostaglandina PGE <sub>2</sub>
ESL-1	Ligante da molécula de adesão E-selectina
FA	Fosfatase alcalina
FAINEs	Fármacos antiinflamatórios não esteroidais
Fator tecidual VII	Proteína da cascata de coagulação denominada Fator tecidual VII
FLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
FMLP	Formil-Met-Leu-Phe
FR173657	Antagonista seletivo do receptor B <sub>2</sub> da bradicinina
g	Gramas
GlyCAM-1	Molécula de adesão da família das integrinas, expressa em vênulas
GMP-140	Molécula de adesão da família das selectinas expressa em células endoteliais e plaquetas
h	Hora
H <sub>1</sub> , H <sub>2</sub> , H <sub>3</sub> ou H <sub>4</sub>	Receptores para a histamina 1; 2; 3 e 4
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogénio
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido fosfórico
HL-60	Linhagem celular denominada HL-60
HOCl	Hipoclorito
HOE 140	Antagonista seletivo para o receptor da bradicinina B <sub>2</sub>
HUVEC	Células endoteliais de veia umbilical humana
I <sub>κ</sub> B	Proteína inibidora do Fator de transcrição nuclear NF-kappa B
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intrapleural
i.v.	Intravenoso
IB-MECA	Agonista seletivo do receptor da adenosina A <sub>3</sub>
ICAM	Molécula de adesão da família das imunoglobulinas
ICN	Numeração da exsicata armazenada
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL-1	Interleucina 1
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
Indo	Indometacina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
KCl	Cloreto de potássio
LAM	Molécula de adesão da família das selectinas
LC	Limite de confiança
LECAM	Molécula de adesão da família das selectinas expressa em todos os leucócitos
LFA-1	Molécula de adesão da família das integrinas, expressa em todos os leucócitos

LPAM-1	Molécula de adesão da família das integrinas, expressa nos linfócitos e eosinófilos;
LPS	Lipolissacarídeos
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
LTs	Leucotrienos
LXA	Lipoxinas
m/m	Relação massa/massa
MAC	Complexo de ataque à membrana
MadCAM-1	Molécula de adesão da família das imunoglobulinas, expressa em células endoteliais da placa de Peyer
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos-1
MEL-14Ag	Molécula de adesão da família das selectinas expressa em todos os leucócitos
mg/kg	Miligrama por quilograma
mg/L	Miligrama por litro
mg/mL	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MMP-2	Proteínas da matriz de metaloprotease-2
MMP-9	Proteínas da matriz de metaloprotease-9
MMPs	Metaloproteases
MONO	Mononucleares
MPO	Mieloperoxidase
mU/mL	Miliunidades por mililitro
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sódio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	Fosfato de hidrogênio dissódico dodecahidratado
NaCl	Solução salina
NADPH	Glutathiona redutase
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Fosfato de sódio hidratado
NaOCl	Hipoclorito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NECA	Agonista do receptor da adenosina A <sub>2B</sub>
NF-κB	Fator de transcrição nuclear NF-kappa B
NH <sub>3</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de amônio
nm	Nanômetro
nNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva, expressa em células neuronais
NO	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
NO <sup>x</sup>	Metabólitos do óxido nítrico (nitrato e nitrito)
O <sub>2</sub>	Oxigênio molecular
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
°C	Unidade de temperatura, graus Celsius
OCl <sup>-</sup>	Íon hipoclorito
OH <sup>-</sup>	Radical hidroxil
OONO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
P.A.	Puro para análise

p50/p105	Dímero da família do NF-kappa B, composto do membro p52 e seu precursor p100. Sinônimo: NF-kappa B1
p52/p100	Dímero da família do NF-kappa B, composto do membro p52 e seu precursor p100. Sinônimo: NF-kappa B2
p65/RelA	Membro da família do NF-kappa B, denominado p65/RelA
<i>Pa</i>	<i>Passiflora alata</i> Dryander
PADGEM	Molécula de adesão da família das selectinas expressa em células endoteliais e plaquetas
PAF	Fator de ativação plaquetária
PBS	Tampão fosfato
PCR	Proteína-C reativa
<i>Pe</i>	<i>Passiflora edulis</i> Sims
PECAM-1	Molécula de adesão da família das imunoglobulinas, expressa em leucócitos, células endoteliais e plaquetas;
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandina D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandina F <sub>2α</sub>
PGI <sub>2</sub> ,	Prostaglandina ou Prostaciclina I <sub>2</sub>
PGs	Prostaglandinas
PMN	Polimorfonucleares
PSGL-1	Ligante das moléculas de adesão P-selectina, expressa em todos os leucócitos
RAW 264,7	Linhagem de cultura de células
RelB	Membro da família do NF-kappa B, denominado RelB
ROS	Espécies reativas do oxigênio
S	Animais controle negativo, somente tratados com salina
SDS	Dodecilsulfato de sódio
Selectinas-E	Molécula de adesão do tipo selectina, expressa nos leucócitos e em células endoteliais
Selectinas-L	Molécula de adesão do tipo selectina, expressa nos leucócitos
Selectinas-P	Molécula de adesão do tipo selectina, expressa em células endoteliais e plaquetas
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TXs	Tromboxanos
U/L	Unidades por litro
U/mg	Unidades por miligrama
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UI/mL	Unidade internacionais por mililitro
UPF	Universidade de Passo Fundo
VCAM	Molécula de adesão da família das imunoglobulinas, expressa no endotélio;
VEGF	Fator de permeabilidade vascular liberado por neutrófilos ativados
VLA-4	Molécula de adesão da família das integrinas, expressas em monócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos
ZnSO <sub>4</sub>	Sulfato de zinco

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Frutos, folhas e flores de <i>Passiflora alata</i> .....	03
Figura 2: Frutos, folhas e flores de <i>Passiflora edulis</i> .....	03
Figura 3: Resposta inflamatória no modelo da pleurisia induzida 4 horas após a indução pela carragenina, em camundongos.....	26
Figura 4: Efeito de diferentes doses do Extrato aquoso de <i>Passiflora alata</i> Dryander (50-300 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia.....	53
Figura 5: Efeito do Extrato aquoso de <i>Passiflora alata</i> Dryander (100 mg/kg; i.p.) administrado 0,5-4 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia.....	55
Figura 6: Efeito de diferentes doses do Extrato aquoso de <i>Passiflora alata</i> Dryander (50-300 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) ) sobre os níveis de leucócitos no sangue de camundongos com pleurisia.....	57
Figura 7: Efeito do Extrato aquoso de <i>Passiflora alata</i> Dryander (100-300 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis de exsudação na cavidade pleural.....	58
Figura 8: Efeito do Extrato aquoso de <i>Passiflora alata</i> Dryander (100 mg/kg; i.p.) administrado 0,5-4 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis de exsudação na cavidade pleural.....	58
Figura 9: Efeito do Extrato aquoso de <i>Passiflora alata</i> Dryander (100 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia sobre a permeabilidade vascular em tecidos.....	59
Figura 10: Efeito do Extrato aquoso de <i>Passiflora alata</i> Dryander (100 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis de mieloperoxidase.....	61
Figura 11: Efeito do Extrato aquoso de <i>Passiflora alata</i> Dryander (100 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis da adenosina-deaminase.....	61
Figura 12: Efeito do Extrato aquoso de <i>Passiflora alata</i> Dryander (100 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis de nitrito/nitrato (NO <sup>x</sup> ).....	62

Figura 13: Efeito do Extrato aquoso de <i>Passiflora alata</i> Dryander (100 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis de proteínas totais no exsudato.....	63
Figura 14: Efeito do Extrato aquoso de <i>Passiflora alata</i> Dryander (100 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis de proteínas totais no soro.....	64
Figura 15: Efeito do Extrato aquoso de <i>Passiflora alata</i> Dryander (100 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis de proteína-C reativa no soro.....	65
Figura 16: Efeito de diferentes doses do Extrato aquoso de <i>Passiflora edulis</i> Sims (100-1000 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia.....	69
Figura 17: Efeito do Extrato aquoso de <i>Passiflora edulis</i> Sims (250 mg/kg; i.p.) administrado 0,5-4 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia.....	71
Figura 18: Efeito de diferentes doses do Extrato aquoso de <i>Passiflora edulis</i> Sims (100-1000 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia.....	73
Figura 19: Efeito do Extrato aquoso de <i>Passiflora edulis</i> Sims (100-1000 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) sobre os níveis de leucócitos no sangue de camundongos com pleurisia.....	74
Figura 20: Efeito do Extrato aquoso de <i>Passiflora edulis</i> Sims (250 mg/kg; i.p.) administrado 0,5-4 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis de exsudação na cavidade pleural.....	75
Figura 21: Efeito do Extrato aquoso de <i>Passiflora edulis</i> Sims (250 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia sobre a permeabilidade vascular em tecidos.....	76
Figura 22: Efeito do Extrato aquoso de <i>Passiflora edulis</i> Sims (250 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis mieloperoxidase.....	78

Figura 23: Efeito do Extrato aquoso de <i>Passiflora edulis</i> Sims (250 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia sobre a atividade da adenosina-deaminase.....	78
Figura 24: Efeito do Extrato aquoso de <i>Passiflora edulis</i> Sims (250 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis de óxido nítrico (NO <sup>x</sup> ).....	79
Figura 25: Efeito do Extrato aquoso de <i>Passiflora edulis</i> Sims (250 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis de proteínas totais no exsudato.....	80
Figura 26: Efeito do Extrato aquoso de <i>Passiflora alata</i> Dryander (100 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis de proteínas totais no soro.....	81
Figura 27: Efeito do Extrato aquoso de <i>Passiflora edulis</i> Sims (250 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis de proteína-C reativa no soro.....	82
Figura 28: Resumo dos efeitos antiinflamatórios dos extratos aquosos de <i>Passiflora alata</i> Dryander e <i>Passiflora edulis</i> Sims, no modelo da pleurisia induzida por carragenina em camundongos.....	105

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Moléculas de adesão e sua interação celular na resposta inflamatória.....	21
Tabela 2: Percentagem de inibição da <i>Passiflora alata</i> Dryander sobre parâmetros inflamatórios: leucócitos totais, polimorfonucleares e mononucleares, na pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.....	54
Tabela 3: Percentagem de inibição da <i>Passiflora alata</i> Dryander (100 mg/kg, i.p.) administrada de 0-4 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, sobre os níveis de leucócitos, polimorfonucleares e mononucleares na pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.....	56
Tabela 4: Correlações entre os diversos parâmetros inflamatórios analisados no lavado da cavidade pleural de animais com pleurisia, tratados previamente com o extrato aquoso de <i>Passiflora alata</i> Dryander na pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.....	66
Tabela 5: Correlações entre os diversos parâmetros inflamatórios analisados no sangue de animais com pleurisia, tratados previamente com o extrato aquoso de <i>Passiflora alata</i> Dryander na pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.....	67
Tabela 6: Percentagem de inibição da <i>Passiflora edulis</i> Sims sobre parâmetros inflamatórios: leucócitos totais, polimorfonucleares e mononucleares, na pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.....	70
Tabela 7: Percentagem de inibição da <i>Passiflora edulis</i> Sims (250 mg/kg, i.p.) administrada de 0-4 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, sobre os níveis de leucócitos, polimorfonucleares e mononucleares na pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.....	72
Tabela 8: Correlações entre os diversos parâmetros inflamatórios analisados no lavado da cavidade pleural de animais com pleurisia, tratados previamente com o extrato aquoso de <i>Passiflora edulis</i> Sims na pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.....	83
Tabela 9: Correlações entre os diversos parâmetros analisados no sangue de animais com pleurisia, tratados previamente com o extrato aquoso de <i>Passiflora edulis</i> Sims na pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.....	84

## RESUMO

**Introdução:** Espécies de *Passiflora* (Passifloraceae) são plantas nativas de áreas tropical e subtropical das Américas (PIO CÔRREA, 1978). Apresentam como compostos majoritários, os flavonóides (PETRY et al., 2001, DE-PARIS et al., 2002). Na medicina popular além de serem usadas por suas propriedades psicotrópicas, são usadas para o tratamento de inflamações, como a da pele e bronquites (GUPTA, 1995, MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000). Estudos demonstraram seus efeitos no Sistema Nervoso Central (SPERONI; MINGHETTI, 1988; DE-PARIS et al., 2002; OGA et al., 1984). Por outro lado, são poucas as investigações farmacológicas sobre suas propriedades antiinflamatórias.

**Objetivos:** No presente estudo, foram avaliados os efeitos dos extratos aquosos da *Passiflora alata* (*Pa*) Dryander e *Passiflora edulis* (*Pe*) Sims, sobre a resposta inflamatória induzida por carragenina, em camundongos. Os parâmetros estudados foram: influxo de leucócitos, exsudação, a atividade da mieloperoxidase (MPO) e adenosina-deaminase (ADA), os níveis de óxido nítrico ( $\text{NO}^x$ ) no exsudato da cavidade pleural. Outros parâmetros analisados foram: o hemograma, a permeabilidade vascular em tecidos, os níveis de proteínas totais na cavidade pleural e soro, e os níveis de proteína-C reativa (PCR) no soro. Todos os parâmetros inflamatórios foram avaliados 4 h após a indução da pleurisia.

**Materiais e métodos:** Os extratos aquosos foram obtidos de folhas secas pelo procedimento de *spray-dried* e foram administrados pela via intraperitoneal (i.p.). Camundongos de ambos sexos, pesando entre 18 e 22g, foram utilizados para pleurisia. A pleurisia foi induzida pela injeção intrapleural de carragenina a 1% e os parâmetros foram avaliados 4 h após a indução da inflamação. Todos os animais foram tratados previamente com solução de azul de Evans (25 mg/kg, i.p.) para análise do exsudato, exceto àqueles experimentos pelo qual, estudou-se as enzimas MPO e ADA,  $\text{NO}^x$ , os níveis de proteínas totais e PCR. Diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas por ANOVA e quando necessário complementado com os testes de Dunnett e *t* de Student. Para as correlações entre as variáveis utilizou-se: regressão linear, testes de Pearson e Spearman.  $P < 0,05$  foi considerado significativo.

**Resultados:** Os resultados demonstraram que a *Pa* foi efetiva em inibir o influxo de leucócitos ( $P < 0,01$ ) para cavidade pleural, devido a uma inibição do influxo de polimorfonucleares ( $P < 0,05$ ). Na avaliação do hemograma foi observado que a *Pa* provocou uma diminuição dos leucócitos ( $P < 0,05$ ), as custas de mononucleares ( $P < 0,05$ ). Além disso, a *Pa* inibiu as enzimas MPO ( $P < 0,01$ ) e ADA ( $P < 0,01$ ) do exsudato pleural e os níveis de PCR ( $P < 0,01$ ) do soro. Em outros experimentos a *Pe*, inibiu a migração de leucócitos ( $P < 0,01$ ) para cavidade pleural, devido a uma inibição do influxo de polimorfonucleares ( $P < 0,05$ ) e mononucleares ( $P < 0,05$ ). Na avaliação do hemograma a *Pe* somente causou alterações significativas na dose máxima avaliada, causando uma diminuição significativa dos leucócitos ( $P < 0,05$ ), as custas de mononucleares ( $P < 0,05$ ). A *Pe* também inibiu as enzimas MPO ( $P < 0,01$ ) e ADA ( $P < 0,01$ ). Além disso, *Pe* inibiu a exsudação ( $P < 0,05$ ) e os níveis de proteínas totais ( $P < 0,01$ ) do exsudato pleural e os níveis de PCR ( $P < 0,01$ ) do soro.

**Conclusão:** Em conjunto, esses resultados indicam evidências dos efeitos antiinflamatórios dos extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims no modelo da pleurisia induzida por carragenina, em camundongos, um



importante modelo para o *screening* e avaliação de compostos com propriedades antiinflamatórias.

**Palavras-chave:** *Passiflora alata* Dryander, *Passiflora edulis* Sims, Inflamação, Pleurisia, Camundongos.

## ABSTRACT

**Introduction:** *Passiflora* species (Passifloraceae) are native to tropical and subtropical areas of the Americas (PIO CORREA, 1978). The majority component of *Passiflora* species is flavonoids (PETRY et al., 2001, DE-PARIS et al., 2002). In the popular medicine the *Passiflora* species have been used as psychotropic agent. They are also used for the inflammation diseases, such as skin inflammation and bronchitis (GUPTA, 1995, MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000). Studies have been demonstrated that these species have important effects in the Central Nervous System (SPERONI; MINGHETTI, 1988; DE-PARIS et al., 2002; OGA et al., 1984). On the other hand, there are rare pharmacological investigations about their anti-inflammatory properties.

**Objective:** In the present study, we investigated the anti-inflammatory effects of *Passiflora alata* (*Pa*) Dryander and *Passiflora edulis* (*Pe*) Sims aqueous extracts, on the inflammatory response induced by Cg, in mice. The parameters studied were: leukocyte influx, exudation, myeloperoxidase (MPO) and adenosina-deaminase (ADA) activities, oxide nitric levels ( $\text{NO}^x$ ) of the fluid leakage from the pleural cavity. Another analysed parameters were: blood leukocytes, vascular permeability in tissues, total proteins in the pleural cavity and serum, and protein-C reactive (CRP) levels in the serum. All inflammatory parameters were evaluated 4 h after pleurisy induction.

**Material and Methods:** The aqueous extracts were obtained from the leaves by spray-dried procedure and administered by intraperitoneal (i.p.) route. Mice of both sexes, weighing between 18 and 22g, were used in this model. The pleurisy was induced by intrapleural injection of 0.1 mL of Cg and the inflammatory parameters were evaluated 4 h after. All animals were previously treated with Evans blue dye (25 mg/kg, i.p.), for exudates analysis, except to those experiments for which, it was studied MPO, ADA,  $\text{NO}^x$  levels, total proteins and CPR. Statistical differences between groups were determined by analysis of variance (ANOVA) and complemented with either Dunnett's or Student *t* tests. To analyse the correlation between the inflammatory parameters it was used regression linear, Pearson and Spearman tests.  $P < 0.05$  was considered significant.

**Results:** The results demonstrated that *Pa* was effective in inhibiting the leukocyte influx ( $P < 0.01$ ) in the pleural cavity, due to polimorfonuclear ( $P < 0.05$ ). To analyze the blood leukocyte it was observed that *Pa* caused a decrease of the leukocyte ( $P < 0.05$ ), due to mononuclears ( $P < 0.05$ ). Furthermore, *Pa* inhibited MPO ( $P < 0.01$ ) and ADA ( $P < 0.01$ ) activities in the pleural cavity and the CPR levels in the serum ( $P < 0.01$ ). In another set of experiments *Pe* inhibited leukocytes migration ( $P < 0.01$ ) into the cavity pleural, due to polimorfonuclears ( $P < 0.05$ ) and mononuclears ( $P < 0.05$ ). Only in the maximum dose *Pe* caused significant decrease of the leukocytes blood ( $P < 0.05$ ), due to a mononuclears ( $P < 0.05$ ). Furthermore, *Pe* inhibited MPO ( $P < 0.01$ ) and ADA ( $P < 0.01$ ) activities. *Pe* also inhibited exudation ( $P < 0.05$ ) and total proteins levels ( $P < 0.01$ ) in the pleural exudate and CPR levels in the serum ( $P < 0.01$ ).

**Conclusion:** Take together; these results indicate evidences of the anti-inflammatory effects of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims aqueous extracts in the mouse model of the pleurisy induced by carrageenan. This model is important for screening and evaluation of new composed with anti-inflammatory properties.

**Key-words:** *Passiflora alata* Dryander, *Passiflora edulis* Sims, Inflammation, Pleurisy, Mice.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 PLANTAS MEDICINAIS

O homem primitivo ao procurar o reino vegetal para o seu sustento, foi descobrindo plantas com efeitos medicinais bem como tóxicos, dando início a uma sistematização empírica de acordo com a sua utilização. Nas mais antigas civilizações já havia indícios do uso de plantas medicinais e tóxicas (POSER; MENTZ, 2003).

No Brasil, estima-se que 25% dos US\$ 8 bilhões do faturamento, em 1996, da indústria farmacêutica nacional sejam originados de medicamentos derivados de plantas. É importante ressaltar, que apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e somente 1.100 espécies vegetais foram estudadas em relação as suas propriedades medicinais (GARCIA et al., 1996 apud NODARI; GUERRA, 2003).

As plantas são uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Pesquisadores na área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato destes produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase que inacreditável de diversidade em termos de estrutura e propriedades físico-químicas e biológicas (WALL; WANI, 1996 apud NODARI; GUERRA, 2003), e vêem nestes compostos de origem natural, uma fonte particularmente promissora de novas moléculas potencialmente úteis para o tratamento de doenças humanas (SANTOS, 1999).

## 1.2 À FAMÍLIA PASSIFLORACEAE

A família Passifloraceae, que foi descrita em 1805 por Antoine Laurent de Jussieu e Augustin Pyramus de Candolle, é composta de cerca de 630 espécies distribuídas em 18 gêneros, compreendendo lianas herbáceas ou lenhosas e arbustos (TAKHTAJAN, 1997). Dentre estes gêneros, encontra-se o gênero *Passiflora* que é composto de cerca de 400 espécies, nativas da América tropical, desde o sul dos Estados Unidos, México até o sul da América do Sul, incluindo o Brasil (PIO CORRÊA, 1978; BLUMENTHAL; GOLDBERG; BRINCKMANN, 2000; DER MARDEROSIAN, 2001).

Diversas espécies desta família são conhecidas em todo o Brasil, sendo as mais cultivadas a *Passiflora alata* (Figura 1) e a *Passiflora edulis* (Figura 2). Além disso, outra espécie extensivamente estudada, a *Passiflora incarnata* L. (BORRELLI et al., 1996), encontra-se descrita nas farmacopéias da Europa (ZUANAZZI, 1999, BLUMENTHAL; GOLDBERG; BRINCKMANN, 2000).

A *Passiflora alata* é uma espécie nativa do Brasil, ocorrendo nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, e também no Paraguai e Peru. Atualmente é encontrada como espécie cultivada em todo o país, sendo a única espécie oficial incluída na Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1977).

A *Passiflora edulis* é originária das Américas do Sul e Central, ocorrendo em todo o Brasil, sendo cultivada em muitas regiões tropicais e subtropicais do mundo devido aos frutos empregados na indústria alimentícia. Esta espécie é subdividida em duas variedades: uma que produz um fruto de cor amarela (*Passiflora edulis* forma *flavicarpa* Deneger), e outra de cor roxo (*Passiflora edulis* Sims) ambas nativas da região Norte e Nordeste do país (SPENCER; SEIGLER, 1983; VALE; LEITE, 1983).

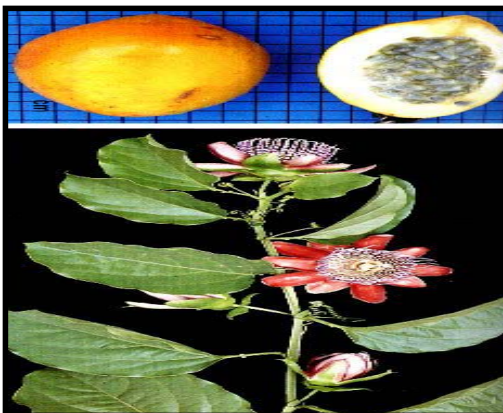


Figura 1: Frutos, folhas e flores de *Passiflora alata* (LORENZI; MATOS, 2002).

As folhas de *Passiflora alata* são utilizadas como calmantes, diuréticas, emenagogas, antinoceptiva e antifebris. As suas raízes são utilizadas popularmente como anti-helmintícas, antiinflamatórias (SIMÕES et al., 1998), sedativas, narcóticas e no tratamento de histerias (MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000). Já as raízes de *Passiflora edulis* são usadas popularmente como sedativas, vermífugas e também no tratamento de histerias (MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000).

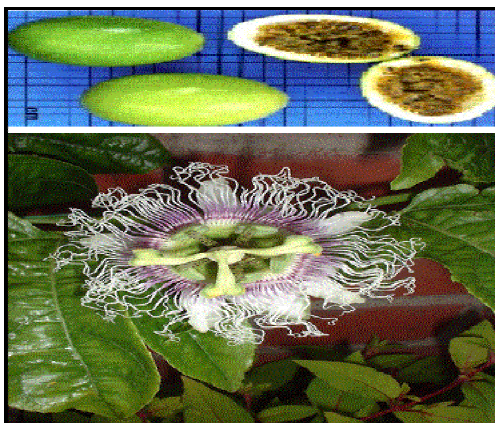


Figura 2: Frutos, folhas e flores de *Passiflora edulis* (LORENZI; MATOS, 2002).

Ainda, destaca-se o uso popular de espécies do gênero *Passiflora* para outros fins, dentre eles: inflamações na pele (D'OLIVEIRA, 1854; MOREIRA, 1862; PIO CORRÊA, 1978; MORS, RIZZINI, PEREIRA, 2000), tratamento de bronquites (MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000), em compressas para queimaduras, hemorróidas, complicações do climatério, desordens de atenção, nervosismo e excitabilidade

pediátrica (DER MARDEROSIAN, 2001), além do tratamento de icterícia, escorbuto e disenteria (GUPTA, 1995; MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000).

### 1.2.1 Constituintes químicos

As espécies de *Passiflora* apresentam diversos constituintes como supostos princípios ativos (PETRY et al., 2001), porém os responsáveis por seus efeitos farmacológicos ainda não foram identificados.

Os flavonóides são os compostos majoritários, representados pelos C-glicosídeos derivados da apigenina e luteolina. Recentes estudos demonstraram teores destas substâncias em uma faixa de 1,9 a 4,6% (PETRY et al., 2001, DE-PARIS et al., 2002).

PETRY e colaboradores (2001), relataram para a *Passiflora alata* uma concentração de flavonóides no extrato alcoólico de 2,90%. Já em 2002, DE-PARIS e colaboradores, demonstraram no extrato aquoso desta mesma espécie uma concentração de flavonóides de 1,90%, sendo que em ambos os estudos, não foram identificados os flavonóides: vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina. Outros constituintes, os alcalóides, também foram encontrados no extrato aquoso de folhas da *Passiflora alata*, em uma concentração de 0,217 mg%, expressos em harmana (OGA et al., 1984). Além destes constituintes, também foram identificados nas folhas de *Passiflora alata* glicosídeos esteroidais e triterpênicos (REGINATTO et al., 2001) além de saponinas (REGINATTO et al., 2004).

Já das partes aéreas da *Passiflora edulis*, foram isolados os flavonóides C-glicosídicos: luteolina-6-C-chinosídeo e luteolina-6-C-fucosídeo (MARECK et al., 1991), vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina tanto no extrato alcoólico (PETRY et al., 2001) como no extrato aquoso (DE-PARIS et al., 2002), sendo que nestas

frações o conteúdo total de flavonóides obtido foi de 4,6% e 4,04%, respectivamente, ambos em relação à planta seca e expressos como apigenina. Além dos flavonóides, também foram identificados nesta espécie: glicosídeos cianogénicos (SPENCER; SEIGLER, 1983; SEIGLER et al., 2002),  $\beta$ -rutinosídeo (CHASSAGNE; CROUZET, 1998), sambugrina e amigdalina (CHASSAGNE et al., 1996), alcalóides indólicos (LUTOMSKI; MALEK, 1975); terpenóides (WINTERHALTER, 1990) e saponinas (YOSHIJAWA et al., 2000).

### 1.2.2 Informações toxicológicas

Estudos da toxicidade para o extrato aquoso de *Passiflora alata* foram realizados, e observou-se que a administração de doses acima de 432 mg/kg, administradas por via intraperitoneal (i.p.), em camundongos, induziram sonolência em todos os animais, caracterizando efeito depressor do Sistema Nervoso Central (SNC). A dose letal 50% (DL50) foi de 456 (421-491) mg/kg (i.p.), com mortes até 24 horas após o tratamento (OGA et al., 1984).

A toxicidade do extrato aquoso da *Passiflora edulis* também foi avaliada em camundongos, em doses variando de 85 a 2740 mg/kg. Nas doses mais elevadas (685, 1370 e 2740 mg/kg) a maioria dos animais apresentou contrações abdominais e distensão das patas posteriores, indicando uma possível irritação da cavidade peritoneal. A DL50 neste estudo foi de 1000 mg/kg (VALE; LEITE, 1983).

Mais recentemente foram avaliados a toxicidade dos extratos aquosos liofilizados de *Passiflora alata* e *Passiflora edulis* (ambos administrados na dose de 800 mg/kg/dia, via oral) em ratas gestantes. Durante toda a gestação, as ratas receberam o extrato aquoso de *Passiflora alata* ou *Passiflora edulis* e foram avaliadas as seguintes variáveis durante toda a gestação: consumo de água,



alimento, massa corporal, contagem dos corpos lúteos e dos sítios de implantação uterina. Os resultados mostraram que o desenvolvimento do feto durante a gestação manteve-se normal nas ratas tratadas com os extratos testados. Além disso, não houve alteração no desenvolvimento físico, sexual e/ou comportamental das ninhadas, nas doses testadas, indicando ausência de toxicidade para ratas tratadas e prole (AMARAL; SCHENKEL; LANGELOH, 2001).

### **1.2.3 Informações farmacológicas**

O efeito terapêutico de muitas plantas medicinais já está bem estabelecido, embora seus mecanismos de ação ainda não estejam muito claros. As plantas medicinais contêm várias substâncias ativas que podem apresentar um efeito sinérgico, tanto farmacodinâmico quanto farmacocinético e por isso, normalmente, há várias hipóteses de mecanismos de ação que justificam a ação terapêutica de seus extratos (WILLIAMSON, 2000; SPINELLA, 2002).

No caso específico das espécies de maracujá estudadas em modelos animais e utilizadas popularmente, principalmente, como depressores do SNC, os constituintes químicos ativos não estão bem definidos, mas há possibilidade de que ocorra sinergismo entre eles (NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 1996; ESCOP, 1997; BLUMENTHAL; GOLDBERG, BRINCKMANN, 2000), o mesmo podendo ocorrer para o desfecho de outros efeitos dentre eles o antiinflamatório, analgésico, antiviral e anticonvulsivante.

Grande parte dos estudos de espécies do gênero *Passiflora* está relacionada à espécie *Passiflora incarnata* e a atividades no SNC (BORRELLI et al., 1996). Entre as atividades avaliadas para diferentes espécies, citam-se: ansiolítica (SOULIMANI et al., 1997; DHAWAN; KUMAR; SHARMA, 2001; PETRY et al., 2001; DE-PARIS et

al., 2002), sedativa (SPERONI; MINGHETTI, 1988) e anticonvulsivante (OGA et al., 1984). Além disso, foram avaliadas as atividades: antitussígena (DHAWAN; SHARMA, 2002 a), inibição da ansiedade decorrente da abstinência alcoólica (DHAWAN; KUMAR; SHARMA, 2002), preventiva da azoospermia, esterilidade e diminuição da libido induzida por álcool e nicotina (DHAWAN; SHARMA, 2002 b) e analgésica (VALE; LEITE, 1983; OGA et al., 1984, SPERONI; MINGHETTI, 1988).

BORRELLI e colaboradores (1996) avaliaram a atividade antiinflamatória do extrato etanólico da *Passiflora incarnata*, em ratos, nos modelos de edema de pata induzido por carragenina, pleurisia induzida por dextran e granulomas induzidos por cróton. Os resultados sugeriram que o extrato testado exibe atividade antiinflamatória significativa nas doses de 125-500 mg/kg, administradas por via oral, nestes modelos experimentais.

Recentemente, PURICELLI e colaboradores (2003) avaliaram in vitro, utilizando um meio de células contendo gelatinase, o efeito inibitório de extratos aquosos de frutos de *Passiflora edulis* (4,32; 7,2; 12 e 20 mg/mL) e *Passiflora foetida* (0,625; 1,25; 2,5 e 5 mg/mL), sobre as proteínas metaloproteases-2 e 9 (MMP-2 e MMP-9), duas metaloproteases envolvidas na invasão de tumores, metástase e angiogênese. Ambos os extratos, em todas as doses testadas, demonstraram efeitos inibitórios dose-dependente, sobre ambas as enzimas MMP-2 e MMP-9, sendo mais eficientes na inibição da MMP-2. O extrato aquoso da *Passiflora foetida* foi mais efetivo em inibir as metaloproteases, quando comparado com o extrato aquoso da *Passiflora edulis*.

Enquanto os efeitos em nível de SNC são extensivamente estudados, pouco se tem avaliado sobre os efeitos antiinflamatórios de espécies de *Passiflora*, tendo em vista que estas, além de apresentarem em suas constituições componentes com

conhecida atividade antiinflamatória, também são utilizadas popularmente para o tratamento de processos inflamatórios. A seguir será apresentada uma revisão sobre processo inflamatório como foco de investigação deste estudo.

### 1.3 O PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é um evento complexo que leva a liberação de fatores solúveis e ativação de células nos tecidos, e pode ser deflagrada por fatores endógenos como necrose tecidual, ou como resposta a estímulos lesivos: traumas, infecções, isquemia e injúria auto-imune (BENJAMIM; COICO; SUNSHINE, 2002).

Normalmente, o processo inflamatório inicia-se com o reconhecimento do agente agressor e direciona-se como uma complexa série de eventos, para uma tentativa de reconstituir o tecido danificado, ou seja, culminando na resolução (ALI et al., 1997). No entanto, se a destruição do agente agressor e o processo de reparo não ocorrem de maneira eficiente e sincronizada, a resposta inflamatória pode levar a uma lesão tecidual persistente induzida pelo acúmulo de leucócitos, colágeno entre outras substâncias que podem ser prejudiciais ao organismo (NATHAN, 2002).

De modo didático, a resposta inflamatória é categorizada em três fases distintas, cada uma delas sendo mediada aparentemente por mecanismos diferentes. Assim, é inicialmente evidenciada uma fase aguda, de duração variável, com alterações vasculares (fluxo/calibre vascular, além de um aumento da permeabilidade vascular), seguida de uma fase subaguda caracterizada por infiltração de leucócitos e de outras células fagocíticas (quimiotaxia/adesão/transmigração e fagocitose) e posteriormente, ocorre regeneração tecidual ou fibrose (SUZUKI et al., 2003).

Inicialmente no foco inflamatório predominam fenômenos vasculares: vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar (CIRINO; FIORUCCI; SESSA, 2003), gerados principalmente pelos seguintes mediadores: histamina, serotonina, leucotrienos, PAF-acéter, C5a, prostaglandinas e substâncias liberadas localmente nas terminações nervosas (taquicininas e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina – CGRP) (HEDQVIST; GAUTAM; LINDBOM, 2000; LECCI et al., 2000). Este aumento da permeabilidade vascular culmina com a saída de um fluido rico em proteínas (exsudato) para o meio extravascular resultando em acúmulo deste, no local da lesão (edema) (PATTERSON; LUM, 2001; LEY, 2002).

Após esta fase inicial, evidencia-se uma fase subaguda que é caracterizada por migração e infiltração de leucócitos e de células fagocíticas, no sítio da lesão. Este evento celular é denominado quimiotaxia (ALI et al., 1997; FRANGOIANNIS; SMITH; ENTMAN, 2002). No local da lesão, os neutrófilos e os macrófagos reconhecem o agente agressor, englobam e o destroem (fagocitose) (RODRIGUES et al., 2002) e liberam enzimas lisossomais na tentativa de destruir o agente agressor (BENJAMINI; COICO; SUNSHINE, 2002). Ainda, no foco inflamatório há a ativação dos mastócitos e agregação plaquetária, que também resultam na liberação de mais mediadores quimiotáticos. Dentre os mediadores quimiotáticos citam-se: os prostanóides ( $\text{PGI}_2$ ,  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGE}_2$  e  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ), derivados da via da lipoxigenase (5 HETE,  $\text{LTB}_4$ ), cininas, substâncias liberadas de neutrófilos ativados, entre outros (TAN; LUSCINSKAS; HOMER-VANNIASINKAM, 1999).

Após o estímulo primário (injúria primária), a resposta inflamatória é caracterizada por uma complexa série de eventos na tentativa de reconstituir o tecido danificado por meio da ativação de células mesenquimatosas (resposta primária), incluindo hipertrofia, hiperplasia e produção de matriz extracelular.

Posteriormente, a injúria inflamatória (injúria secundária) é mantida e induz o processo de cicatrização (resposta secundária) que freqüentemente reconstitui o sítio lesado com tecidos fibroblásticos menos especializados (SUZUKI et al., 2003).

Todas as respostas celulares e vasculares mencionadas anteriormente, que ocorrem na inflamação, são estimuladas por substâncias multifuncionais denominadas mediadores da inflamação (PELAIA et al., 2003).

### **1.3.1 Mediadores do processo inflamatório**

Os mediadores pró-inflamatórios podem ser de origem celular ou plasmática. As cininas, os sistemas: complemento, coagulação e o fibrinolítico fazem parte dos mediadores plasmáticos que estão na forma precursora e necessitam ser ativados para promover os seus efeitos biológicos. As aminas vasoativas (histamina, serotonina), os metabólitos derivados do ácido araquidônico (eicosanóides), as enzimas lisossomais, as metaloproteinases, os radicais livres derivados do oxigênio e o fator ativador de plaquetas (PAF) compõem os mediadores de origem celular que podem ser pré-formados ou sintetizados nas células ativadas, em resposta a um estímulo (BARNES; CHUNG; PAGE, 1998).

#### **1.3.1.1 *Proteases plasmáticas***

As proteases plasmáticas são liberadas pela ativação dos componentes do sistema complemento, das cininas e da coagulação.

O sistema complemento uma vez ativado produz peptídeos pró-inflamatórios como o C3a e o C5a (anafilotoxinas) e ainda o complexo de ataque à membrana (MAC) composto de uma série de proteínas do complemento. Dentre os efeitos biológicos, destacam-se: quimiotaxia de neutrófilos, degranulação celular, contração

da musculatura lisa e aumento da permeabilidade vascular e ainda destruição celular com subsequente morte do antígeno (FISHELSON, 1991 apud SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004, PANGBURN; RAWAL, 2002 apud SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004, COLE; MORGAN, 2003 apud SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

O principal representante do sistema das cininas, a bradicinina, desempenha ações pró-inflamatórias que resultam em aumento do influxo celular e do extravasamento plasmático para o foco inflamatório (PESQUERO et al., 2000; COUTURE et al., 2001; YUHKI et al., 2004).

O sistema de coagulação, que é constituído de uma série de proteínas, não somente é importante para a formação da fibrina, mas também por apresentar efeitos na indução da inflamação. Dentre as proteínas que o constituem, encontram-se a trombina e o fator tecidual VII, que desempenham funções pró-inflamatórias como a indução da produção de citocinas, dentre elas o TNF- $\alpha$ , por células endoteliais e mononucleares (PAWLINSKI et al., 2003 apud SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

### **1.3.1.2 Aminas vasoativas**

As aminas vasoativas mais importantes são a histamina e a serotonina. Estes mediadores encontram-se em estoques formados previamente nas células. A histamina encontra-se principalmente em basófilos e mastócitos, e depois de liberada desempenha suas funções via receptores histaminérgicos (H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> ou H<sub>4</sub>) (SCHNEIDER; ROLLI-DERKINDEREN; AROCK, 2002).

A serotonina (5-HT), que é considerada um dos principais mediadores da dor e da inflamação, é produzida nas células enterocromafins da mucosa gastrointestinal e é absorvida pelas plaquetas, onde se encontra estocada (VOOG et al., 2000).

### **1.3.1.3 Metabólitos do ácido araquidônico**

A cascata do ácido araquidônico é ativada durante a inflamação, resultando na formação dos eicosanóides (FITZGERALD; PATRONO, 2001; SUBONGKOT et al., 2003). O processo inicia-se após a ação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>) que libera o ácido araquidônico (AA) dos fosfolípidos da membrana plasmática celular (SUBBARAMAIAH; DANNEBERG, 2003) com posterior oxidação enzimática por duas vias distintas: via da ciclooxigenase e da lipooxigenase (FITZGERALD; PATRONO, 2001; SUBONGKOT et al., 2003).

A via da ciclooxigenase (COX) é composta por duas enzimas distintas: a COX-1 e a COX-2, as quais originam as prostaglandinas, prostaciclina e os tromboxanos (TXs). A COX-1 é constitutiva e medeia funções homeostáticas. Já a COX-2, em sua forma constitutiva, é encontrada no cérebro e na medula espinhal, pelo qual está envolvida na neurotransmissão, particularmente, da dor e da febre (NEEDLEMAN; ISAKSON 1997), e em sua forma induzida esta enzima é expressa em lesões de caráter inflamatório (SMITH et al., 2000; MORITA, 2002).

Da via da lipooxigenase, originam-se os leucotrienos (LTs) e as lipoxinas (LXA) pela ação das enzimas 5-lipooxigenase (5-LOX) e da 15-lipooxigenase (15-LOX), respectivamente (PARENTE; PERRETTI, 2003).

### **1.3.1.4 Óxido nítrico**

O óxido nítrico é um mediador pleiotrópico da inflamação e é encontrado sob a forma de um gás solúvel produzido não apenas por células endoteliais, mas também por macrófagos e neurônios (NATHAN; XIE, 1994).

Atualmente são conhecidos três diferentes isoformas da enzima NOS: a óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS), a óxido nítrico-sintase neuronal (nNOS), ambas

constitutivas e ativadas fisiologicamente gerando baixas concentrações de NO. Além disso, existe a óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) (NATHAN, 1997; ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001), que é ativada em resposta a estímulos inflamatórios, como por exemplo: citocinas e fatores de crescimento em células alvo que liberam altos níveis de NO durante a inflamação (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; KNOWLES; MONCADA, 1994; WITTE et al., 2002).

A iNOS é regulada, via fator de transcrição nuclear (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001), sendo que esta enzima pode ser induzida em uma variedade de células como macrófagos, células endoteliais, células da musculatura lisa vascular e miócitos cardíacos, após estímulo por lipossacarídeos (LPS), citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6), entre outros (FORSTERMANN; KLEINERT, 1995).

Além disso, o NO quando liberado em altas concentrações e em condições aeróbicas pode ser rapidamente oxidado em espécies reativas de oxigênio como, por exemplo: o peroxinitrito (OONO $^-$ ). Estes metabólitos do NO possuem a capacidade de lesar o DNA e os lipídeos microbianos, e ainda lesar as células vizinhas saudáveis, sendo esse o mecanismo responsável pela maioria dos processos inflamatórios observados em doenças auto-imunes (HULE; PADMAJA, 1993; CUZZOCREA et al., 2000; SZABÓ, 2003).

#### **1.3.1.5 Radicais livres do Oxigênio**

As espécies reativas do oxigênio (EROS) podem ser originadas tanto de fontes ambientais como de células ativadas do processo inflamatório. As EROS causam oxidação de proteínas, do DNA e lipídica, podendo causar injúria por ação direta ou através da geração de metabólitos secundários reativos (RAHMAN; MARWICK; KIRKHAM, 2004).



As EROS apresentam papel especial como moléculas sinalizadoras, contribuindo para injúria celular e processos degenerativos em doenças inflamatórias como, por exemplo, na doença reumática (HENSLEY; ROBINSON; GABBITA, 2000; SCHILLER et al., 2003).

#### **1.3.1.6 Constituintes lisossomais dos leucócitos**

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente principalmente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e também em monócitos (LANZA, 1998).

Após a fagocitose do microorganismo, os neutrófilos induzem o metabolismo oxidativo caracterizado por um intenso consumo de oxigênio. A NADPH oxidase, nas células, converte o oxigênio molecular ( $O_2$ ) em ânion superóxido ( $O_2^-$ ). A seguir, a enzima superóxido dismutase (SOD) converte o  $O_2^-$  em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o qual possui função de destruir bactérias diretamente ou após conversão em íons hidroxila ( $OH^-$ ) ou hipoclorito (HOCl). Dentre estas fontes geradoras do HOCl, encontra-se o sistema  $H_2O_2$ -MPO, no qual a enzima mieloperoxidase reage com o  $H_2O_2$  formado pela ação da NADPH oxidase, culminando na formação da espécie reativa HOCl. O hipoclorito (HOCl) é considerado um potente agente microbicida que possui papel importante na defesa do hospedeiro contra invasão de bactérias, fungos e vírus (NEVE; PARIJ; MOGUILVSKY, 2001; BUT et al., 2002). Além desta ação sobre o  $H_2O_2$ , a MPO pode atuar sobre outros substratos, como a tirosina e o nitrito, formando outros compostos altamente reativos (WINTERBORN; VISSERS; KETTLE, 2000). Contudo, sob certas circunstâncias a liberação excessiva dessas espécies oxidantes podem promover estresse oxidativo e lesão tecidual (GAUT et al., 2001).

A adenosina-deaminase (ADA) é uma enzima liberada principalmente de linfócitos ativados e que participam do metabolismo das purinas catalisando irreversivelmente a deaminação da desoxiadenosina e adenosina em desoxinosina e inosina, respectivamente (GROOTEMAN et al., 2000; KAYACAN et al., 2002).

A adenosina liberada das células ativadas, apresenta efeitos amplos e pleiotrópicos, que estão relacionados com ativação de diferentes tipos de receptores: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> (FREDHOLM et al., 2001).

### **1.3.1.7 Citocinas**

As citocinas são fatores solúveis de pequeno peso molecular, liberadas pelas células para comunicação intercelular e para influenciar a função de outras células por meio da ativação de receptores de superfície (DINARELLO, 2000; OPPENHEIM, 2001; HOLLOWAY; RAO; SHANNON, 2002).

As citocinas são liberadas por grande parte das células do organismo e tem uma variedade de funções (TYSON; CHEN; NOVAK, 2001; HOPKINS, 2003). O efeito biológico depende da citocina e do tipo de célula envolvida. De um modo geral, as citocinas influenciam a ativação, a divisão, a apoptose e a quimiotaxia celular. Elas podem também estar envolvidas na inflamação, na imunidade e no reparo tecidual (PARKIN; COHEN, 2001; HANADA; YOSHIMURA, 2002).

Muitas citocinas tem sido identificadas, mas a interleucina 1 (IL-1), o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), a interleucina 6 (IL-6) e a interleucina 8 (IL-8) são as principais citocinas conhecidas envolvidas na amplificação da resposta inflamatória e regulação do metabolismo das proteínas (FLOCH; MELCHIOR; OBLED, 2004).

### **1.3.1.8 Proteínas de fase aguda da inflamação**

A inflamação e a ativação do sistema imune é caracterizada pela síntese hepática de proteínas específicas cruciais na defesa do organismo, dentre elas as proteínas de fase aguda: fibrinogênio, haptoglobina e a proteína-C reativa (PCR), em estímulo a IL-1 e particularmente a IL-6 (GRUYS; OBWOLO; TOUSSAINT, 1994 apud MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004).

Durante a inflamação, as concentrações de proteínas plasmáticas de fase aguda podem aumentar de 2 a 100 vezes, dependendo: da proteína, da espécie animal e da etiologia da inflamação (agente indutor) (FLOC'H; MELCHIOR; OBLED, 2004).

O fibrinogênio está envolvido na homeostasia, como substrato para formação da fibrina proporcionando o reparo tecidual fornecendo uma matriz para a migração de células relacionadas ao processo inflamatório (THOMAS, 2000 apud MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004).

A haptoglobina no plasma liga-se a hemoglobina livre, que é tóxica e pró-inflamatória (WAGENER et al., 2001) e desta forma reduz o dano oxidativo associado a episódios de hemólise (YANG et al., 2003 apud MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004).

A PCR apresenta importante papel na proteção contra infecções, na depuração do tecido danificado, na prevenção da autoimunização e na regulação da resposta inflamatória (MOLD et al., 2002 apud MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004). Esta proteína, ainda desempenha funções como: ativação da via clássica do sistema complemento, auxilia o processo de fagocitose, induz a produção de citocinas antiinflamatórias (DU CLOS; MOLD, 2001 apud MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004) e ainda inibe a quimiotaxia e o metabolismo oxidativo que ocorre

nos neutrófilos ativados (MORTENSEN; ZHONG, 2000 apud MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004).

Resumidamente, pode-se dizer que a resposta inflamatória envolve a liberação de mediadores e o recrutamento de células, que uma vez ativadas no foco inflamatório liberam mais mediadores (LAWRENCE et al., 2001) e amplificam a resposta frente ao agente invasor.

### **1.3.2 Células envolvidas no processo inflamatório**

Diversas células participam do sistema de defesa do organismo, porém os neutrófilos, fagócitos mononucleares e as células endoteliais desempenham suas funções principalmente na proteção e na manutenção do ambiente biológico interno do organismo. Desta forma, é importante destacar as funções destas populações celulares.

#### **1.3.2.1 Neutrófilos**

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes, constituindo as primeiras células a serem recrutadas (BIASI et al., 2003) e as principais células efetoras na imunidade inata, sendo que seu recrutamento para o tecido inflamado varia de minutos a horas (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003).

A resposta inflamatória mediada por neutrófilos pode ser definida como multifatorial e com várias etapas, envolvendo uma adesão inicial no endotélio ativado, com subsequente extravasamento e transmigração para o foco inflamatório. No local da inflamação, os neutrófilos eliminam os microorganismos estranhos por meio da geração de espécies reativas do oxigênio, pela liberação de substâncias microbicidas e pela fagocitose. Algumas das etapas envolvidas na inflamação

mediada por neutrófilos, são dependentes da liberação de grânulos citoplasmáticos e vesículas secretoras (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003).

Os grânulos citoplasmáticos presentes nos neutrófilos podem ser do tipo: grânulos azurófilos e grânulos secundários. No interior dos grânulos azurófilos encontra-se a enzima denominada mieloperoxidase (MPO), uma protease que gera produtos oxidantes de forte ação microbicida. Outras substâncias que compõem os grânulos azurófilos são os fatores bactericidas (lisozima, defensinas), as hidrolases ácidas e as proteases neutras (elastase, catepsina G, collagenases inespecíficas). No interior do grânulo secundário, dentre outras substâncias encontram-se: a lisozima, a collagenase, a gelatinase, a lactoferrina, a histaminase, a fosfatase alcalina (FA) e o ativador de plasminogênio (ROBBINS et al., 2001). Já as vesículas, são compartimentos intracelulares (SENGELOV; JELDSSEN; BORREGAARD, 1993 apud FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003), constituídas de várias substâncias, dentre elas:  $\beta_2$ -integrina, receptor do complemento-1, a metaloproteinase leucolisina, entre outras substâncias (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003).

### **1.3.2.2 Fagócitos mononucleares**

As células mononucleares são compostas pelos monócitos e macrófagos (monócitos teciduais em sua forma madura), cuja principal função é remover antígenos particulados. Estas células também podem atuar como apresentadoras de antígenos, sendo que, após internalizar o antígeno apresenta-o aos linfócitos T (KIM; KIM; LEE, 2003).

Diferente dos macrófagos, que são células residentes e apresentam variações morfológicas e funcionais conforme o tipo de tecido em que se encontra, os

monócitos são células que migram para vários órgãos e cavidades do corpo, pelo qual podem diferenciar-se em macrófagos (HASHIMOTO et al., 1999).

### **1.3.2.3 Células endoteliais**

O endotélio vascular medeia muitos processos fisiológicos, incluindo a manutenção da superfície antitrombótica entre o sangue circulante e o tecido, regulação do tônus vascular por meio da liberação de agentes vasodilatadores e vasoconstritores e ainda reparo e crescimento tecidual mediados pela angiogênese (KEVIL, 2003). Além do papel fisiológico, o endotélio também apresenta um papel importante durante a resposta inflamatória, controlando a adesão e a transmigração de leucócitos, por meio da expressão de moléculas de adesão (KEVIL, 2003).

### **1.3.3 Moléculas de adesão**

A migração dos leucócitos da circulação sanguínea para o tecido lesado constitui-se de um complexo sistema, formado por inúmeras etapas que envolvem uma seqüência de reações químicas e interações entre moléculas de adesão expressas nos leucócitos e aquelas expressas nas células endoteliais (HEIDE et al., 2002; CONRAN et al., 2003; KEVIL, 2003).

As moléculas de adesão, com base na sua estrutura química, são classificadas em famílias: as selectinas, as integrinas, a superfamília das imunoglobulinas e as caderinas (CROSS; BURY, 2003). As principais famílias das moléculas de adesão, sua localização, sinónimas, proteínas ligantes e seus efeitos estão listadas na tabela 1.

Durante a resposta inflamatória, inicialmente ocorre uma fraca ligação entre os leucócitos circulantes e a parede interna dos vasos (rolamento), mediada pelas

moléculas de adesão denominadas selectinas. Posteriormente, esta adesão torna-se firme em virtude da ação das moléculas de adesão do tipo integrinas e superfamílias das imunoglobulinas. A partir desta adesão firme ocorre a passagem dos leucócitos dos vasos, transmigração endotelial, em direção ao tecido lesado (PANÉS, 1999; MULLER, 2003).

#### **1.3.4 Fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B)**

O fator de transcrição nuclear kappa B é a denominação de uma família de cinco proteínas (c-Rel, RelB, p65/RelA, p50/p105, p52/p100) que se ligam a regiões do ácido desoxirribonucléico (DNA) regulando a expressão de uma variedade de genes envolvidos na resposta imune e na inflamação (BALDWIN, 1996).

O NF- $\kappa$ B, fisiologicamente, encontra-se no citoplasma na sua forma inativa, ligada a proteína inibitória I $\kappa$ B (GHOSH; MAY; KOOP, 1998). A ativação do NF- $\kappa$ B ocorre por meio de estímulos extracelulares como: stress, liberação de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1), endotoxinas de bactérias Gram-negativas como lipopolissacarídeo (LPS), estímulos fisiológicos (NOMURA, 2001; KYRIAKIS; AVRUCH, 2001), reações de oxidação e redução (ZINGARELI; SHEEHAN; WONG, 2003) e por substâncias inflamatórias como carragenina (CRONSTEIN; MONTESINOS; WEISSMANN, 1999; D'ACQUISTO et al., 1999). Após o estímulo, o I $\kappa$ B é fosforilado (através de I $\kappa$ B-quinases), liberando o NF- $\kappa$ B que se desloca até o núcleo onde interage com elementos regulatórios deste fator de transcrição iniciando, desta forma, a transcrição que proporcionará a produção e a liberação de mediadores e outras substâncias que participam da resposta inflamatória (LAWRENCE; GILROY; COLVILLE-NASH, 2001).

Tabela 1: Moléculas de adesão e sua interação celular na resposta inflamatória

<b>INTERAÇÕES ENDOTÉLIO-LEUCÓCITOS-PROTEÍNAS DE ADESÃO</b>				
<b>Moléculas de Adesão</b>	<b>Designação Alternativa</b>	<b>Localização</b>	<b>Ligante</b>	<b>Função</b>
<b>Família das Selectinas</b>				
L-selectina	LAM-1, LECAM-1, MEL-14Ag, CD62L	todos leucócitos	P-selectina, E-selectina, GlyCAM-1, CD34, MAdCAM	Rolamento
P-selectina	PADGEM, GMP-140, CD62P	células endoteliais, plaquetas	L-selectinas, PSGL-1	Rolamento
E-selectina	ELAM-1, CD62E	células endoteliais	L-selectinas, PSGL-1, ESL-1	Rolamento
<b>Família das Integrinas</b>				
A <sub>1</sub> β <sub>2</sub>	CD11a/CD18, LFA	todos leucócitos	ICAM-1, ICAM2	Adesão, Migração
α <sub>M</sub> β <sub>2</sub>	CD11b/CD18, Mac-1	granulócitos, monócitos	ICAM-1, C3bi, fibrinogênio	Adesão
α <sub>x</sub> β <sub>2</sub>	CD11c/CD18	granulócitos, monócitos	VCAM-1, fibronectina	Adesão
A <sub>4</sub> β <sub>1</sub>	CD49d/CD29/ VLA-4	linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos	VCAM-1, fibronectina	Adesão
A <sub>4</sub> β <sub>7</sub>	CD49d/β <sub>7</sub> , LPAM-1	linfócitos, eosinófilos	MAdCAM-1, VCAM-1, fibronectina	Adesão
<b>Superfamília das Imunoglobulinas</b>				
ICAM-1	CD54	endotélio, monócitos	LFA-1, Mac-1, CD43	Adesão, Migração
ICAM-2	CD102	endotélio	LFA-1	Adesão, Migração
VCAM-1	CD106	endotélio	VLA-4	Adesão
PECAM-1	CD31	endotélio, leucócitos, plaquetas	PECAM-1 (homofílico) α <sub>v</sub> β <sub>3</sub>	Adesão, Migração
MAdCAM-1	-	endotélio	(heterofílico) L-selectina, α <sub>4</sub> β <sub>7</sub>	Adesão, Migração

LAM: Molécula de adesão da família das selectinas; LECAM: Molécula de adesão da família das selectinas expressa em todos os leucócitos; MEL-14Ag: Molécula de adesão da família das selectinas expressa em todos os leucócitos; GlyCAM-1: Molécula de adesão da família das integrinas, expressa em vênulas; MadCAM-1: Molécula de adesão da família das imunoglobulinas, expressa em células endoteliais da placa de Peyer; PADGEM: Molécula de adesão da família das selectinas expressa em células endoteliais e plaquetas; GMP-140: Molécula de adesão da família das selectinas expressa em células endoteliais e plaquetas; ELAM: Molécula de adesão da família das selectinas expressa no endotélio; PSGL-1: Ligante das moléculas de adesão P-selectina, expressa em todos os leucócitos; ESL-1: Ligante da molécula de adesão E-selectina; LFA-1: Molécula de adesão da família das integrinas, expressa em todos os leucócitos; ICAM: Molécula de adesão da família das imunoglobulinas; VCAM: Molécula de adesão da família das imunoglobulinas, expressa no endotélio; LPAM-1: Molécula de adesão da família das integrinas, expressa nos linfócitos e eosinófilos; PECAM-1: Molécula de adesão da família das imunoglobulinas, expressa em leucócitos, células endoteliais e plaquetas; VLA-4: Molécula de adesão da família das integrinas, expressas em monócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos. Adaptado de KRIEGLSTEIN; GRANGER, 2001.



Entre os produtos da indução gênica do NF- $\kappa$ B, encontram-se: citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, quemocinas, fatores de crescimento e ainda enzimas que participam da resposta inflamatória como a COX-2, a iNOS (BALDWIN, 1996) e metaloproteinases da matriz (MMPs), importantes substâncias envolvidas na inflamação (NAGASE; WOESSNER, 1999) .

#### 1.4 PLANTAS MEDICINAIS E OS ALVOS TERAPÊUTICOS

O crescente avanço nas técnicas de biologia molecular vem propiciando o melhor conhecimento do processo inflamatório, das moléculas que o constitui e de seus alvos de ações. Diferentemente dos recentes fármacos disponíveis na clínica, é descrito na literatura que muitas plantas medicinais utilizadas em processos inflamatórios, exercem suas atividades antiinflamatórias por mecanismos multifatoriais.

As plantas medicinais apresentam diversos constituintes como supostos princípios ativos, dentre eles, os flavonóides recebem destaque, tendo em vista exibirem uma grande variedade de efeitos em diversos sistemas biológicos (PELZER et al., 1998). Para revisão das atividades biológicas dos flavonóides ver MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES (2000).

Os flavonóides, e as plantas que os apresentam em sua constituição, tem despertado grande interesse na busca de novos fármacos com atividades antiinflamatórias, tendo em vista, que alguns estudos demonstraram que estas substâncias apresentam propriedades antiinflamatórias (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000).

Estudos destacaram os possíveis efeitos antiinflamatórios, dos flavonóides, dentre eles citam-se a inibição: de enzimas pró-inflamatórias como a fosfolipase A<sub>2</sub>

(LEE; MATTELIANO; MIDDLETON, 1982 apud MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000, GIL et al., 1994 apud MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000), a via da ciclooxigenase-1 e/ou ciclooxigenase-2 (SOBOTTKA et al., 2000; CHI et al., 2001; JANG et al., 2002; SAKATA et al., 2003), a via das lipooxigenases (SOBOTTKA et al., 2000; CHI et al., 2001), a óxido-nítrico sintase induzida (MATSUDA, et al., 2003; SAKATA et al., 2003), a elastase de neutrófilos (MELONI et al., 1995 apud MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000) e as metaloproteases de matriz 2 (MMP-2) e 9 (MMP-9) (SARTOR et al., 2002), além da inibição da liberação de mediadores como a histamina (KOTANI; FUJITA; TANAKA, 1999 apud HIGA et al., 2003), as citocinas (HERATH; TAKANO-ISHIKAWA; YAMAKI, 2003; HIGA et al., 2003) e ainda a inibição da expressão de moléculas de adesão como por exemplo, a E-selectina (TAKANO-ISHIKAWA; GOTO; YAMAKI, 2003), além do NF- $\kappa$ B (SINGH et al., 2002).

### 1.5 MODELOS DE INFLAMAÇÃO

Diversos modelos de inflamação, utilizando animais de diferentes espécies, têm sido utilizados para avaliar compostos com potencial atividade antiinflamatória e seus mecanismos de ação. Esta diversidade de modelos deve-se ao fato, que apesar da maioria das reações inflamatórias apresentarem características comuns, sua etiologia e manifestações clínicas diferem significativamente, necessitando, portanto, de modelos mais específicos que reproduzam as suas características básicas.

Protocolos experimentais pelo qual o processo inflamatório é induzido agudamente são utilizados para estudos desta reação, abordando entre outros, a

participação de mediadores químicos, diferentes tipos celulares, possibilitando o *screening* de compostos com potencial atividade antiinflamatória.

Entre os métodos para o estudo do processo inflamatório e para o *screening* de novos fármacos, citam-se: pleurisia, indução de edema de pata, bolsa de ar no dorso, artrite e implantes de esponjas embebidas com agentes irritantes no subcutâneo (SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1985). No entanto, a limitação de algumas destas técnicas se deve tanto à dificuldade de manipulação durante a indução inflamatória, quanto à da quantificação dos parâmetros envolvidos (edema, número de células acumuladas no sítio inflamatório, extravasamento de proteínas, etc).

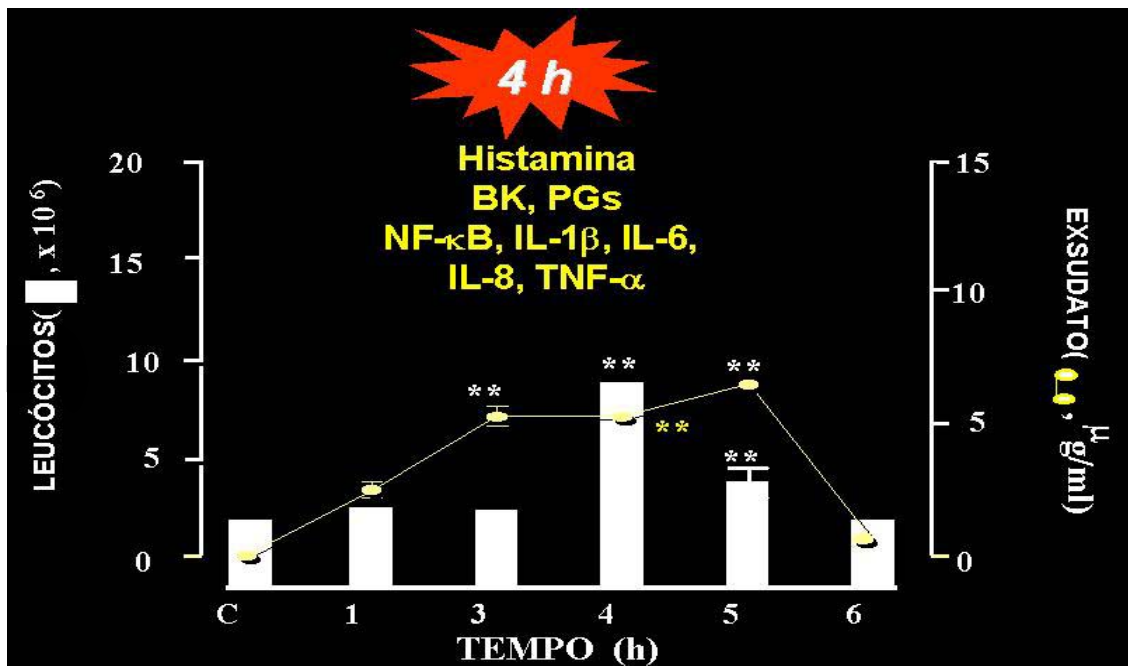
O modelo da pleurisia que foi originalmente desenvolvido em ratos (SPECTOR, 1956) e mais tarde reproduzido em cobaias (SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1985), possibilita uma avaliação não só do extravasamento de líquido como da migração de células (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996; DALMARCO; FRÖDE; MEDEIROS, 2002) e ainda a avaliação da participação de outros mediadores como: citocinas, enzimas e outros mediadores químicos induzidos por diversos agentes flogísticos.

Admite-se que o sítio primário da inflamação na cavidade pleural seja a microvasculatura subpleural, local onde se iniciará a exsudação e o influxo de células inflamatórias. A partir do processo inflamatório, induzido experimentalmente na cavidade, ocorre acúmulo de líquido, o qual pode apresentar características de exsudato, com ou sem fibrina, ou transudado. Os mediadores envolvidos neste tipo de inflamação são liberados por células residentes ou por aquelas que migram para o local do processo inflamatório.

Dentre os agentes flogísticos que podem ser usados para indução do processo inflamatório cita-se a carragenina, obtido de algas marinhas, que uma vez

injetado na cavidade pleural, produz uma resposta inflamatória bifásica no modelo da pleurisia em camundongos. A primeira fase, ou fase inicial ocorre 4 h após a administração da carragenina na cavidade pleural dos animais (Figura 3), e a segunda fase, também denominada tardia ocorre 48 h após (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996).

Num contexto geral, a inflamação aguda assume características peculiares, na qual tipicamente há formação de um exsudato rico em proteínas com migração de células do tipo polimorfonucleares (SPLETTSTOESSER; SCHUFF-WERNER, 2002 apud SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; CARRAWAY et al., 2003). Este evento ocorre também na fase inicial (4 h) da pleurisia induzida por carragenina, na qual existe um aumento de exsudação na cavidade pleural, com influxo predominante de células do tipo polimorfonucleares. Nesta fase inicial de inflamação, a qual foi utilizada como foco de estudo, cabe destacar a participação de alguns mediadores, tais como: IL-6 (CUZZOCREA et al., 1999, FRÖDE; SOUZA; CALIXTO, 2002), bradicinina (SALEH et al., 1998; SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1999), histamina (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1999), óxido nítrico (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1999, CUZZOCREA et al., 2000; ROSSI et al., 2003), prostanóides (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1999), além das enzimas relacionadas ao processo inflamatório: mieloperoxidase, adenosina-deaminase (FRÖDE; MEDEIROS, 2001), 5-lipooxigenase (CUZZOCREA et al., 2003) e das ciclooxigenases (COXs) (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1999) e ainda de proteínas que regulam a transcrição de genes pró-inflamatórios, mais precisamente o NF- $\kappa$ B (FRÖDE-SALEH; CALIXTO, 2000).



**Figura 3:** Resposta inflamatória no modelo da pleurisia induzida 4 horas após a indução pela carragenina, em camundongos. BK: bradicinina; PGs: prostaglandinas; NF-κB: fator de transcrição nuclear kappa B; IL-1β: interleucina 1 beta; IL-8: interleucina 8; TNF-α: fator de necrose tumoral alfa e LTD<sub>4</sub>: leucotrieno D<sub>4</sub>. Adaptado de SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996.

Portanto, a escolha deste modelo foi baseada nas evidências já comentadas, as quais o aferem, ampla utilidade no estudo de processos inflamatórios agudos e ainda uma grande vantagem como modelo experimental para o *screening* e estudo de substâncias com potenciais efeitos antiinflamatórios.

## 2. JUSTIFICATIVA

Ao se considerar perspectiva de obtenção de novos fármacos, dois aspectos distinguem os produtos de origem natural dos sintéticos: a diversidade molecular e a função biológica. A diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivadas dos processos de síntese, que apesar dos avanços consideráveis, ainda é limitada. Além disso, como produtos de organismos que possuem muitas similaridades com o metabolismo dos mamíferos, os produtos naturais exibem muitas vezes propriedades adicionais às antimicrobianas a ele associadas (NISBET; MOORE, 1997 apud NODARI; GUERRA, 2003).

O interesse em terapias alternativas e no uso terapêutico de produtos naturais tem sido crescente, especialmente aqueles derivados de plantas (GOLDFRANK et al., 1982 apud RATES, 2001; VULTO; SMET, 1988 apud RATES, 2001; MENTZ; SCHENKEL, 1989 apud RATES, 2001) para os mais diversos fins, dentre eles, para o tratamento de doenças inflamatórias.

A inflamação que é resultado de um complexo processo fisiopatológico, que inclui desde alterações vasculares, ativação de células até a sensibilização e ativação da nocicepção, envolve uma grande variedade de moléculas, e desta forma apresenta muitos alvos para ação de compostos com atividades antiinflamatórias (SAFAYHI; SAILER, 1997). Desta forma também é fácil compreender porque o tratamento de doenças inflamatórias é bastante diversificado, e ainda, o porque da busca de novos fármacos para o tratamento desta enfermidade.

O potencial do uso de plantas como fonte de novos fármacos ou mesmo para fins medicinais tem sido pouco explorado. Segundo PAYNE e colaboradores (1991), apud RATES (2001), é estimado que de 250.000 a 500.000 espécies de plantas,

somente uma pequena porcentagem são investigadas em relação a sua fitoquímica e propriedades farmacológicas, sendo estimado que cerca de 5000 espécies foram estudadas para uso medicinal. Um importante e decisivo passo do estudo farmacológico, diz respeito à seleção de uma planta (RATES, 2001).

Dentre as estratégias usadas para seleção do material botânico para estudo, encontram-se: a observação do uso na medicina popular em diferentes culturas, a baseada na composição química, filogenética ou informações taxonômicas, sendo que certas famílias e gêneros, apresentam semelhanças na constituição, em classes químicas definidas com atividades farmacológicas já demonstradas. Outras formas de seleção de plantas para estudo baseiam-se: na toxicidade, tendo em vista que o estudo de plantas tóxicas é promissor para obtenção de fármacos altamente potentes e específicos, também a seleção pela observação do ambiente, sendo esta forma promissora, principalmente, para obtenção de fármacos antibacterianos. Ainda, dentre estratégias que podem auxiliar nesta seleção do material botânico para estudo, encontram-se: a pesquisa em banco de dados e literaturas específicas, e finalmente, uma forma que utiliza uma combinação de muitos critérios neste processo seletivo (HAMBURGER; HOSTETTMAN, 1991 apud RATES, 2001, GOTTLIEB; KAPLAN, 1993 apud RATES, 2001; SOUZA BRITO, 1996 apud RATES, 2001, WILLIAMSON; OKPAKO; EVANS, 1996 apud RATES, 2001).

A seleção das espécies, *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims, foi baseada na combinação de vários critérios. Neste contexto, a família Passifloraceae, a qual é amplamente difundida por suas atividades no SNC, tem sido também utilizada na medicina popular para o tratamento de processos inflamatórios, tais como: inflamações da pele (D'OLIVEIRA, 1854; MOREIRA, 1862; PIO CORRÊA, 1978; MORS, RIZZINI, PEREIRA, 2000), bronquites (MORS, RIZZINI, PEREIRA,

2000), hemorróidas e queimaduras (DER MADEROSIAN, 2001). Estudos indicaram a presença de flavonóides (PETRY et al., 2001, DE PARIS, et al., 2002), compostos com propriedades antiinflamatórias amplamente demonstradas (PELZER et al., 1998; SOBOTTKA et al., 2000; CHI et al., 2001; JANG et al., 2002; SAKATA et al., 2003, UEDA et al., 2004), e ainda segundo BORRELLI e colaboradores (1996) a evidência de efeitos antiinflamatórios para uma espécie do gênero, a *Passiflora incarnata*.

Além das evidências seletivas anteriormente citadas, cabe destacar que as espécies estudadas, a *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims, são plantas nativas do Brasil, sendo que, dentre estas se apresenta à única espécie do gênero *Passiflora* descrita na FARMACOPÉIA BRASILEIRA (1977), a *Passiflora alata* Dryander.

Neste contexto, as características do gênero *Passiflora*, tais como: uso popular como antiinflamatório, constituição química informando a presença de flavonóides, e ainda a demonstração de importantes efeitos antiinflamatórios por parte de um membro da espécie, a *Passiflora incarnata*, creditam e embasam a avaliação das propriedades antiinflamatórias das espécies *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims, em modelos experimentais.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito antiinflamatório dos extratos aquosos da *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims, na resposta inflamatória induzida por carragenina no modelo da pleurisia, em camundongos.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos antiinflamatórios dos extratos aquosos da *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims, administrado por via intraperitoneal (i.p.) sobre a migração dos leucócitos no lavado pleural e seus níveis no sangue de animais com pleurisia;
- Avaliar o efeito antiinflamatório dos extratos aquosos sobre a exsudação na cavidade pleural e em tecidos de animais com pleurisia (permeabilidade vascular);
- Avaliar o efeito dos extratos aquosos, sobre as concentrações de mieloperoxidase (MPO), adenosina-deaminase (ADA) e nitrato/nitrito (NO<sup>x</sup>), na cavidade pleural de animais com pleurisia;
- Avaliar o efeito dos extratos aquosos, sobre os níveis de proteínas totais no exsudato e no soro de animais com pleurisia;
- Avaliar o efeito dos extratos aquosos, sobre os níveis de proteína-C reativa no soro de animais com pleurisia;
- Correlacionar os parâmetros inflamatórios estudados nas amostras de exsudato e soro de animais inflamados e tratados com os extratos aquosos da *Passiflora alata* Dryander ou *Passiflora edulis* Sims.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 Material Botânico

Os procedimentos referentes à obtenção e a caracterização dos extratos aquosos da *Passiflora alata* Dryander e da *Passiflora edulis* Sims avaliados neste trabalho foram desenvolvidos na Faculdade de Farmácia, no Departamento de Produção de Matéria-Prima da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, sob coordenação dos professores Dra. Grace Gosmann e Dr. Eloir Paulo Schenkel.

##### 4.1.1.1 Coleta e identificação

As folhas de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims foram coletadas no Estado do Rio Grande do Sul, nas cidades de Monte Negro e Capão da Canoa, respectivamente.

As identificações dos espécimes coletados foram realizadas por Sérgio Bordignon (Centro Universitário La Salle, Canoas, Rio grande do Sul) e Marcos Sobral (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul). Exsicatas estão depositadas no Herbário do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo (UPF) em Passo Fundo, Rio Grande do Sul, com a numeração RSPF 7232 (*Passiflora alata* Dryander) e no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, com a numeração ICN 114356 (*Passiflora edulis* Sims).

#### 4.1.1.2 Preparação dos extratos

As folhas de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims foram secas em estufa de ar circulante a 40°C por 14 dias. Os procedimentos foram os mesmos para ambas as espécies, sendo que em 200 g de folhas secas e trituradas, foram adicionados 2000 mL de água destilada (proporção planta solvente, 1:10 peso/volume) e mantidos sobre refluxo durante 1 hora. Os extratos obtidos foram filtrados e submetidos ao processo de secagem em torre de aspersão (*spray-dried*), sem adjuvantes, no Mini Spray-dryer Büchi 190 (Labortechnik, Flawil, Switzerland). As condições de *spray-dried* usadas na preparação do extrato foram realizadas de acordo com os trabalhos descritos por DE SOUZA e colaboradores (2000). Os extratos foram caracterizados por cromatografia em camada delgada (CCD) pelo qual foram identificadas um perfil de flavonóides e saponinas. Os resultados obtidos em relação a este perfil, estão descritos nos trabalhos publicados por DE SOUZA e colaboradores (2000) e DE-PARIS e colaboradores (2002).

#### 4.1.2 Fármacos e reagentes

Neste estudo utilizaram-se as seguintes substâncias e reagentes: extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil); carragenina (grau IV) (C-3889), o-dianisidina 2HCl (3,3'-dimetoxibenzidina) (D-3252), *Escherichia coli* (E.C.ATCC 25922), mieloperoxidase de neutrófilos humanos (MPO: 20 U/mg de proteína; 1 unidade de MPO é definida como a atividade da enzima capaz de oxidar 1 µM de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por minuto à 25°C (M-6908), sulfanilamida (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S) (S-9251), tartarato duplo de sódio e potássio (ácido tartárico) (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>K<sub>2</sub>) (T-6897), dodecilsulfato de sódio (SDS) (L-6026), Folin 2 N (F-9252)

(Sigma, St Louis, MO, E.U.A); heparina (Liquemine®, Roche, São Paulo, SP, Brasil), fosfato de sódio hidratado, ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), formamida ( $\text{CH}_3\text{NO}$ ), sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4$ ) (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); fosfato de hidrogênio dissódico dodecahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), fenol, ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ ) (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); nitroprussiato de sódio ( $\text{C}_5\text{FeN}_5\text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), nitrato ( $\text{NO}_2$ ), nitrito ( $\text{NO}_3$ ), dihidrocloreto de N-(1-naftil)-etilenodiamina ( $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2$ ) (Merck, Armstard, Alemanha); adenosina ( $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$ ) (Fluka, Ronkonkoma, NY, E.U,A); hidróxido de sódio (NaOH) (DAKO, Carpinteria, Califórnia, E.U.A), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 30%), sulfato de amônio ( $\text{NH}_3\text{SO}_4$ ), ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) (Nuclear, Diadema, São Paulo, Brasil); ácido etilenodiaminotetracético (E.D.T.A), Giemsa (Laborclin, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil); azida sódica (Riedel-de Hänen, Alemanha), álcool etílico (Synth, Barueri, São Paulo, Brasil), sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil), azul de Evans ( $\text{C}_{34}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_{14}\text{S}_4\text{Na}_4$ ), formato de amônio ( $\text{CH}_5\text{NO}_2$ ) (ACROSS-Organics, New Jersey, E.U.A), éter etílico ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ ) (Dinamica, São Paulo, São Paulo, Brasil), May-Grunwald (Newprov, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil), PBS (pH 7,6: NaCl 137 mM, KCl 2 mM e tampão fosfato 10 mM) (Hemagen diagnostics, Columbia, Maryland, U.S.A.), Proteína-C reativa (PCRTEST) (Doles, Goiânia, Goiás, Brasil), carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (MicroBioquímica, Lorena, São Paulo, Brasil), solução salina estéril (NaCl 0.9%) e padrão de proteínas de diferentes fontes comerciais.

No dia dos experimentos, os extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims foram dissolvidos em solução salina estéril, à temperatura ambiente.

## 4.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos albinos suíços com 1 a 2 meses de idade, de ambos os sexos, pesando entre 18-25 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro (luz natural) e acondicionados em gaiolas de plástico (40 x 32 cm), sob temperatura ambiente (25°C), com livre acesso à água e ração (dieta comercial).

Os experimentos foram realizados entre 8 e 18 h e foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratório (ZIMMERMANN, 1983) e normas estabelecidas pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo número: 241/CEUA e cadastro número: 23080.014622/2003-29/UFSC) (Anexo 1).

## 4.3 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO

A anestesia foi induzida com pentobarbital (25 mg/kg) administrados por via intraperitoneal, a fim de possibilitar a administração da solução corante de azul de Evans (25 mg/kg, i.v., intraorbital) com o objetivo de avaliarmos posteriormente a exsudação.

## 4.4 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Os animais foram sacrificados com *overdose* de pentobarbital, tendo em vista que a eutanásia dos camundongos por deslocamento cervical não é possível, uma vez que na execução deste procedimento ocorre o sangramento para a cavidade pleural, o que inviabiliza a metodologia da pleurisia.

## 4.5 MÉTODOS

### 4.5.1 Modelo de inflamação utilizado

- ***Pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos***

Os experimentos foram realizados de acordo com os procedimentos descritos previamente (HENRIQUES et al, 1993; FRÖDE; MEDEIROS, 2001; DALMARCO; FRÖDE; MEDEIROS, 2002).

No dia da indução da pleurisia, os animais foram anestesiados com pentobarbital (25 mg/kg, i.p.) e 0,1 mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) ou do agente flogístico carragenina (Cg, 1%), foi administrado na cavidade pleural direita através do espaço intercostal utilizando-se de uma agulha 13x5 mm e cânula de poliestireno.

De acordo com cada protocolo experimental, após a administração do agente flogístico ou da solução salina estéril, os animais foram sacrificados em diferentes intervalos com *overdose* de pentobarbital. A seguir, foram fixados em mesa cirúrgica, em declive de 30° a 45°, sendo feita uma incisão transversal na pele e nos músculos abdominais. Em seguida, o apêndice xifóide foi pinçado e através de duas incisões paralelas ao longo do esterno, a cavidade pleural foi exposta. Imediatamente, a cavidade pleural foi lavada com duas alíquotas de 0,5 mL (totalizando 1 mL) de solução salina tamponada (PBS - pH 7,6) e heparinizada (20 UI/mL). Alíquotas do lavado pleural foram coletadas com auxílio de pipeta automática para a quantificação dos números total e diferencial de células.

De acordo com o protocolo experimental, uma hora antes dos experimentos, diferentes grupos de animais foram tratados com solução de azul de Evans (25 mg/kg, 0,2 mL/animal, i.v.), para posterior determinação indireta do grau de exsudação na cavidade pleural (FRÖDE; MEDEIROS, 2001; DALMARCO; FRÖDE;

MEDEIROS, 2002). As possíveis variações sobre os índices de permeabilidade vascular, no pulmão, no coração, no fígado, no baço e nos rins foram também estudadas utilizando-se o mesmo protocolo experimental.

#### **4.5.2 Técnicas utilizadas**

##### ***4.5.2.1 Contagem total e diferencial dos leucócitos na cavidade pleural e no sangue total***

No dia dos experimentos, após sacrifício dos animais e abertura das cavidades, alíquotas do lavado pleural (200  $\mu$ L) 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 400 vezes). Esfregaços celulares foram realizados para contagem diferencial dos leucócitos. Após o preparo dos esfregaços em citocentrífuga (Wescor-Cytopro, Logan, Utah, E.U.A.), estes 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.

Em alguns experimentos, os animais foram levemente anestesiados com pentobarbital (25 mg/kg, i.p.) e as amostras de sangue total foram coletadas através de punção cardíaca em tubo contendo anticoagulante (ácido etilenodiaminotetracético: E.D.T.A. 10%).

Os resultados foram expressos em número total de células ( $\times 10^6$ ).

- ***Coloração dos esfregaços celulares utilizando-se o corante May-Grünwald-Giemsa***

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 do lavado pleural foram centrifugadas utilizando-se citocentrífuga (Wescor-Cytopro, Logan, Utah, E.U.A.) e colocadas em posição horizontal, em suporte de coloração apropriado. Após a secagem destas lâminas, 1 mL do corante May-Grünwald foi adicionado e mantido em contato com o sedimento fixado na lâmina por 2 minutos. A seguir adicionou-se água destilada (1 mL) nas lâminas, com auxílio de pipeta com capacidade de 1 mL. Após 3 min de incubação, o corante foi retirado e adicionou-se 1 mL de corante Giemsa (diluído 1:20, em água destilada), 15 min. A seguir, o corante foi escorrido e as lâminas foram lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente.

Os resultados foram expressos em número total de polimorfonucleares ou de mononucleares ( $\times 10^6$ ).

#### ***4.5.2.2 Determinação do exsudato na cavidade pleural***

Nos animais submetidos à pleurisia induzida pela carragenina, após a lavagem das cavidades pleurais com solução PBS heparinizado, uma alíquota (500  $\mu$ L) foi separada e congelada em freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) para posterior determinação dos níveis de azul de Evans. No dia dos experimentos, amostras de um mesmo protocolo experimental foram descongeladas à temperatura ambiente e as concentrações do corante foram determinadas em leitor de Elisa (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, E.U.A.), por leitura da densidade ótica, em comprimento de onda 620 nm. Para quantificação dos níveis de azul de Evans, curvas-padrão com



concentrações previamente conhecidas do corante (0,1-50  $\mu\text{g/mL}$ ) tiveram as densidades óticas determinadas, e formulou-se uma equação da reta.

Os valores das concentrações de azul de Evans, no lavado pleural foram expressos em  $\mu\text{g/mL}$ .

#### ***4.5.2.3 Determinação da permeabilidade vascular em tecidos (pulmão, coração, baço, fígado e rins)***

Para avaliar a permeabilidade vascular em diferentes órgãos, inicialmente foram determinados os respectivos pesos (pulmão, coração, baço, fígado e rim) em gramas. Depois de repetidas lavagens, em solução PBS e remoção dos tecidos adjacentes, os tecidos foram cortados em fatias, picotados e transferidos para tubos de ensaio contendo 2 mL de solução de formamida P.A. As amostras foram incubadas em banho-maria (45°C) durante 72 h para posterior quantificação dos níveis de azul de Evans. Decorrido o período de incubação, os tubos de ensaio foram centrifugados (50 x g, por 15 min) e os sobrenadantes foram transferidos para cubetas para determinação das concentrações do azul de Evans, que foi realizada segundo a metodologia descrita no modelo da pleurisia (FRÖDE; MEDEIROS, 2001; DALMARCO; FRÖDE, MEDEIROS, 2002).

Os valores das concentrações de azul de Evans em tecidos foram expressos em  $\mu\text{g/g}$  de tecido úmido.

#### ***4.5.2.4 Determinação dos níveis de mieloperoxidase (MPO) no lavado pleural***

Neste grupo de experimentos, os animais não foram previamente tratados com o corante azul de Evans. Imediatamente após o sacrifício dos animais, amostras do lavado pleural de camundongos injetados com solução salina estéril (NaCl 0,9%),

tratados com carragenina (1%), indometacina (10 mg/kg, i.p.) ou extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander ou *Passiflora edulis* Sims, foram coletadas e imediatamente quantificadas as concentrações de mieloperoxidase. Volumes de 40  $\mu$ L do lavado ou do padrão (Mieloperoxidase de neutrófilos humanos (0,7-140 mU/mL)) foram transferidos para cubetas e a reação bioquímica iniciada com a adição de 360  $\mu$ L de meio tampão (0,167 mg/mL de o-dianisidina 2HCl e 0,0005% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Após 15 min de incubação, à temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida com a adição de 30  $\mu$ L de azida sódica (1%) (RAO et al., 1993). A seguir, as amostras foram centrifugadas (50 x g, por 5 min) e o sobrenadante transferido para cubetas, para posterior leitura das densidades óticas (450 nm) em leitor de Elisa (Organon- Tecknica, Roseland, New Jersey, E.U.A.). Curvas-padrão com concentrações conhecidas da mieloperoxidase (0,7-140 mU/mL) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos

Os valores da MPO no lavado pleural foram expressos em mU/mL, com o auxílio da equação da reta.

#### **4.5.2.5 Determinação dos níveis adenosina-deaminase (ADA) no lavado pleural**

Neste grupo de experimentos, os animais não foram previamente tratados com o corante azul de Evans. Inicialmente foi preparado uma solução com concentração conhecida (volume final 2500  $\mu$ L) de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (35 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O (15 mM) e NH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub> (15 mM), com a finalidade de ser utilizada como padrão (20 U/L). Amostras do fluido pleural (20  $\mu$ L) foram transferidas para cubetas e a reação enzimática iniciou-se com a adição da solução de adenosina fosfato (pH 6.5, 500  $\mu$ L, composição: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (35 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O (15 mM) e adenosina (0,5

mM)). Após período de incubação de 1 h a 37°C, a reação enzimática foi bloqueada pela adição da solução (1000 µL) de fenol (1 mM), nitroprussiato (0,17 mM) e tampão fosfato (1000 µL: NaOCl: 11 mM) (GIUSTI; GALANTI, 1984). Esta solução também foi adicionada as cubetas contendo concentrações diferentes das amostras padrão (volume final 2500 µL). As absorbâncias das amostras foram lidas em 620 nm em leitor de Elisa (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, E.U.A.).

A quantificação dos valores de ADA no fluido pleural foram expressos em U/L, com auxílio da equação da reta.

#### **4.5.2.6 Determinação dos níveis de nitrito/nitrato (NO<sup>x</sup>) no lavado pleural**

O óxido nítrico foi quantificado pela formação de seus metabólitos nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), utilizando-se a reação de Griess (GREEN et al., 1982; DI ROSA et al., 1996). Neste grupo de experimentos, os animais não foram previamente tratados com o corante azul de Evans. As amostras do lavado da cavidade pleural de camundongos tratados com solução salina estéril (NaCl 0,9%), carragenina, indometacina ou extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander ou *Passiflora edulis* Sims, foram coletadas, armazenadas em frascos *Eppendorf* e estocadas em freezer a -20°C. No dia dos experimentos, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e foram desproteinizadas adicionando-lhes hidróxido de sódio (2,5 N) e sulfato de zinco (0,6%). A seguir, 300 µL do lavado da cavidade pleural foi diluído em uma solução contendo formato de amônio (30 µL), fosfato de sódio (30 µL) e suspensão de *Escherichia coli* (EC ATCC 25922 (30 µL): diluída (1:10) em tampão PBS (pH 7,2). A solução foi incubada durante 2 h, em estufa à 37°C, e a seguir, centrifugada (50 x g, por 5 min). Cerca de 250 µL do sobrenadante foi transferido para uma cubeta, onde o mesmo volume de solução de Griess:

sulfanilamida (1%) (peso/volume), ácido fosfórico (5%) (vol/vol) e N-(1-naftil) etilenodiamina (0,1%) (peso/volume) foi adicionado e incubado durante 10 minutos, à temperatura ambiente.

A reação de  $\text{NO}_2^-$  com esse reagente produz uma coloração rósea, que foi quantificada através da medida das densidades óticas em leitor de Elisa (Organon - Technica, Roseland, New Jersey, E.U.A.) em 540 nm. Curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas de  $\text{NO}_2^-$  (0-150  $\mu\text{M}$ ) também tiveram as densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores de nitrito/nitrato no exsudato, em  $\mu\text{M}$ , com auxílio da equação da reta.

#### **4.5.2.7 Determinação dos níveis de proteínas totais no exsudato e no soro**

Para a determinação dos níveis de proteínas totais utilizou-se o método de Lowry modificado por PETERSON (1977).

As amostras de exsudato e de soro de camundongos injetados com solução salina estéril (NaCl 0,9%), tratados com carragenina (1%), indometacina (10 mg/kg, i.p.) ou extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander ou *Passiflora edulis* Sims, foram obtidos por lavagem da cavidade pleural com PBS heparinizado. As amostras de soro foram obtidas a partir da separação do sangue total coletado por punção cardíaca sem anticoagulante, após centrifugação (50 x g, por 5 minutos).

O reativo de Lowry e Folin 0,4 N foram preparados no dia do experimento. O Reativo Lowry é composto de: solução de CTC (Cobre 0,1%, tartarato duplo de sódio e potássio 0,2%; carbonato de sódio 10% e água), SDS (dodecilsulfato de sódio – 10%) e hidróxido de sódio (NaOH 1 N) numa proporção de 2,5 mL/,5 mL/2 mL : q.s.p 10 mL de água deionizada (CTC:SDS:NaOH q.s.p 10 mL água). A solução de Folin 0,4 N foi obtida através da diluição do reativo de Folin 2 N na proporção 1:5

em água deionizada.

A dosagem de proteínas totais utilizando-se o método de Lowry modificado, consiste em duas etapas. Em uma primeira, em tubos de ensaio adicionou-se 780  $\mu\text{L}$  de água deionizada seguido de 20  $\mu\text{L}$  de exsudato (puro) ou soro (diluído 1:10 em água deionizada), acrescido de 800  $\mu\text{L}$  do reativo de Lowry. Esta mistura foi agitada imediatamente em vórtex. Após esta etapa a solução permaneceu em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 400  $\mu\text{L}$  da solução de Folin 0,4 N, agitando-se a mistura em vórtex. Nesta segunda etapa, a incubação foi de 30 minutos a temperatura ambiente e no escuro.

Curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas de proteínas totais de soro padrão humano (1-100 mg/mL) também tiveram suas densidades óticas determinadas permitindo a quantificação dos valores de proteínas totais, em mg/mL, com auxílio da equação da reta. Paralelamente, grupos-controle foram também analisados, nas quais adicionou-se 800  $\mu\text{L}$  de água deionizada, 800  $\mu\text{L}$  de Reativo de Lowry e 400 da solução de Folin 0,4 N). Esta mistura, denominada de branco foi incubada conforme procedimento descrito anteriormente.

As determinações foram realizadas em espectrofotômetro (Micronal Compu-espectro B 385, São Paulo, São Paulo, Brasil), em 750 nm, à temperatura de 25°C.

#### **4.5.2.8 Determinação dos níveis de Proteína-C reativa (PCR) no soro**

Os níveis de proteína-C reativa (PCR) foram quantificados utilizando-se o sistema para determinação qualitativa e semi-quantitativa da PCR no soro (PCRTEST, Doles, Goiânia, Brasil). Este método consiste na aglutinação visível de uma suspensão aquosa de partículas de látex adsorvidas com anticorpos anti-PCR, na presença da PCR no soro.

Amostras do soro de camundongos injetados com solução salina estéril (NaCl 0,9%), tratados com carragenina (1%), indometacina (10 mg/kg, i.p.) ou extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander ou *Passiflora edulis* Sims, foram coletadas por punção cardíaca após anestesia por pentobarbital (25 mg/kg, i.p.). As amostras de soro foram obtidas a partir da separação do sangue total coletado sem anticoagulante, após centrifugação (50 x g, por 5 minutos).

Para análise semi-quantitativa das amostras fez-se uma diluição seriada do soro, diluindo-se este de 1:2 até 1:64 em solução de salina (NaCl, 0,9%). O volume final obtido em cada tubo foi de 200  $\mu$ L. Após a diluição sucessiva do soro, 50  $\mu$ L de cada diluição das amostras de soros, do soro puro e dos controles positivo (amostra com concentração conhecida de PCR) e negativo (amostra com concentração negativa de PCR) foram colocados em uma placa de fundo escuro, demarcada com esmalte. A seguir adicionou-se 50  $\mu$ L do reativo (anticorpo anti-PCR ligado a partículas de látex) em cada amostra e controles. Após este procedimento a placa foi homogeneizada manualmente por meio de rotações, durante 3 minutos. A reação positiva é caracterizada pela formação de grumos que são observados a “olho nú”. Os resultados foram expressos em mg/L.

#### **4.5.3 Protocolo experimental**

##### ***4.5.3.1 Efeito dos extratos aquosos de Passiflora alata Dryander e Passiflora edulis Sims, sobre a migração de leucócitos, na cavidade pleural de camundongos com pleurisia***

Inicialmente diferentes doses dos extratos em estudo foram avaliadas, para verificar a melhor dose de inibição dos parâmetros inflamatórios estudados (migração celular e exsudação). Posteriormente a escolha da melhor dose avaliou-

se então, o melhor tempo de tratamento prévio dos animais tratados com os extratos aquosos.

Dessa forma, diferentes grupos de animais foram tratados previamente 0,5 h antes da administração da carragenina com diferentes doses de *Passiflora alata* Dryander (50-300 mg/kg, i.p.) ou *Passiflora edulis* Sims (100-1000 mg/kg, i.p.). Após a escolha da melhor dose, avaliou-se o perfil temporal dos extratos em diferentes períodos de tempo (0,5-4 h), sendo que os animais foram tratados previamente à administração da carragenina e o exsudato foi coletado 4 h após a indução da inflamação. Nestes experimentos, foi observado que as melhores doses dos extratos utilizados foram: para *Passiflora alata* Dryander (100 mg/kg, i.p.) e para *Passiflora edulis* Sims (250 mg/kg, i.p.) e o melhor tempo de tratamento, para ambos foi de 0,5 h antes da indução da pleurisia. Esta seleção de doses e tempo de pré-tratamento, para estudos posteriores do efeito dos extratos, obedeceu aos seguintes critérios: foram selecionadas as menores doses que, mediante teste estatístico, foram significativas com um  $P < 0,01$  na inibição da migração de leucócitos totais e dos níveis de azul de Evans para cavidade pleural de animais inflamados. Também neste protocolo, grupos de animais-controle foram utilizados, aos quais foram administrados 0,1 mL de solução salina estéril na cavidade pleural, e estes animais foram também sacrificados 4 h após.

A análise dos leucócitos foi realizada conforme descrito no item 4.5.2.1, e os resultados foram expressos em número total de células ( $\times 10^6$ ).

#### **4.5.3.2 Efeito dos extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims, sobre a contagem total de leucócitos no sangue de camundongos com pleurisia**

Neste protocolo experimental foi investigado o efeito dos extratos de *Passiflora alata* Dryander ou *Passiflora edulis* Sims sobre os leucócitos, no sangue de camundongos com pleurisia. Dessa forma, diferentes grupos de animais foram tratados previamente (0,5 h) com diferentes doses de *Passiflora alata* Dryander (50-300 mg/kg, i.p.) ou *Passiflora edulis* Sims (100-1000 mg/kg, i.p.) e transcorridas 4 h após a indução da inflamação pela carragenina, amostras de sangue total foram coletadas por punção cardíaca após procedimento de anestesia. Paralelamente grupos de animais-controle foram utilizados, aos quais foram administrados 0,1 mL de solução salina estéril na cavidade pleural, e estes animais foram também sacrificados 4 h após.

A análise do hemograma dos camundongos foi realizada segundo os procedimentos descritos no item 4.5.2.1, os resultados foram expressos em número de células ( $\times 10^6$ ).

#### **4.5.3.3 Efeito dos extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims, sobre a exsudação, na cavidade pleural de camundongos com pleurisia**

Nestes experimentos foi investigado o efeito dos extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander ou *Passiflora edulis* Sims, sobre os níveis de exsudação no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Os animais foram tratados com solução corante azul de Evans (25 mg/kg, i.v.) 1 h antes dos experimentos. Posteriormente estes animais receberam diferentes doses de



*Passiflora alata* Dryander (50-300 mg/kg, i.p.) ou *Passiflora edulis* Sims (100-1000 mg/kg, i.p.) e os parâmetros inflamatórios foram estudados 4 h após a indução da pleurisia.

Após a seleção da melhor dose que inibiu a migração de leucócitos e a exsudação, estudou-se o perfil temporal. Neste protocolo experimental, diferentes grupos de animais foram testados com uma única dose dos extratos aquosos de *Passiflora alata* (100 mg/kg, i.p.) ou *Passiflora edulis* (250 mg/kg, i.p.) e os parâmetros inflamatórios foram avaliados 4 h após. Paralelamente grupos de animais-controle foram utilizados, aos quais foram administrados 0,1 mL de solução salina estéril na cavidade pleural, e estes animais foram também sacrificados 4 h após.

A avaliação da exsudação foi realizada, segundo a metodologia descrita no item 4.5.2.2. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **4.5.3.4 Efeito dos extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims, sobre a permeabilidade vascular, em tecidos (pulmão, coração, baço, fígado e rins) de camundongos com pleurisia**

Neste protocolo foi avaliado o efeito dos extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander ou *Passiflora edulis* Sims, sobre a permeabilidade vascular em tecidos induzida pela carragenina, em camundongos. Para avaliação do efeito do extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander neste parâmetro inflamatório, a dose utilizada foi de 100 mg/kg, i.p., e para o extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims foi de 250 mg/kg, i.p., administrados 0,5 h da pleurisia 4 h. Após a indução da pleurisia, os animais foram sacrificados com *overdose* de pentobarbital e os pulmões, coração, fígado, baço, e rins foram removidos para análise da permeabilidade vascular,

conforme técnica descrita anteriormente no item 4.5.2.3. Paralelamente grupos de animais-controle foram utilizados, nos quais foram administrados 0,1 mL de solução salina estéril na cavidade pleural, e estes animais foram também sacrificados 4 h após.

Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g/g}$  de tecido úmido.

#### **4.5.3.5 Efeito dos extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims, sobre os níveis da mieloperoxidase, na cavidade pleural de camundongos com pleurisia**

Neste protocolo experimental foi investigado o efeito dos extratos de *Passiflora alata* Dryander ou *Passiflora edulis* Sims sobre os níveis de mieloperoxidase, no lavado da cavidade pleural de camundongos com pleurisia. Os extratos aquosos foram administrados nas seguintes doses: *Passiflora alata* Dryander 100 mg/kg, i.p. ou *Passiflora edulis* Sims 250 mg/kg, i.p., ambos administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia 4 h. Paralelamente grupos de animais-controle foram utilizados, aos quais foram administrados 0,1 mL de solução salina estéril na cavidade pleural, e estes animais foram também sacrificados 4 h após (SALEH et al., 1999; FRÖDE; MEDEIROS, 2001). A análise da MPO foi avaliada segundo a metodologia descrita no item 4.5.2.4. Os resultados foram expressos em mU/mL.

#### **4.5.3.6 Efeito dos extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims, sobre os níveis da adenosina-deaminase, na cavidade pleural de camundongos com pleurisia**

Para a avaliação deste parâmetro inflamatório, os extratos aquosos foram administrados nas seguintes doses: *Passiflora alata* Dryander 100 mg/kg, i.p. ou

*Passiflora edulis* Sims 250 mg/kg, i.p., ambos administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia. A análise dos parâmetros estudados foi realizada 4 h após a indução da pleurisia pela carragenina (FRÖDE; MEDEIROS, 2001). Em cada grupo de experimentos foram incluídos animais-controle, que receberam a injeção de solução salina estéril na cavidade pleural. Esses animais foram sacrificados nos mesmos intervalos de tempo adotados para os grupos que receberam o tratamento com os extratos acima citados. A análise da ADA foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item 4.5.2.5. Os resultados foram expressos em U/L.

#### **4.5.3.7 Efeito dos extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims, sobre os níveis do nitrito/nitrato (NO<sup>x</sup>) na cavidade pleural de camundongos com pleurisia**

Para a avaliação deste parâmetro inflamatório, os extratos aquosos foram administrados nas seguintes doses: *Passiflora alata* Dryander 100 mg/kg, i.p. ou *Passiflora edulis* Sims 250 mg/kg, i.p., ambos administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia. A análise dos parâmetros estudados foi realizada 4 h após a indução da pleurisia pela carragenina (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1999). Em cada grupo de experimentos foram incluídos animais-controle, que receberam a injeção de solução salina estéril na cavidade pleural. Esses animais foram sacrificados nos mesmos intervalos de tempo adotados para os grupos que receberam o tratamento com os extratos acima citados. A análise do (NO<sup>x</sup>) foi realizada segundo a metodologia descrita no item 4.5.2.6. Os resultados foram expressos em (µM).

#### **4.5.3.8 Efeito dos extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims, sobre os níveis de proteínas totais no exsudato e no soro de camundongos com pleurisia**

Neste protocolo experimental foi investigado o efeito dos extratos de *Passiflora alata* Dryander ou *Passiflora edulis* Sims sobre os níveis de proteínas totais, no exsudato e no soro de camundongos com pleurisia. Para avaliação do efeito do extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander neste parâmetro inflamatório, a dose utilizada foi de 100 mg/kg, i.p., e para o extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims foi de 250 mg/kg, i.p., administrados 0.5 h da pleurisia 4 h. Paralelamente, um grupo de animais-controle foi utilizado, sendo que estes receberam apenas a injeção de solução de salina estéril na cavidade pleural e foram sacrificados nos mesmos períodos de tempo adotados para os grupos que receberam o tratamento com os extratos. A determinação dos níveis de proteínas totais foi avaliada segundo a metodologia descrita no item 4.5.2.7. Os resultados foram expressos em mg/mL.

#### **4.5.3.9 Efeito dos extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims, sobre os níveis de Proteína-C reativa no soro de camundongos com pleurisia**

Neste protocolo experimental foi investigado o efeito dos extratos de *Passiflora alata* Dryander ou *Passiflora edulis* Sims sobre os níveis de Proteína-C reativa, no soro de camundongos com pleurisia. Para avaliação do efeito do extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander neste parâmetro inflamatório, a dose utilizada foi de 100 mg/kg, i.p., e para o extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims foi de 250 mg/kg, i.p., administrados 0.5 h da pleurisia 4 h. Paralelamente, um grupo de animais-controle foi utilizado, sendo que estes receberam apenas a injeção de solução de salina

estéril na cavidade pleural e foram sacrificados nos mesmos períodos de tempo adotados para os grupos que receberam o tratamento com os extratos. A determinação dos níveis de Proteína-C reativa foi avaliada segundo a metodologia descrita no item 4.5.2.8. Os resultados foram expressos em mg/mL.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos parâmetros inflamatórios estudados (exsudação, migração celular, proteínas totais, MPO, ADA e NO<sup>x</sup>) foram expressos através da média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.). Diferenças estatísticas para migração celular, exsudação, extravasamento de azul de Evans em diferentes órgãos, proteínas totais, MPO, ADA, NO<sup>x</sup> e entre grupos-controle e diferentes tratamentos com os extratos foram utilizados o teste de ANOVA (teste paramétrico), complementado pelo teste de Dunnett. Quando necessário utilizou-se o teste “t” de Student.

Os resultados da PCR foram expressos através das medianas com os respectivos (95%) limites de confiança (LC). Para avaliação estatística dos valores da PCR, utilizou-se ANOVA complementado com o teste de Dunnett.

As correlações entre as variáveis estudadas foram analisadas através dos testes de: regressão linear (R), correlação paramétrica de Pearson (r) e correlação não-paramétrica de Spearman (r).

Para todas as análises, valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos.

## 5. RESULTADOS

Devido à avaliação de extratos aquosos de espécies distintas do gênero *Passiflora*, os resultados serão contemporizados em duas séries. Primeiramente serão demonstrados os resultados obtidos com o extrato aquoso da *Passiflora alata* Dryander e posteriormente os obtidos com a *Passiflora edulis* Sims.

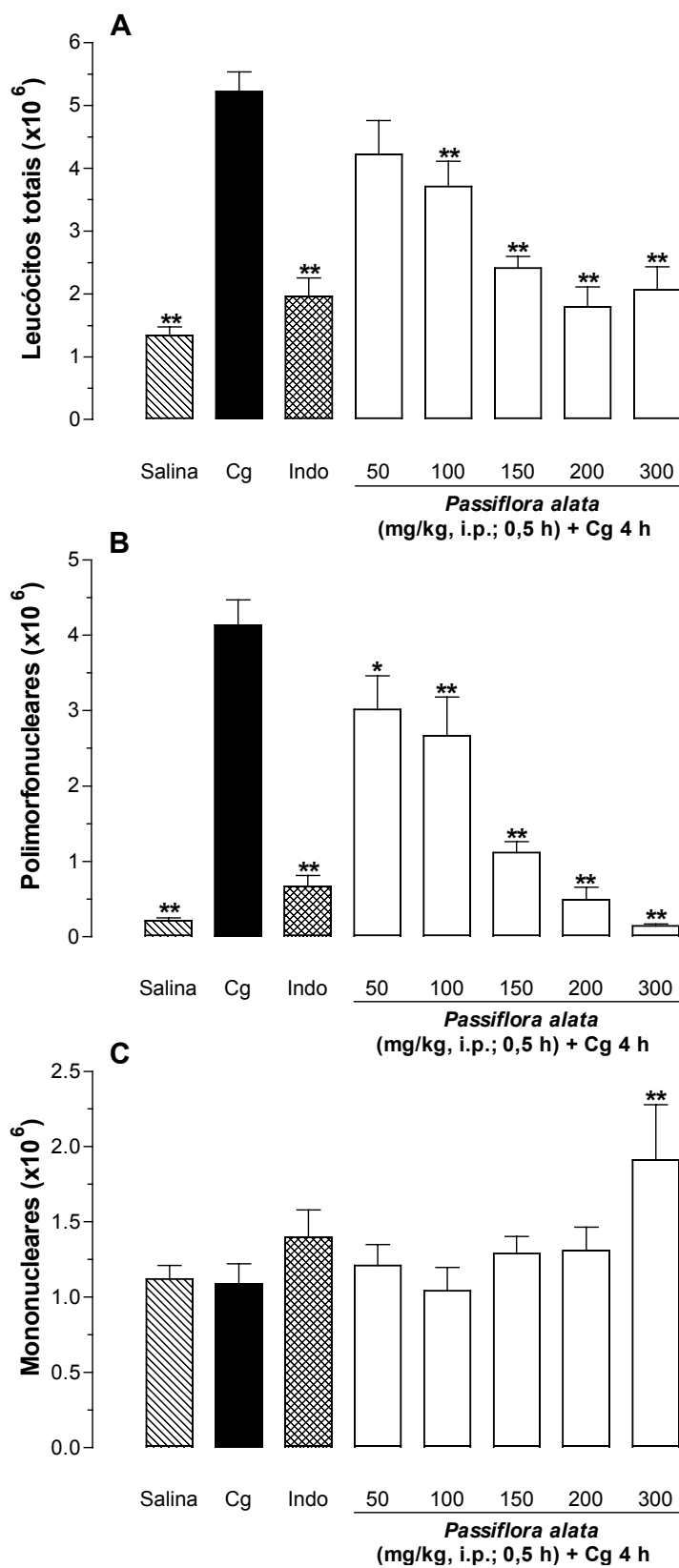
### 5.1 RESULTADOS OBTIDOS COM A *Passiflora alata* Dryander

#### 5.1.1 Efeito do extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander sobre a migração de leucócitos, na cavidade pleural de camundongos com pleurisia

O extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander quando administrado nas doses de 100-300 mg/kg i.p., 0,5 h antes da pleurisia induzida pela carragenina 4 h, foi efetivo em inibir significativamente a migração de leucócitos para a cavidade pleural dos animais com pleurisia quando comparados ao grupo-controle (animais tratados com carragenina) ( $\times 10^6$ ) (S:  $1,3 \pm 0,1$ ; Cg:  $5,2 \pm 0,2$ ; 100 mg/kg:  $3,7 \pm 0,4$ ; 150 mg/kg:  $2,4 \pm 0,2$ ; 200 mg/kg:  $1,8 \pm 0,3$ ; 300 mg/kg:  $2,1 \pm 0,4$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 4A). Esta inibição da migração de leucócitos ocorreu às custas da inibição da migração de polimorfonucleares ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,2 \pm 0,03$ ; Cg:  $4,1 \pm 0,3$ ; 50 mg/kg:  $3,0 \pm 0,45$ ; 100 mg/kg:  $2,7 \pm 0,5$ ; 150 mg/kg:  $1,1 \pm 0,2$ ; 200 mg/kg:  $0,5 \pm 0,2$ ; 300 mg/kg:  $0,2 \pm 0,03$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 4B). A dose de 300 mg/kg i.p., 0,5 h, aumentou significativamente a migração de mononucleares para a cavidade pleural quando comparado ao controle salina e carragenina ( $\times 10^6$ ) (S:  $1,1 \pm 0,09$ ; Cg:  $1,1 \pm 0,1$ ; 300 mg/Kg:  $1,9 \pm 0,4$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 4C). A indometacina (Indo) foi utilizada como controle, na dose de 10 mg/kg (i.p., 0,5 h), na qual inibiu significativamente a migração de leucócitos para a cavidade pleural dos animais com pleurisia quando comparados aos animais inflamados (grupo controle) ( $\times 10^6$ ) (S:  $1,3 \pm 0,1$ ; Cg:  $5,2 \pm 0,2$ ; Indo 10

mg/kg:  $2,0 \pm 0,3$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 4A), sendo que esta inibição ocorreu às custas de uma inibição na migração de polimorfonucleares ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,2 \pm 0,03$ ; Cg:  $4,1 \pm 0,3$ ; Indo 10 mg/kg:  $0,7 \pm 0,1$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 4B). Na dose avaliada, a indometacina não alterou significativamente os níveis de mononucleares quando comparada com o grupo-controle (Figura 4C). Os percentuais de inibição dos parâmetros inflamatórios: leucócitos, polimorfonucleares, mononucleares estão listados na tabela 2.

Na análise do perfil temporal, o extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander (100 mg/kg, i.p.) foi administrado (0,5 a 4 h) antes da administração do agente flogístico, e observou-se uma inibição significativa na migração de leucócitos para a cavidade pleural quando os animais foram tratados previamente com o extrato, de 0,5 à 2 h ( $\times 10^6$ ) (S:  $1,3 \pm 0,1$ ; Cg:  $5,2 \pm 0,2$ ; 0,5 h:  $3,7 \pm 0,4$ ; 1 h:  $3,7 \pm 0,4$  e 2 h:  $3,9 \pm 0,2$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 5A). Esta inibição na migração se deu às custas de polimorfonucleares ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,2 \pm 0,03$ ; Cg:  $4,1 \pm 0,3$ ; 0,5 h:  $2,7 \pm 0,5$ ; 1 h:  $2,4 \pm 0,3$  e 2 h:  $2,6 \pm 0,2$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 5B). Não foram observadas alterações significativas na migração de mononucleares, nos pré-tratamentos com *Passiflora alata* Dryander (100 mg/kg, i.p.), 0,5-4 h antes da indução da pleurisia, quando comparados com o grupo controle (Figura 5C). Os percentuais de inibição dos parâmetros inflamatórios: leucócitos, polimorfonucleares, mononucleares em diferentes tempos de pré-tratamento estão listados na tabela 3.



**Figura 4:** Efeito de diferentes doses do Extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander (50-300 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1% cav.) em camundongos com pleurisia. Efeito do Extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander sobre os níveis de leucócitos (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C). Salina = Animais controles tratados com salina estéril (i.pl./cav.), Cg = Animais tratados apenas com Cg e Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) e Cg. Cada grupo representa uma média de 4 a 10 animais e a barra vertical o e.p.m. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a Cg e os demais grupos.



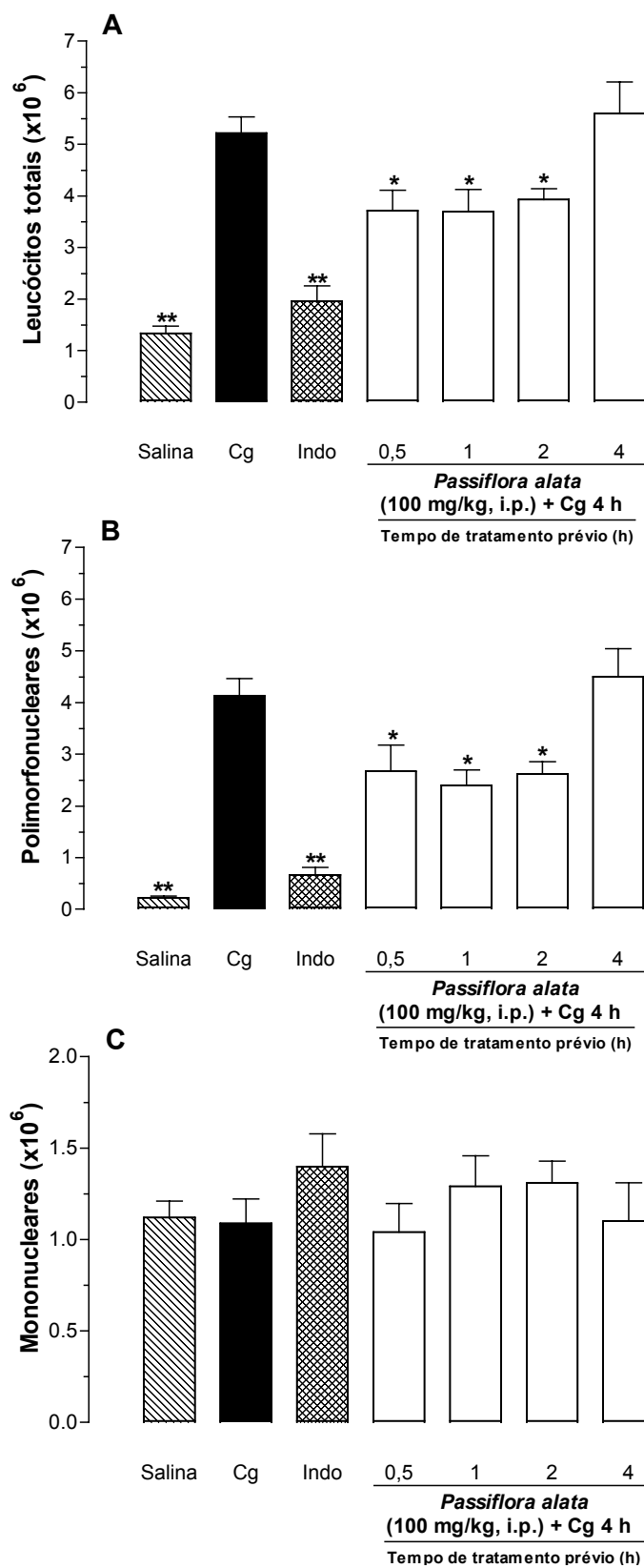
**Tabela 2:** Percentagem de inibição da *Passiflora alata* Dryander sobre parâmetros inflamatórios: leucócitos totais, polimorfonucleares e mononucleares, na pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos

Dose (mg/kg, i.p; 0,5 h)	Leucócitos totais (% de inibição)	PMN (% de inibição)	MONO (% de inibição)
Indo 10	62 ± 6**	84 ± 4**	-
Pa 50	-	27 ± 1*	-
Pa 100	29 ± 7**	35 ± 12**	-
Pa 150	54 ± 4**	73 ± 4**	-
Pa 200	65 ± 6**	88 ± 4**	-
Pa 300	60 ± 8**	96 ± 1**	+ 73,81 ± 33,23**

Cada grupo representa a média das percentagens de inibição ± e.p.m. de 4 a 10 animais. \* P < 0,05 e \*\* P < 0,01 representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos; (+) Aumento significativo em relação ao grupo tratado com a Cg. PMN: polimorfonucleares; MONO: mononucleares; INDO: Indometacina; Pa: *Passiflora alata*.

### 5.1.2 Efeito do extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander sobre os níveis de leucócitos, no sangue de camundongos com pleurisia

Analisamos neste protocolo o efeito sistêmico do extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander. A análise do hemograma revelou que os camundongos tratados previamente com *Passiflora alata* Dryander (50-300 mg/kg, i.p.) apresentaram uma diminuição significativa dos níveis de leucócitos no sangue quando comparados aos animais com pleurisia ( $\times 10^6$ ) (S: 4,2 ± 0,3; Cg: 5,3 ± 0,8; 50 mg/Kg: 2,8 ± 0,4; 100 mg/Kg: 2,9 ± 0,4; 150 mg/Kg: 2,7 ± 0,4; 300 mg/kg: 3,7 ± 0,4) (P < 0,05) (Figura 6A). Na dose de 150 mg/kg i.p., 0,5 h, observou-se uma inibição significativamente na migração de polimorfonucleares para a cavidade pleural quando comparado ao controle salina e carragenina ( $\times 10^6$ ) (S: 0,9 ± 0,2; Cg: 1,7 ± 0,4; 150 mg/Kg: 0,7 ± 0,09) (P < 0,05) (Figura 6B). Porém a diminuição significativa dos níveis de leucócitos no sangue foi às custas de mononucleares ( $\times 10^6$ ) (S: 3,3 ± 0,2; Cg: 3,7 ± 0,4; 50 mg/Kg: 1,18 ± 0,1; 100 mg/Kg: 1,8 ± 0,3; 150 mg/Kg: 2,0 ± 0,3; 200 mg/kg: 2,4 ± 0,5; 300 mg/kg: 2,6 ± 0,4) (P < 0,01) (Figura 6C). Observou-se uma diminuição significativa dos leucócitos totais quando se comparou animais tratados com salina a tratados somente com *Passiflora alata* Dryander na dose de 100 mg/kg (i.p. ) 0,5 h



**Figura 5:** Efeito do Extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander (100 mg/kg; i.p.) administrado 0,5-4 h antes da carragenina (Cg 1% / cav.) em camundongos com pleurisia. Efeito do Extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander sobre os níveis de leucócitos (A) polimorfonucleares (B) e mononucleares (C). Salina = Animais somente tratados com salina estéril (i.pl./cav.), Cg = Animais tratados apenas com Cg e Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) e Cg. Cada grupo representa uma média de 5 a 10 animais e a barra vertical o e.p.m. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a Cg e os demais grupos.

antes da administração de salina intrapleural ( $\times 10^6$ ) (S:  $4,2 \pm 0,3$ ; Pa 100 mg/Kg:  $2,9 \pm 0,5$  ( $P < 0,05$ ) (Figura 6 A), as custas de uma diminuição de mononucleares ( $\times 10^6$ ) (S:  $3,3 \pm 0,2$ ; Pa 100 mg/Kg:  $2,0 \pm 0,4$  ( $P < 0,05$ ) (Figura 6 C). É interessante ressaltar que não foi observado nenhuma alteração significativa por parte da administração de indometacina (10 mg/kg i.p.; 0,5 h) (Figura 6 A, B e C).

**Tabela 3:** Percentagem de inibição da *Passiflora alata* Dryander (100 mg/kg, i.p.) administrada de 0,5-4 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, sobre os níveis de leucócitos, polimorfonucleares e mononucleares

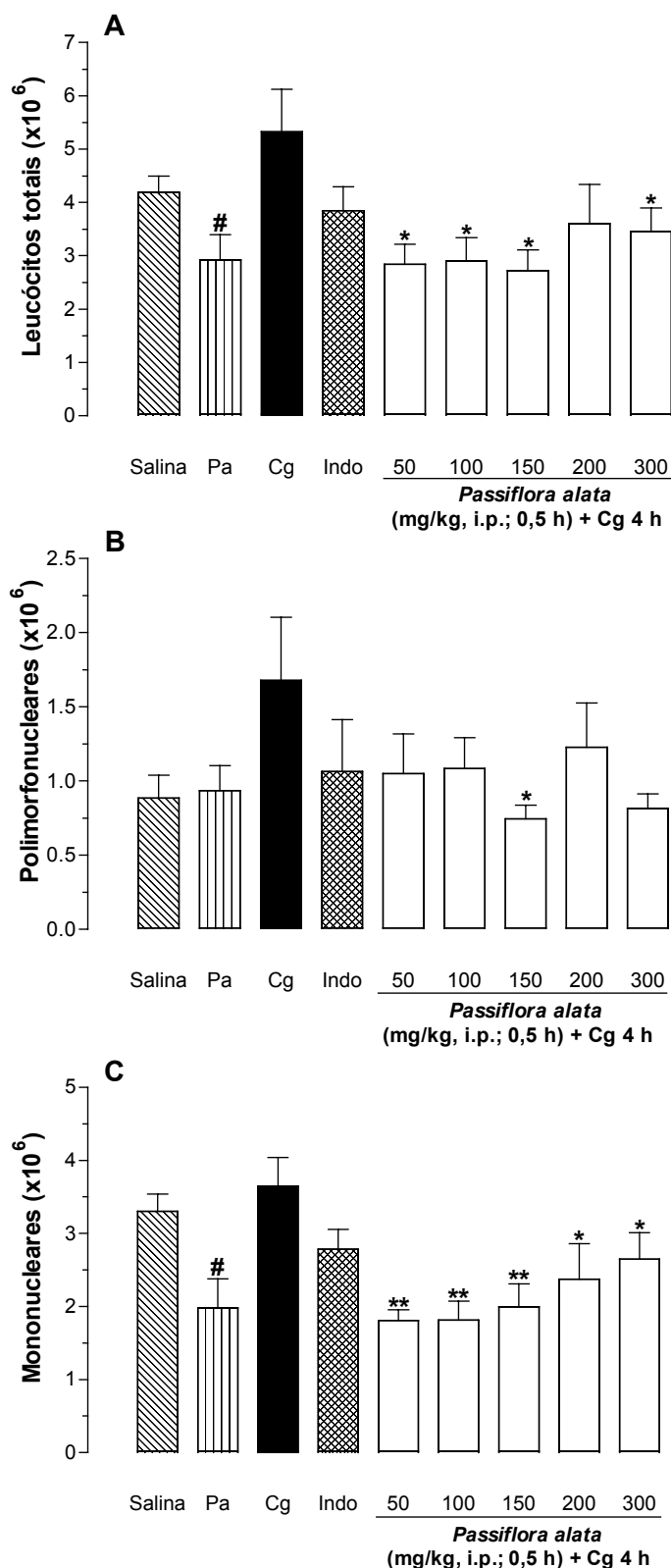
Tempo de tratamento prévio (h)	Leucócitos totais (% de inibição)	PMN (%de inibição)	MONO (%de inibição)
0,5	$29 \pm 7^*$	$35 \pm 12^*$	-
1	$29 \pm 7^*$	$41 \pm 7^*$	-
2	$24 \pm 5^*$	$37 \pm 6^*$	-
4	-	-	-

Cada grupo representa a média das percentagens de inibição  $\pm$  o e.p.m. de 5 a 10 animais. \*  $P < 0,05$  representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos. PMN: polimorfonucleares; MONO: mononucleares.

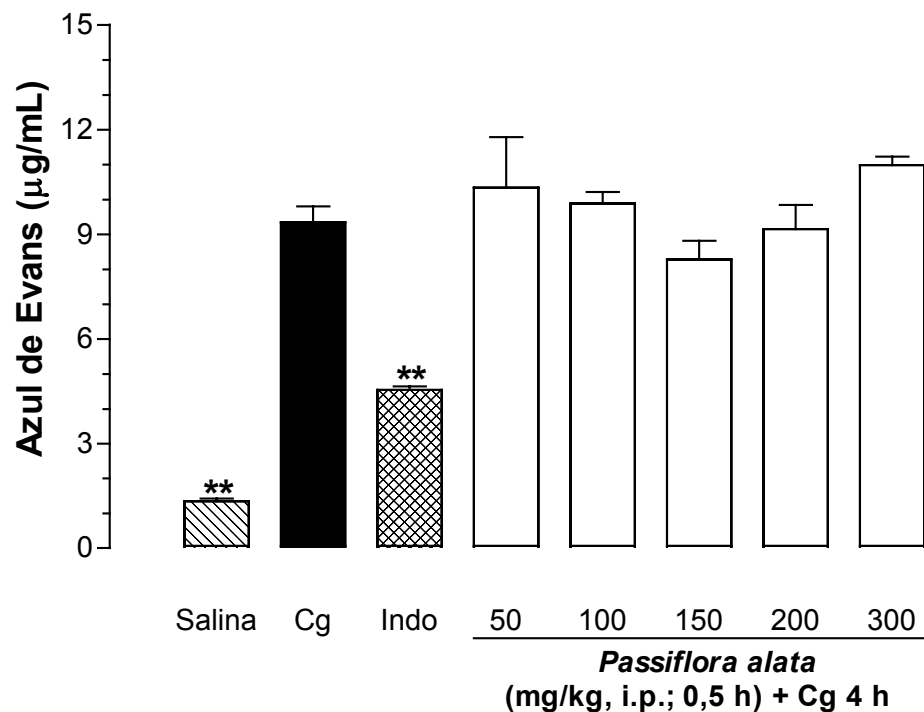
### 5.1.3 Efeito do extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander sobre a exsudação, na cavidade pleural de camundongos com pleurisia

A administração do extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander nas doses de 50 a 300 mg/Kg, administradas 0,5 h antes da indução da pleurisia, não promoveu inibição dos níveis de exsudação na cavidade pleural destes animais tratados quando comparados aos animais inflamados ( $P > 0,05$ ). Já a administração de indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) foi efetiva em inibir esta exsudação local ( $\mu\text{g/mL}$ ) (S:  $1,6 \pm 0,09$ ; Cg:  $9,6 \pm 0,4$ ; Indo 10 mg/Kg:  $4,5 \pm 0,09$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 7).

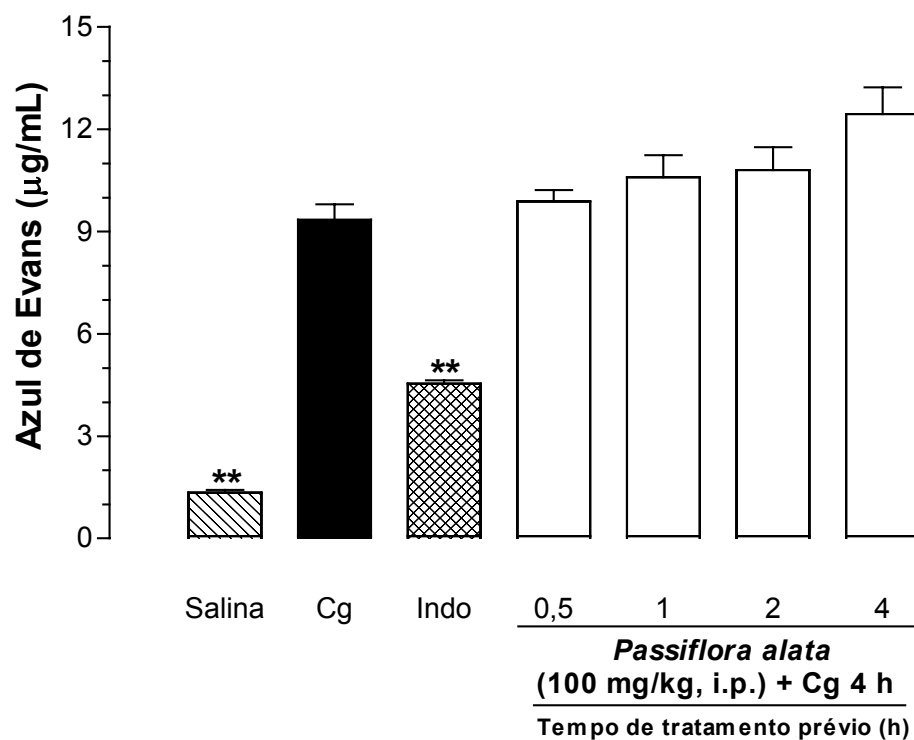
Na análise do perfil temporal, observamos que o extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander na dose de 100 mg/Kg, administrada previamente de 0,5-4 h antes da indução da pleurisia induzida pela carragenina, não foi efetivo em inibir os níveis de azul de Evans em nenhum tempo de tratamento prévio ( $P > 0,05$ ) (Figura 8).



**Figura 6:** Efeito de diferentes doses do Extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander (50-300 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) sobre os níveis de leucócitos no sangue de camundongos com pleurisia. Efeito do Extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander sobre os níveis de leucócitos (A) polimorfonucleares (B) e mononucleares (C). Salina = Animais somente tratados com salina estéril (i.pl./cav.), Pa = Animais somente tratados somente com Extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander (100 mg/kg; i.p.; 0,5 h antes salina i.pl), Cg = Animais tratados apenas com Cg e Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) e Cg. Cada grupo representa uma média de 4 a 8 animais e a barra vertical o e.p.m. \*\* P < 0,01 e \* P < 0,05 representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a Cg e os demais grupos. # P < 0,05 representa a significância da diferença entre o grupo tratado somente com salina e o grupo tratado somente com Pa.



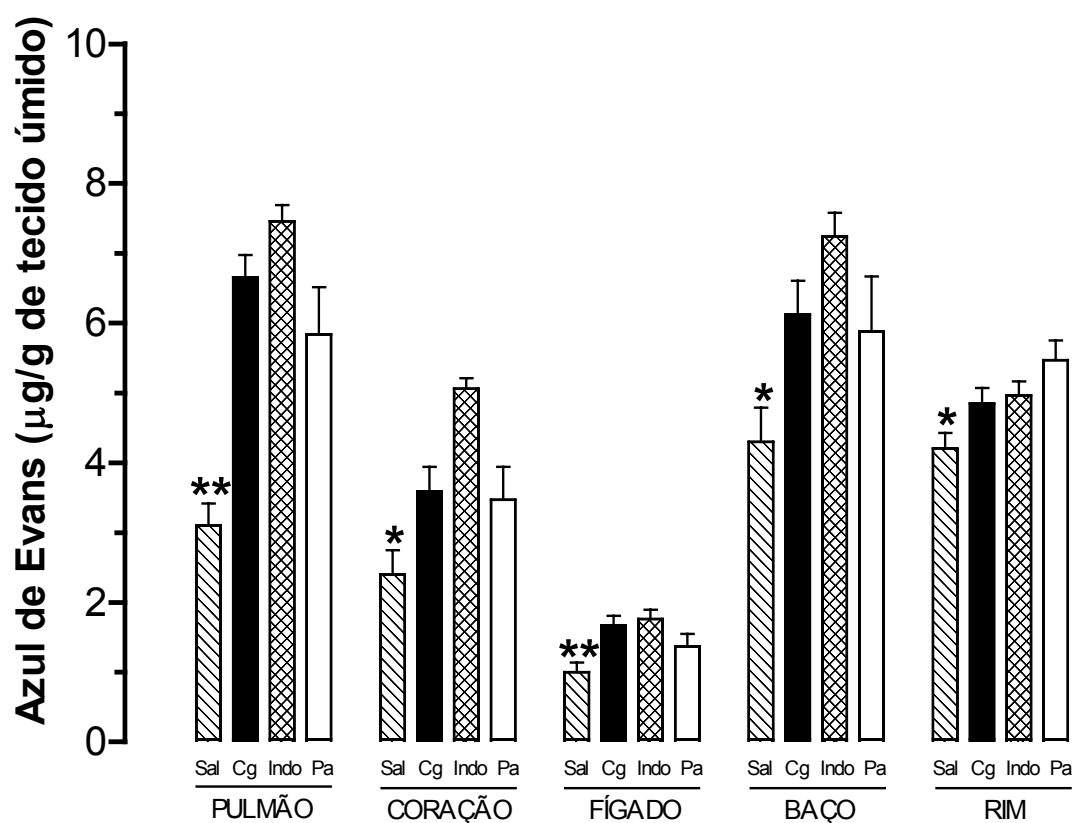
**Figura 7:** Efeito do Extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander (50-300 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis de exsudação na cavidade pleural. Salina = Animais somente tratados com salina estéril (i.pl./cav.), Cg = Animais tratados apenas com Cg e Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) e Cg. Cada grupo representa uma média de 4 a 10 animais e a barra vertical o e.p.m. \*\* P < 0,01 representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a Cg e os demais grupos.



**Figura 8:** Efeito do Extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander (100 mg/kg; i.p.) administrado 0,5-4 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis de exsudação na cavidade pleural. Salina = Animais somente tratados com salina estéril (i.pl./cav.), Cg = Animais tratados apenas com Cg e Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) e Cg. Cada grupo representa uma média de 5 a 10 animais e a barra vertical o e.p.m. \*\* P < 0,01 representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a Cg e os demais grupos.

### 5.1.4 Efeito do extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander sobre a permeabilidade vascular em tecidos (pulmão, coração, baço, fígado e rins) de camundongos com pleurisia

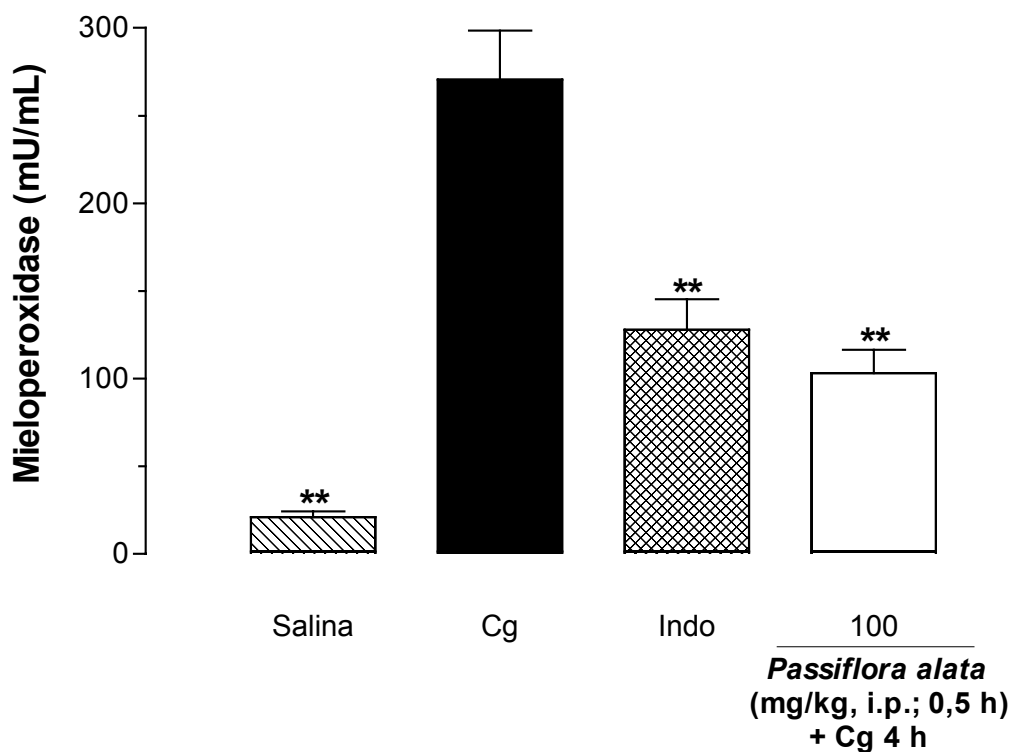
Para avaliação deste parâmetro inflamatório, os animais foram tratados com o extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander na dose de 100 mg/Kg administrado 0,5 h antes da pleurisia. Nesta dose e intervalo de tratamento prévio, não foi observado uma diminuição significativa dos níveis de azul de Evans ( $\mu\text{g/g}$  de tecido úmido) nos órgãos analisados: pulmão, coração, fígado, baço e rim, quando comparados com os animais controle carragenina ( $P > 0,05$ ) (Figura 9).



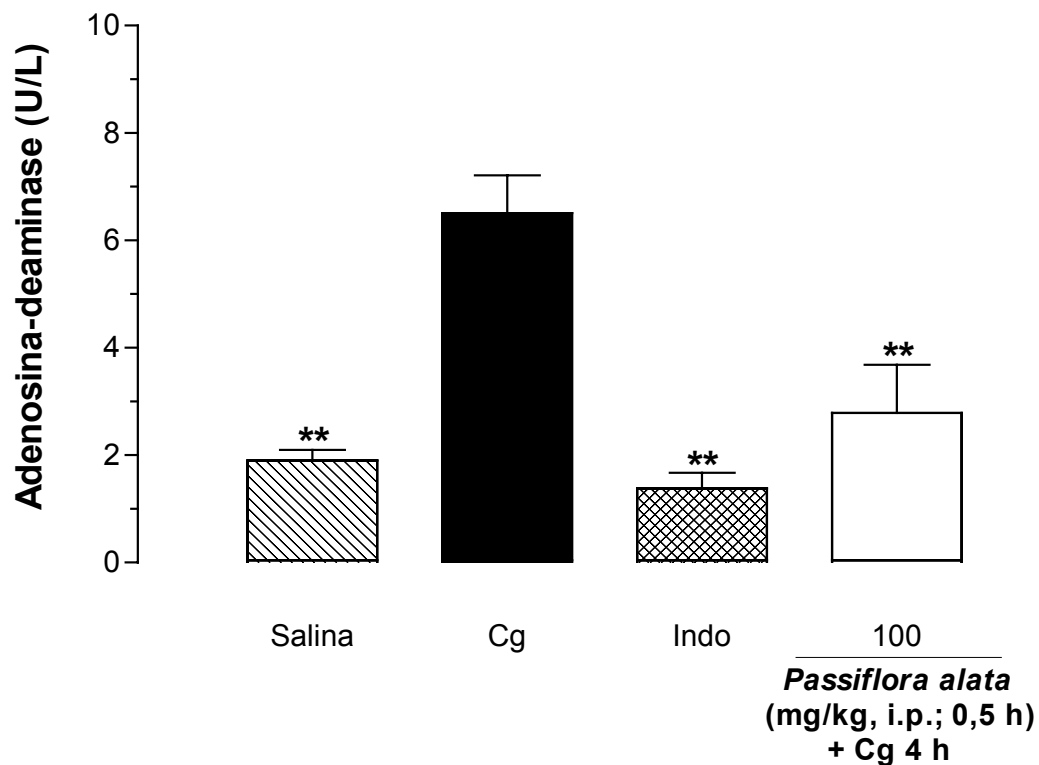
**Figura 9:** Efeito do Extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander (100 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1% / cav.) em camundongos com pleurisia sobre a permeabilidade vascular em tecidos. Sal = Animais somente tratados com salina estéril (i.pl./cav.), Cg = Animais tratados apenas com Cg, Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) e Cg e Pa = animais tratados com *Passiflora alata* e Cg. Cada grupo representa uma média de 6 a 13 animais e a barra vertical o e.p.m. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a Cg e os demais grupos.

### **5.1.5 Efeito do extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander sobre os níveis de mieloperoxidase (MPO), adenosina-deaminase (ADA) e nitrato/nitrito (NO<sup>x</sup>) no lavado pleural de camundongos com pleurisia**

O extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander (100 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina, inibiu de forma significativa às concentrações de MPO (mU/mL) (S:  $21,0 \pm 3,2$ ; Cg:  $270,5 \pm 28$ ; 100 mg/Kg:  $103 \pm 13,4$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 10) e ADA (U/L) (S:  $1,9 \pm 0,2$ ; Cg:  $6,5 \pm 0,7$ ; 100 mg/Kg:  $2,8 \pm 0,9$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 11) na pleurisia induzida pela carragenina. Nas mesmas condições experimentais não foi observado diminuição nos níveis de nitrito/nitrato (NO<sup>x</sup>) ( $P > 0,05$ ) (Figura 12). Por outro lado a indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) demonstrou uma diminuição significativa nos níveis de MPO (mU/mL) (S:  $21,0 \pm 3,2$ ; Cg:  $270,5 \pm 28$ ; Indo 10 mg/Kg:  $127,8 \pm 17,4$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 10), ADA (U/L) (S:  $1,9 \pm 0,2$ ; Cg:  $6,5 \pm 0,7$ ; Indo 10 mg/Kg:  $1,4 \pm 0,3$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 11) e nitrito/nitrato (NO<sup>x</sup>) ( $\mu\text{M}$ ) (S:  $2,9 \pm 0,4$ ; Cg:  $19 \pm 1,3$ ; Indo 10 mg/Kg:  $4,62 \pm 0,8$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 12).

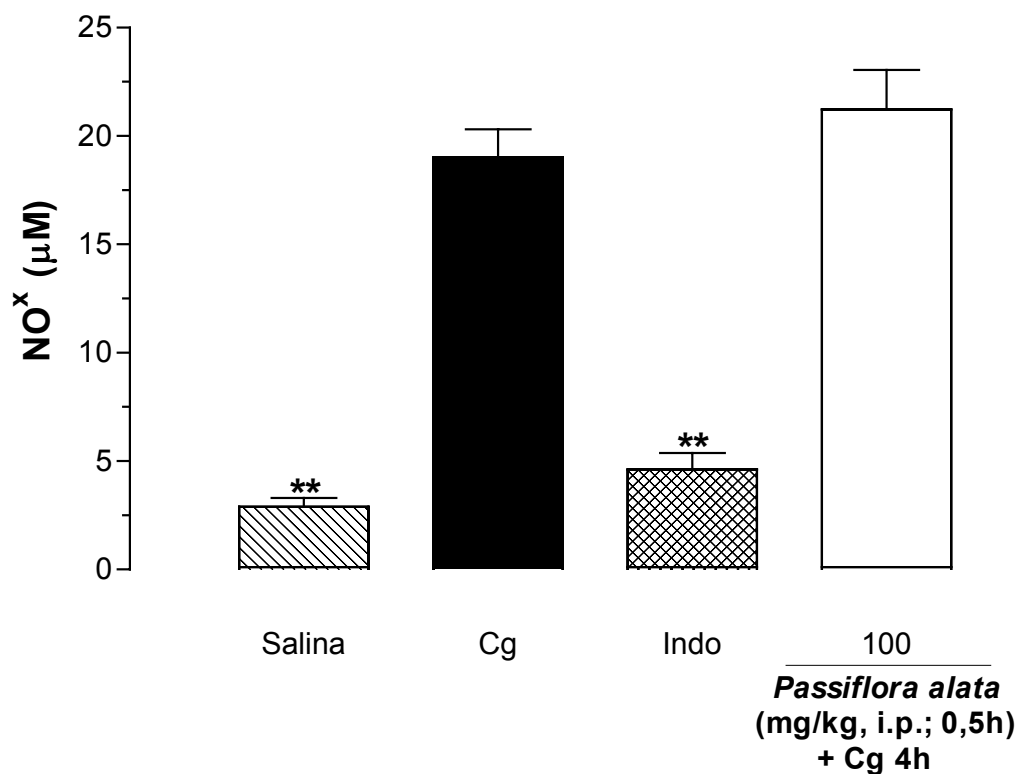


**Figura 10:** Efeito do Extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander (100 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1% / cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis mieloperoxidase. Salina = Animais somente tratados com salina estéril (i.pl./cav.), Cg = Animais tratados apenas com Cg e Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) e Cg. Cada grupo representa uma média de 7 a 9 animais e a barra vertical o e.p.m. \*\* P < 0,01 representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a Cg e os demais grupos.



**Figura 11:** Efeito do Extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander (100 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1% / cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis da adenosina-deaminase. Salina = Animais somente tratados com salina estéril (i.pl./cav.), Cg = Animais tratados apenas com Cg e Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) e Cg. Cada grupo representa uma média de 7 a 13 animais e a barra vertical o e.p.m. \*\* P < 0,01 representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a Cg e os demais grupos.

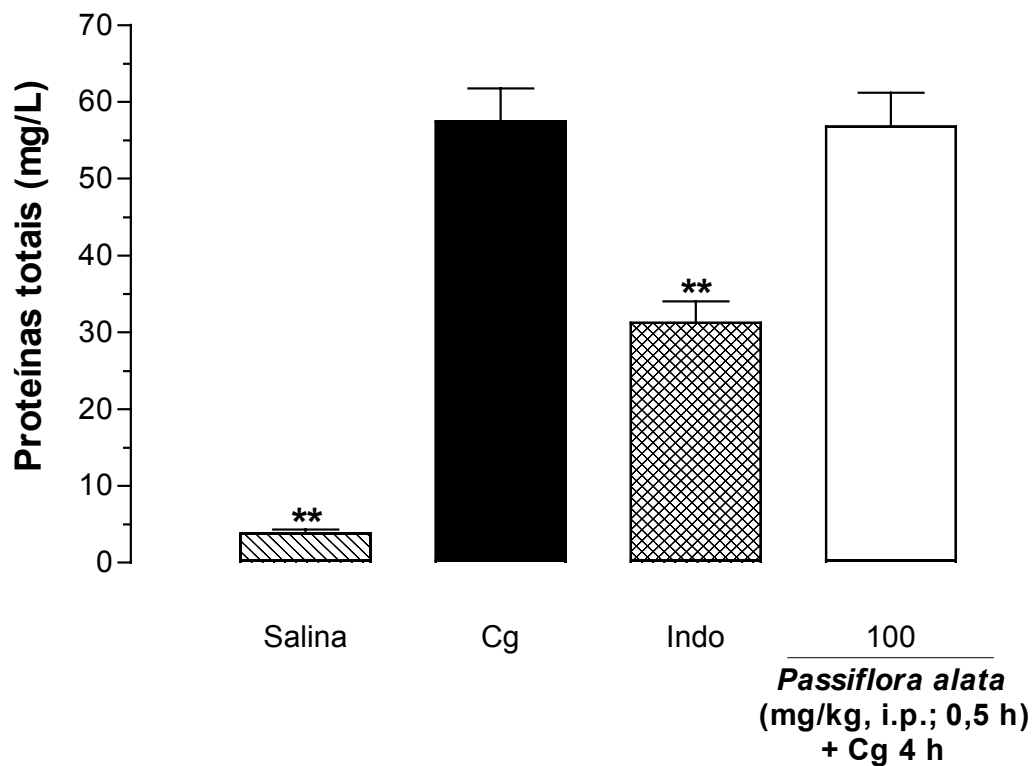




**Figura 12:** Efeito do Extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander (100 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1% / cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis de nitrito/nitrato (NO<sup>x</sup>). Salina = Animais somente tratados com salina estéril (i.pl./cav.), Cg = Animais tratados apenas com Cg e Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) e Cg. Cada grupo representa uma média de 7 a 15 animais e a barra vertical o e.p.m. \*\* P < 0,01 representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a Cg e os demais grupos.

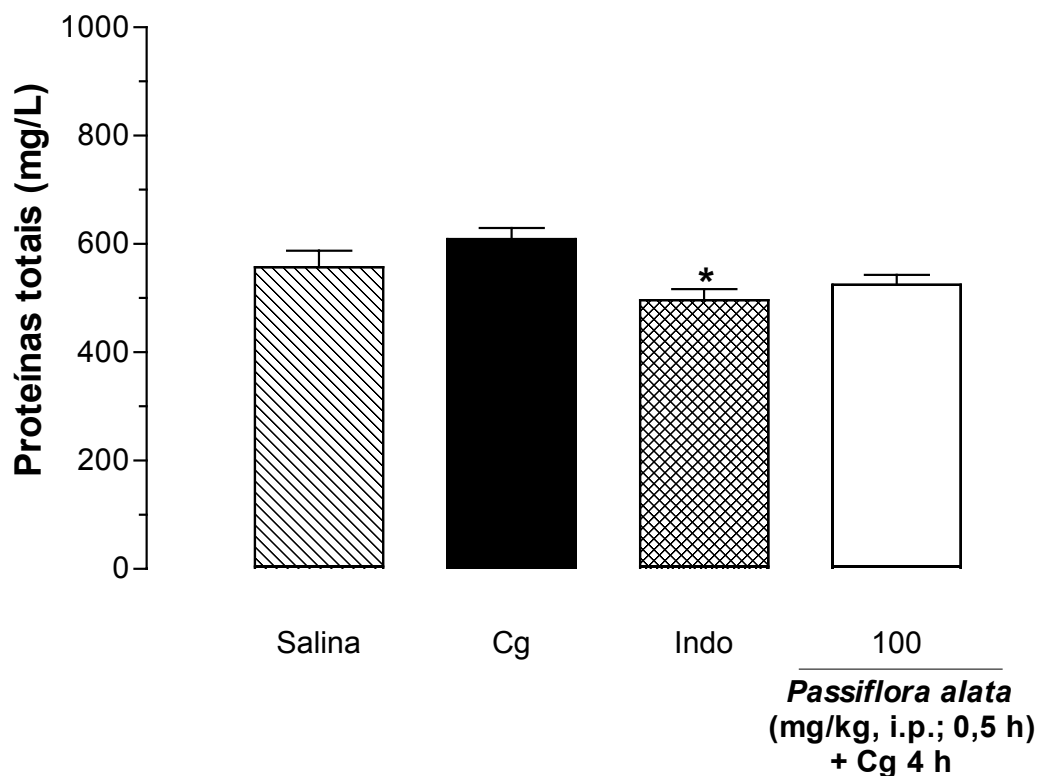
### 5.1.6 Efeito do extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander sobre os níveis de proteínas totais no exsudato e no soro de camundongos com pleurisia

O extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander (100 mg/kg; i.p., 0,5 h) não foi efetivo em diminuir significativamente os níveis de proteínas totais no exsudato destes animais tratados, quando comparados com animais inflamados ( $P > 0,05$ ) (Figura 13). Nas mesmas condições experimentais, a indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) demonstrou uma diminuição significativa nos níveis de proteínas totais no exsudato (mg/L) (S:  $3,84 \pm 0,5$ ; Cg:  $57,4 \pm 4,3$ ; Indo 10 mg/Kg:  $31,2 \pm 2,8$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 13).



**Figura 13:** Efeito do Extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander (100 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1% / cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis de proteínas totais no exsudato. Salina = Animais somente tratados com salina estéril (i.pl./cav.), Cg= Animais tratados apenas com Cg e Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) e Cg. Cada grupo representa uma média de 6 a 11 animais e a barra vertical o e.p.m. \*\* P < 0,01 representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a Cg e os demais grupos.

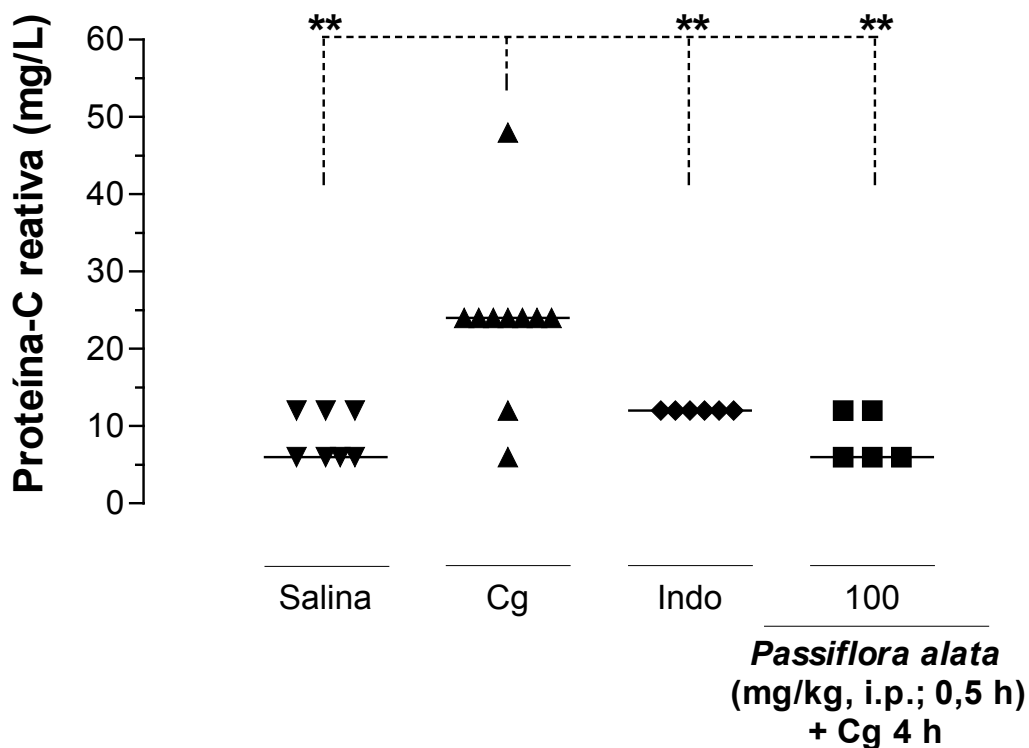
Da mesma forma, em relação aos níveis de proteínas totais no soro, o extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander (100 mg/kg; i.p., 0,5 h) não alterou significativamente este parâmetro quando comparado aos animais tratados com a carragenina ( $P > 0,05$ ) (Figura 14). Por outro lado, a indometacina diminuiu significativamente os níveis de proteínas totais séricas quando comparado aos animais inflamados (mg/L) (S:  $557,2 \pm 30,5$ ; Cg:  $609 \pm 20,1$ ; Indo 10 mg/Kg:  $496,4 \pm 18,9$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 14).



**Figura 14:** Efeito do Extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander (100 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis de proteínas totais no soro. Salina = Animais somente tratados com salina estéril (i.pl./cav.), Cg= Animais tratados apenas com Cg e Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) e Cg. Cada grupo representa uma média de 6 a 10 animais e a barra vertical o e.p.m. \* P < 0,05 representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a Cg e os demais grupos.

### 5.1.7 Efeito do extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander sobre os níveis de proteína-C reativa no soro de camundongos com pleurisia

A administração do extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander (100 mg/kg; i.p.; 0,5 h) foi efetiva em diminuir significativamente os níveis de proteína-C reativa no soro quando comparada com animais inflamados, controle carragenina (mg/L) (Mediana e amplitude) (S: 9 (5,6-12,5); Cg: 24 (15,7-31,1); 100 mg/Kg: 6 (4,3-12,5) (P < 0,01) (Figura 15). A administração de indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) foi efetiva em diminuir significativamente os níveis de proteína-C reativa quando comparada ao grupo controle (mg/L) (Mediana e amplitude) (S: 9 (5,6-12,5); Cg: 24 (15,7-31,1); Indo 10 mg/Kg: 12 (12,0-12,0) (P < 0,01) (Figura 15).



**Figura 15:** Efeito do Extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander (100 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1% / cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis de proteína-C reativa no soro. Salina = Animais somente tratados com salina estéril (i.pl./cav.), Cg= Animais tratados apenas com Cg e Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) e Cg. Cada grupo representa uma média de 5 a 10 animais. Os símbolos representam os valores individuais da PCR e a barra horizontal sobre os símbolos, a mediana. \*\* P < 0,01 representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a Cg e os demais grupos.

As possíveis correlações entre os parâmetros inflamatórios estudados nas amostras de exsudato e soro de animais inflamados e tratados com *Passiflora alata* Dryander, estão listados nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

**Tabela 4:** Correlações entre os diversos parâmetros inflamatórios analisados no lavado da cavidade pleural de animais com pleurisia, tratados previamente com o extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander, na pleurisia induzida por Cg, em camundongos

Variáveis	Regressão linear (R)	Correlação de Pearson (r)	Correlação de Spearman (r)
Proteínas totais X Leucócitos totais	0,4838*	0,4838*	0,3276
Proteínas totais X Azul de Evans	0,5081**	0,5081**	0,3328
Proteínas totais X PMN	0,4826*	0,4826*	0,3460*
Proteínas totais X MPO	0,4519*	0,4519*	0,5237*
Proteínas totais X ADA	0,5081**	0,5081**	0,5610**
Azul de Evans X Leucócitos totais	0,8075**	0,8075**	0,6733**
Azul de Evans X PMN	0,7073**	0,7073**	0,6584**
Azul de Evans X MPO	-0,07896	-0,07896	0,007413
Azul de Evans X ADA	0,04497	0,04497	0,1156
MPO X Leucócitos totais	-0,1216	-0,1216	-0,08754
MPO X PMN	-0,1211	-0,1211	-0,07369
ADA X Leucócitos totais	0,1293	0,1293	0,1372
ADA X MONO	-0,3287*	-0,3287*	-0,4483**

Os dados representam os valores estatísticos obtidos através da análise de regressão linear (R), correlação paramétrica de Pearson (r) e não paramétrica de Spearman (r). \* P < 0,05 e \*\* P < 0,01 representam a significância da diferença entre o grupo tratado com carragenina e aqueles tratados com o extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander. PMN: polimorfonucleares; MONO: monucleares MPO: mieloperoxidase; ADA: adenosina-deaminase.

**Tabela 5:** Correlações entre os diversos parâmetros inflamatórios analisados no sangue de animais com pleurisia, tratados previamente com o extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander, na pleurisia induzida por Cg, em camundongos

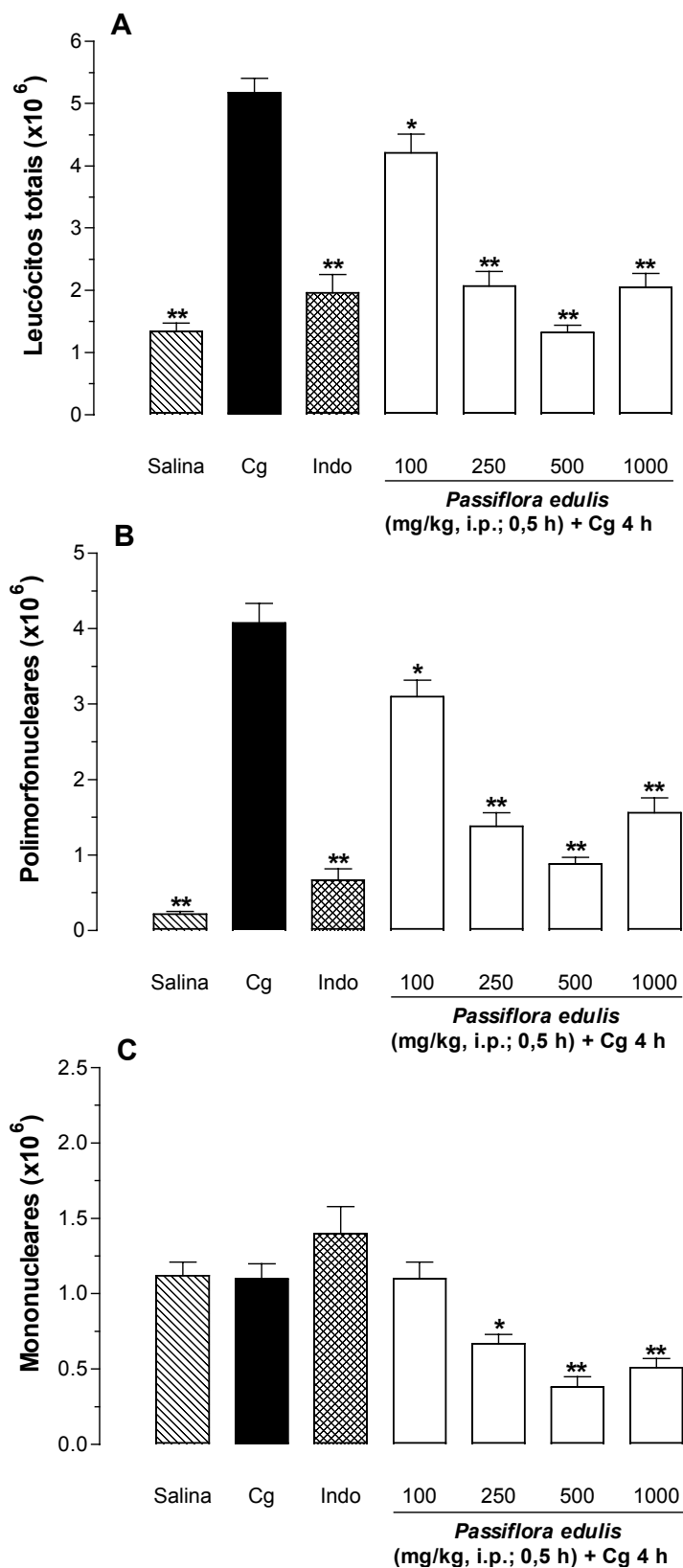
<b>Variáveis</b>	<b>Regressão linear (R)</b>	<b>Correlação de Pearson (r)</b>	<b>Correlação de Spearman (r)</b>
PCR X Leucocitos totais	-0,02277	-0,02277	-0,2691
PCR X PMN	-0,05187	-0,05187	-0,3277
PCR X MONO	0,005229	0,005229	-0,1169
PCR X Proteínas totais	-0,2270	-0,2270	-0,1933

Os dados representam os valores estatísticos obtidos através da análise de regressão linear (R), correlação paramétrica de Pearson (r) e não paramétrica de Spearman (r). PMN: polimorfonucleares; MONO: monucleares MPO: mieloperoxidase; ADA: adenosina-deaminase.

## 5.2 RESULTADOS OBTIDOS COM A *Passiflora edulis* Sims

### 5.2.1 Efeito do extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims sobre a migração de leucócitos, na cavidade pleural de camundongos com pleurisia

O extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims nas doses de 250-1000 mg/kg i.p., 0,5 h antes da pleurisia foi efetivo em inibir significativamente a migração de leucócitos para a cavidade pleural dos animais inflamados ( $\times 10^6$ ) (S:  $1,3 \pm 0,1$ ; Cg:  $5,2 \pm 0,2$ ; 100 mg/kg:  $4,2 \pm 0,3$ ; 250 mg/kg:  $2,1 \pm 0,2$ ; 500 mg/kg:  $1,3 \pm 0,1$ ; 1000 mg/kg:  $2,1 \pm 0,2$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 16A). Esta inibição ocorreu devido a uma inibição na migração de polimorfonucleares ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,2 \pm 0,03$ ; Cg:  $4,1 \pm 0,3$ ; 100 mg/kg:  $3,1 \pm 0,2$ ; 250 mg/kg:  $1,4 \pm 0,2$ ; 500 mg/kg:  $0,9 \pm 0,08$ ; 1000 mg/kg:  $1,6 \pm 0,2$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 16B) e de mononucleares para a cavidade pleural quando comparados ao grupo-controle da carragenina ( $\times 10^6$ ) (S:  $1,1 \pm 0,09$ ; Cg:  $1,1 \pm 0,1$ ; 250 mg/Kg:  $0,7 \pm 0,06$ ; 500 mg/Kg:  $0,4 \pm 0,07$  e 1000 mg/Kg:  $0,5 \pm 0,06$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 16C). A indometacina na dose de 10 mg/kg (i.p., 0,5 h), inibiu significativamente a migração de leucócitos para a cavidade pleural dos animais com pleurisia quando comparados ao grupo-controle carragenina ( $\times 10^6$ ) (S:  $1,3 \pm 0,1$ ; Cg:  $5,2 \pm 0,2$ ; Indo 10 mg/kg:  $2,0 \pm 0,3$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 16A). Esta inibição ocorreu às custas da inibição na migração de polimorfonucleares ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,2 \pm 0,03$ ; Cg:  $4,1 \pm 0,3$ ; Indo 10 mg/kg:  $0,7 \pm 0,1$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 16B). Os níveis de mononucleares não foram alterados significativamente pela indometacina na dose estudada quando comparada com o grupo-controle (Figura 16C). Os percentuais de inibição dos parâmetros inflamatórios: leucócitos, polimorfonucleares, mononucleares em diferentes tempos de pré-tratamento estão listados na tabela 6.



**Figura 16:** Efeito de diferentes doses do Extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims (100-1000 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia. Efeito do Extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims sobre os níveis de leucócitos (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C). Salina = Animais somente tratados com salina estéril (i.pl./cav.), Cg = Animais tratados apenas com Cg e Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) e Cg. Cada grupo representa uma média de 5 a 10 animais e a barra vertical o e.p.m. \* P < 0,05 e \*\* P < 0,01. representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a Cg e os demais grupos.

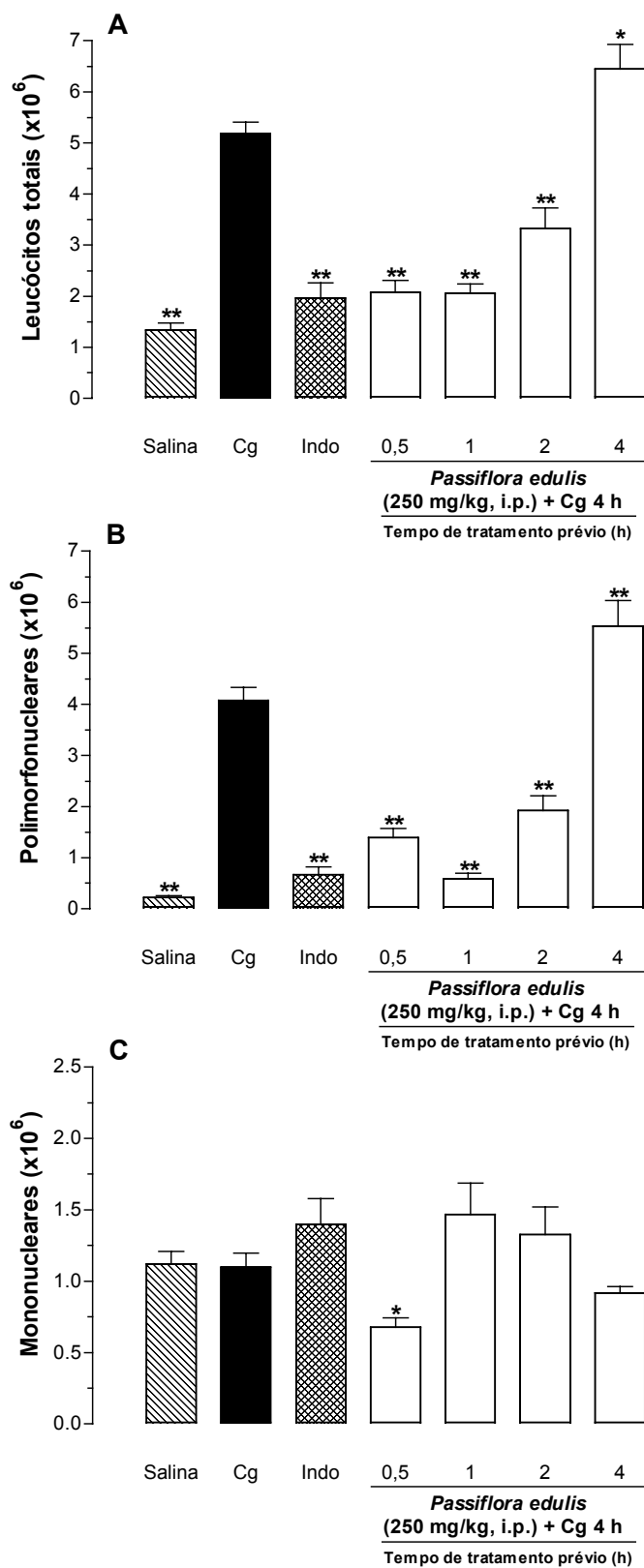


Na análise do perfil temporal, o extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims (250 mg/kg, i.p.) quando administrado (0,5 a 4 h) antes da administração do agente flogístico, inibiu de forma significativa a migração de leucócitos para a cavidade pleural 4 h após a indução da reação inflamatória ( $\times 10^6$ ) (S:  $1,3 \pm 0,1$ ; Cg:  $5,2 \pm 0,2$ ; 0,5 h:  $2,1 \pm 0,2$ ; 1 h:  $2,1 \pm 0,2$  e 2 h:  $3,3 \pm 0,4$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 17A). Esse efeito inibitório sobre a migração celular, se deu às custas de polimorfonucleares ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,2 \pm 0,03$ ; Cg:  $4,1 \pm 0,3$ ; 0,5 h:  $1,4 \pm 0,2$ ; 1 h:  $0,6 \pm 0,1$  e 2 h:  $1,9 \pm 0,3$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 17B) e mononucleares ( $\times 10^6$ ) (S:  $1,1 \pm 0,09$ ; Cg:  $1,1 \pm 0,1$ ; 0,5 h:  $0,7 \pm 0,06$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 17C). A *Passiflora edulis* Sims (250 mg/kg, i.p.) quando administrada 4 h antes da indução da pleurisia por carragenina, aumentou de forma significativa a migração de leucócitos para a cavidade pleural ( $\times 10^6$ ) (S:  $1,3 \pm 0,1$ ; Cg:  $5,2 \pm 0,2$  e 4 h:  $6,45 \pm 0,5$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 17A) às custas da migração de polimorfonucleares ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,2 \pm 0,03$ ; Cg:  $4,1 \pm 0,3$  e 4 h:  $5,5 \pm 0,5$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 17B).

**Tabela 6:** Percentagem de inibição da *Passiflora edulis* Sims sobre parâmetros inflamatórios: leucócitos totais, polimorfonucleares e mononucleares, na pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos

Dose (mg/kg, i.p.; 0,5 h)	Leucócitos totais (% de inibição)	PMN (% de inibição)	MONO (% de inibição)
Indo 10	$62 \pm 6^{**}$	$84 \pm 4^{**}$	-
Pe 100	$19 \pm 6^*$	$24 \pm 5^*$	-
Pe 250	$60 \pm 5^{**}$	$66 \pm 4^{**}$	$38 \pm 6^*$
Pe 500	$75 \pm 2^{**}$	$78 \pm 2^{**}$	$65 \pm 6^{**}$
Pe 1000	$61 \pm 4^{**}$	$62 \pm 5^{**}$	$53 \pm 6^*$

Cada grupo representa a média das percentagens de inibição  $\pm$  e.p.m de 5 a 10 animais. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos. PMN: polimorfonucleares; MONO: mononucleares; INDO: Indometacina; Pe: *Passiflora edulis*.



**Figura 17:** Efeito do Extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims (250 mg/kg; i.p.) administrado 0,5-4 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia. Efeito do extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims sobre os níveis a migração de leucócitos (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C) para cavidade pleural. Salina = Animais somente tratados com salina estéril (i.pl./cav.), Cg = Animais tratados apenas com Cg e Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) e Cg. Cada grupo representa uma média de 5 a 10 animais e a barra vertical o e.p.m. \* P < 0,05 e \*\* P < 0,01 representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a Cg e os demais grupos.

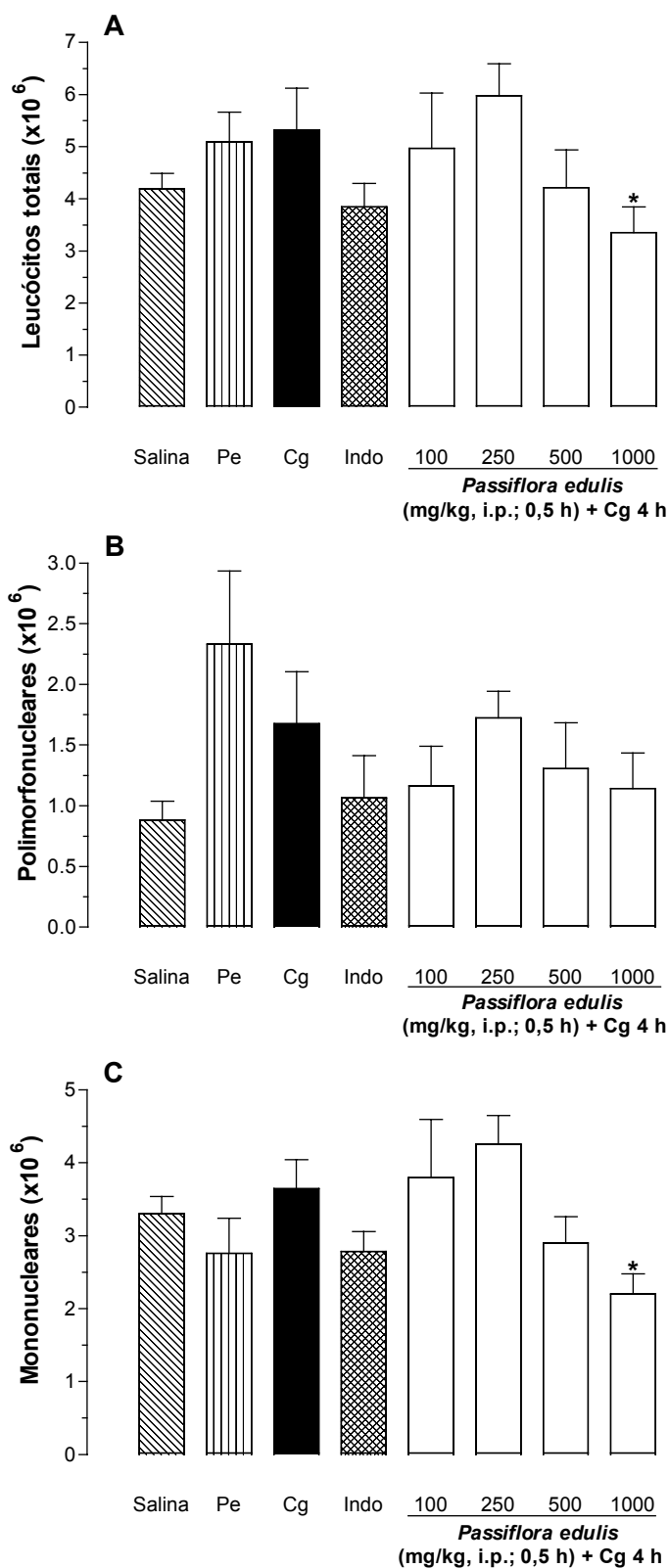
**Tabela 7:** Percentagem de inibição da *Passiflora edulis* Sims (250 mg/kg, i.p.) administrada de 0,5-4 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, sobre os níveis de leucócitos, polimorfonucleares e mononucleares, na pleurisia induzida por Cg, em camundongos

Tempo de tratamento prévio (h)	Leucócitos totais (% de inibição)	PMN (% de inibição)	MONO (% de inibição)
0,5	60 ± 5**	66 ± 4**	38 ± 6*
1	60 ± 4**	86 ± 3**	-
2	36 ± 8**	53 ± 7**	-
4	+ 24 ± 9*	+ 35 ± 12**	-

Cada grupo representa a média das percentagens de inibição ± o e.p.m. de 5 a 10 animais. \*\* P < 0,01 e \* P < 0,05 representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos, (+) Aumento significativo em relação ao grupo tratado com a Cg. PMN: polimorfonucleares; MONO: mononucleares

### 5.2.2 Efeito do extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims sobre os níveis de leucócitos, no sangue de camundongos com pleurisia

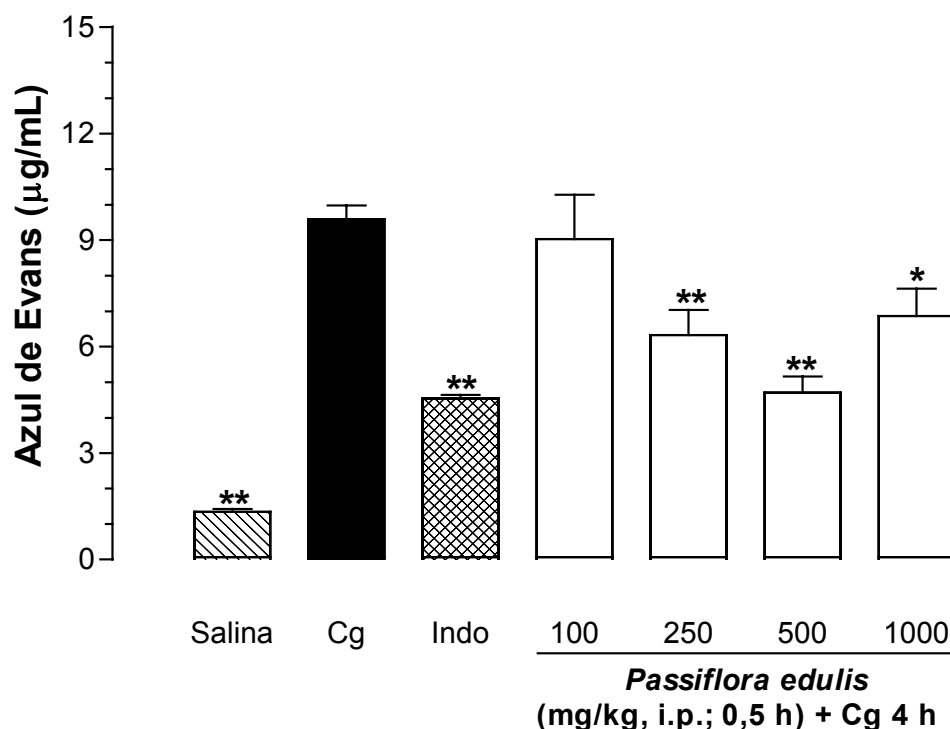
Na análise do efeito sistêmico do extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims (100-1000 mg/kg, i.p.) o hemograma somente revelou alterações significativas quando administrado na dose 1000 mg/kg (i.p.; 0,5 h) nos níveis de leucócitos totais ( $\times 10^6$ ) (S: 4,2 ± 0,3; Cg: 5,3 ± 0,8; 1000 mg/Kg: 3,4 ± 0,5) (P < 0,05) (Figura 18A) e de mononucleares ( $\times 10^6$ ) (S: 3,3 ± 0,2; Cg: 3,7 ± 0,4; 1000 mg/kg: 2,2 ± 0,3) (P < 0,05) (Figura 18C) quando comparados aos animais tratados com carragenina. Não foram observadas alterações significativas nos níveis de leucócitos quando se comparou animais tratados somente com salina a animais tratados somente com *Passiflora edulis* Sims na dose de 250 mg/kg (i.p.) 0,5 antes da administração de salina intrapleural (P > 0,05) (Figura 18 A, B e C). Da mesma forma nenhuma alteração significativa por parte da administração de indometacina (10 mg/kg i.p.; 0,5 h) quando comparada ao grupo-controle foi observada (Figura 18 A, B e C).



**Figura 18:** Efeito de diferentes doses do Extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims (100-1000 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) sobre os níveis de leucócitos no sangue de camundongos com pleurisia. Efeito do Extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims sobre os níveis de leucócitos (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C) no sangue. Salina = Animais somente tratados com salina estéril (i.pl./cav.) Pe = Animais somente tratados somente com Extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims (250 mg/kg; i.p.; 0,5 h antes da salina i.pl.), Cg = Animais tratados apenas com Cg e Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg; i.p.; 0,5 h) e Cg. Cada grupo representa uma média de 4 a 8 animais e a barra vertical o e.p.m. \* P < 0,05 representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a Cg e os demais grupos.

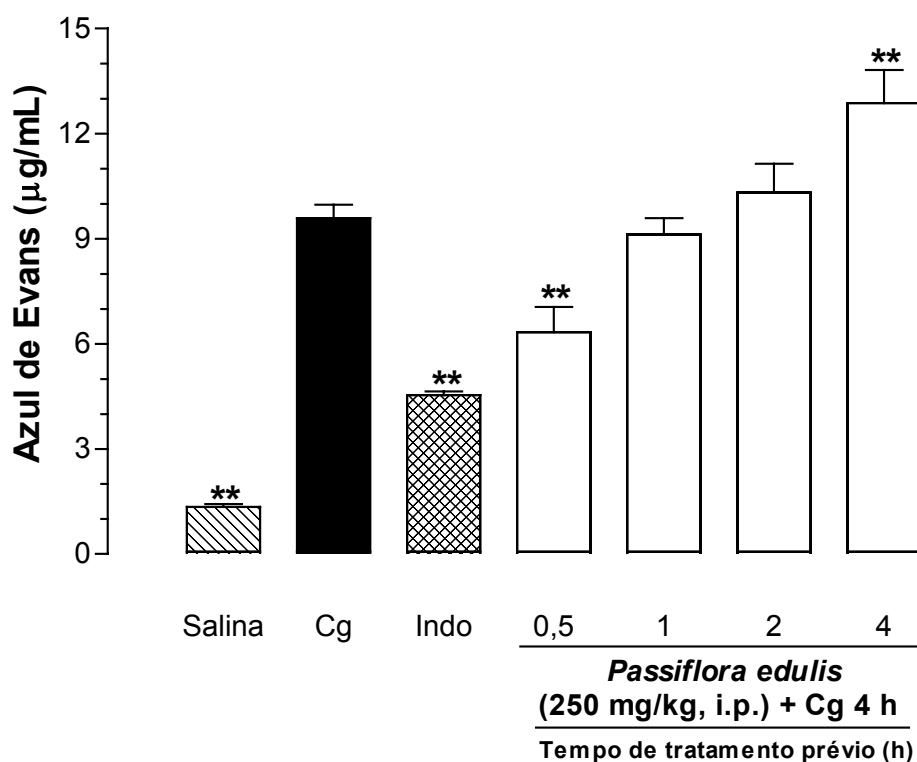
### 5.2.3 Efeito do extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims sobre a exsudação na cavidade pleural de camundongos com pleurisia

A administração do extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims nas doses de 250-1000 mg/Kg, administradas 0,5 h antes da indução da pleurisia, inibiu significativamente os níveis de azul de Evans na cavidade pleural quando comparadas aos animais inflamados ( $\mu\text{g/mL}$ ) (S:  $1,6 \pm 0,09$ ; Cg:  $9,6 \pm 0,4$ ; 250 mg/Kg:  $6,3 \pm 0,7$ ; 500 mg/Kg:  $4,7 \pm 0,5$ ; 1000 mg/Kg:  $6,9 \pm 0,8$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 19). A administração de indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) foi efetiva em inibir a exsudação em nível local ( $\mu\text{g/mL}$ ) (S:  $1,6 \pm 0,09$ ; Cg:  $9,6 \pm 0,4$ ; Indo 10 mg/Kg:  $4,5 \pm 0,09$ ) ( $P < 0,01$ ) quando comparada com os animais tratados com carragenina (Figura 19).



**Figura 19:** Efeito do Extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims (100-1000 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis de exsudação na cavidade pleural. Salina = Animais somente tratados com salina estéril (i.pl./cav.), Cg = Animais tratados apenas com Cg e Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) e Cg. Cada grupo representa uma média de 5 a 10 animais e a barra vertical o e.p.m. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a Cg e os demais grupos.

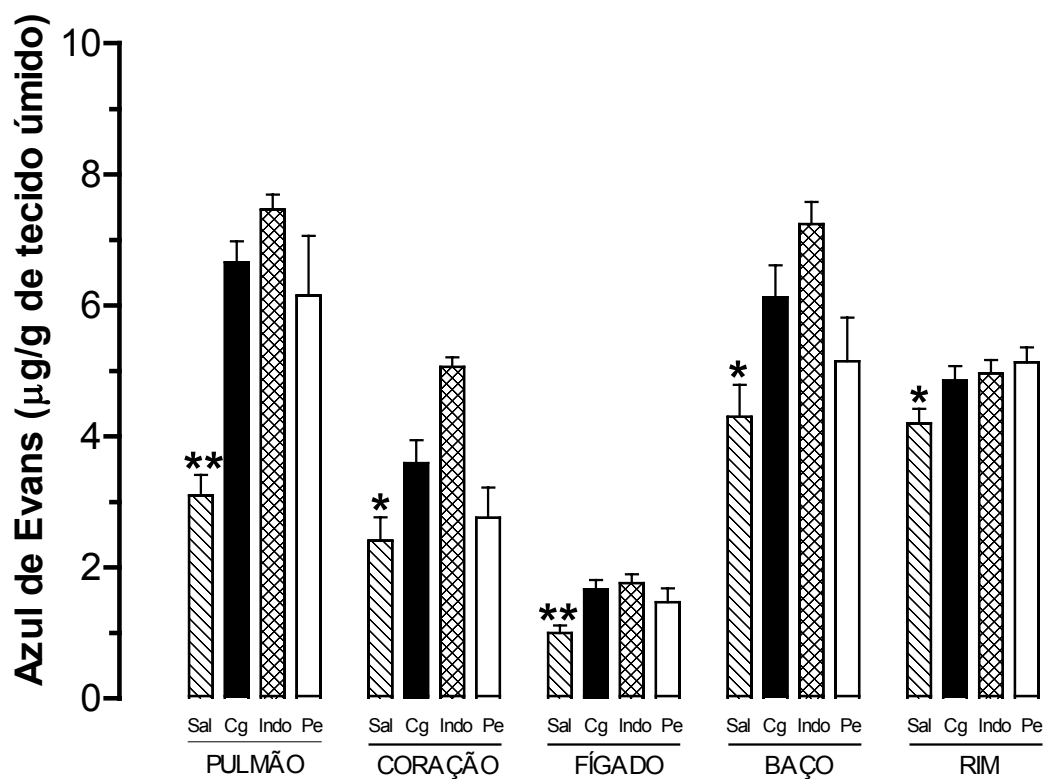
Ao analisarmos o perfil temporal, observamos que o extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims na dose de 250 mg/Kg, somente foi efetivo em inibir significativamente os níveis de azul de Evans na cavidade pleural, quando administrada 0,5 h antes da indução da pleurisia induzida pela carragenina ( $\mu\text{g/mL}$ ) (S:  $1,6 \pm 0,09$ ; Cg:  $9,6 \pm 0,4$  e 0,5 h:  $6,3 \pm 0,7$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 20). Esta mesma dose quando administrada 4 h antes da indução da pleurisia, aumentou significativamente os níveis de azul de Evans ( $\mu\text{g/mL}$ ) (S:  $1,6 \pm 0,09$ ; Cg:  $9,6 \pm 0,4$  e 4 h:  $12,9 \pm 0,9$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 20) quando comparada com o grupo-controle carragenina.



**Figura 20:** Efeito do Extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims (250 mg/kg; i.p.) administrado 0,5-4 h antes da carragenina (Cg 1% / cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis de exsudação na cavidade pleural. Salina = Animais somente tratados com salina estéril (i.pl./cav.), Cg = Animais tratados apenas com Cg e Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) e Cg. Cada grupo representa uma média de 5 a 10 animais e a barra vertical o e.p.m. \*\*  $P < 0,01$  representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a Cg e os demais grupos.

#### 5.2.4 Efeito do extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims sobre a permeabilidade vascular em tecidos (pulmão, coração, baço, fígado e rins) de camundongos com pleurisia

Para a avaliação deste parâmetro inflamatório, os animais foram tratados com o extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims na dose de 250 mg/Kg administrado 0,5 h antes da pleurisia. Nesta dose e intervalo de tratamento prévio, não foi observado uma diminuição significativa dos níveis de azul de Evans ( $\mu\text{g/g}$  de tecido úmido) nos órgãos analisados: pulmão, coração, fígado, baço e rim, quando comparados com os animais controle carragenina ( $P > 0,05$ ) (Figura 21).

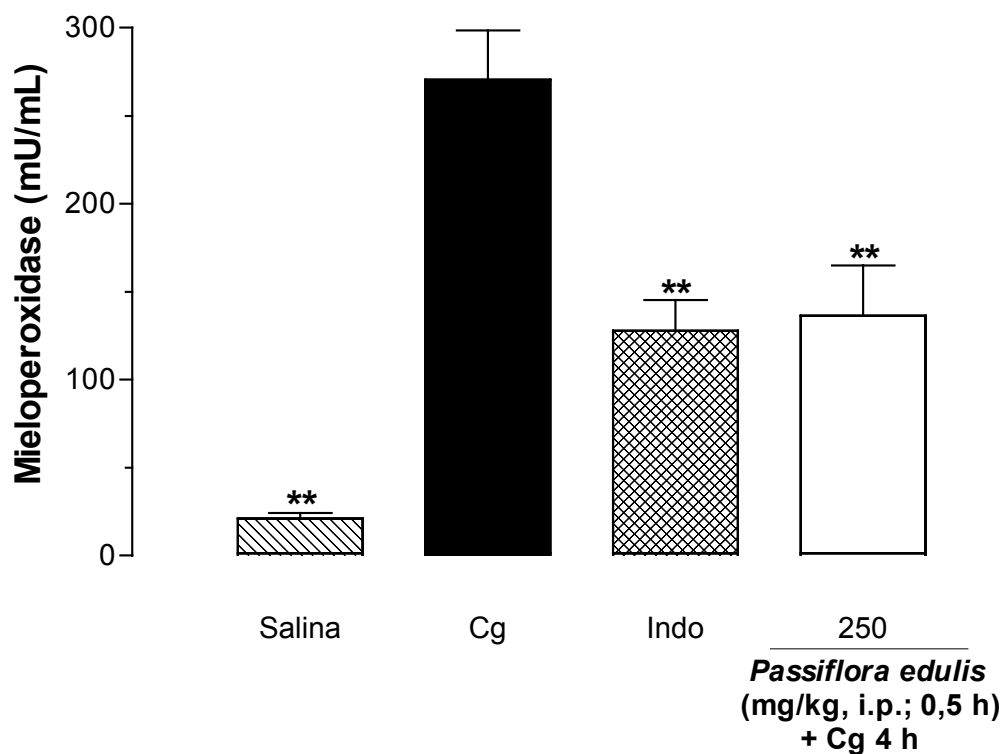


**Figura 21:** Efeito do Extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims (250 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia sobre a permeabilidade vascular em tecidos. Sal = Animais somente tratados com salina estéril (i.pl./cav.), Cg = Animais tratados apenas com Cg, Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) e Cg e Pe = animais tratados com *Passiflora edulis* e Cg. Cada grupo representa uma média de 6 a 13 animais e a barra vertical o e.p.m. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a Cg e os demais grupos.

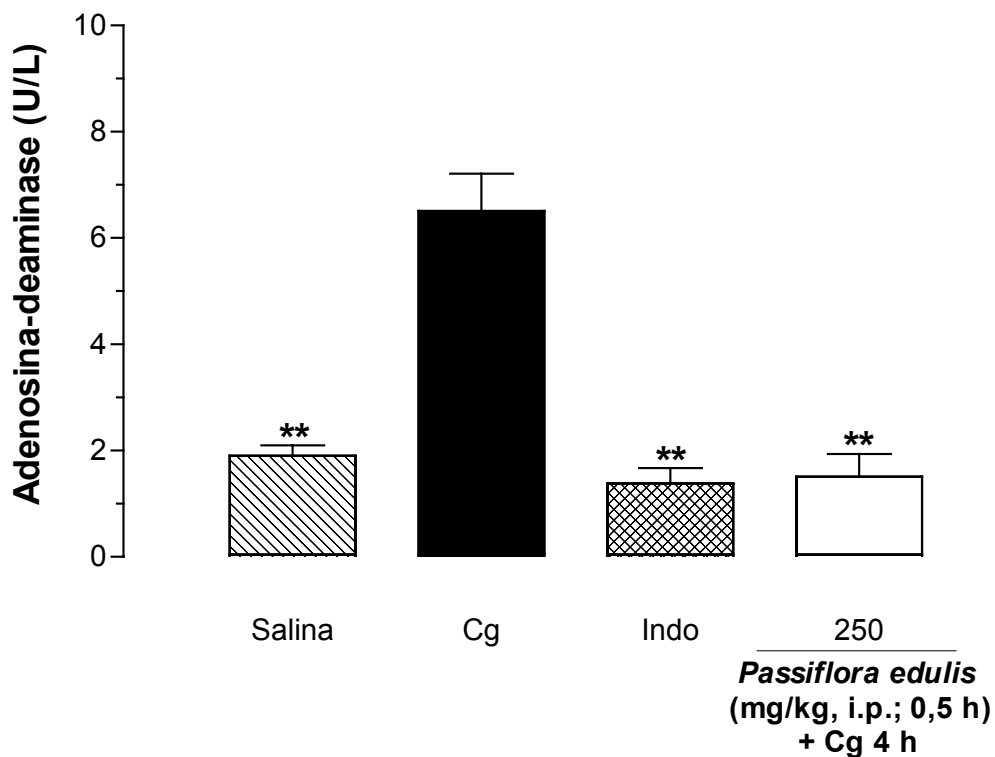
### **5.2.5 Efeito do extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims sobre os níveis de mieloperoxidase (MPO), adenosina-deaminase (ADA) e nitrato/nitrito (NO<sup>x</sup>) no lavado pleural de camundongos com pleurisia**

O extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims (250 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina, inibiu de forma significativa às concentrações de MPO (mU/mL) (S:  $21,0 \pm 3,2$ ; Cg:  $270,5 \pm 28$ ; 250 mg/Kg:  $136,4 \pm 28,5$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 22) e ADA (U/L) (S:  $1,9 \pm 0,2$ ; Cg:  $6,5 \pm 0,7$ ; 250 mg/Kg:  $1,5 \pm 0,4$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 23) na pleurisia induzida pela carragenina, não sendo efetivo nesta dose e intervalo de tratamento prévio em inibir os níveis de nitrito/nitrato (NO<sup>x</sup>) ( $P > 0,05$ ) (Figura 24). Nas mesmas condições experimentais a indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) demonstrou uma diminuição significativa nos níveis de MPO (mU/mL) (S:  $21,0 \pm 3,2$ ; Cg:  $270,5 \pm 28$ ; Indo 10 mg/Kg:  $127,8 \pm 17,4$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 22), ADA (U/L) (S:  $1,9 \pm 0,2$ ; Cg:  $6,5 \pm 0,7$ ; Indo 10 mg/Kg:  $1,4 \pm 0,3$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 23) e nitrito/nitrato (NO<sup>x</sup>) ( $\mu$ M) (S:  $2,9 \pm 0,4$ ; Cg:  $19 \pm 1,3$ ; Indo 10 mg/Kg:  $4,62 \pm 0,8$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 24).

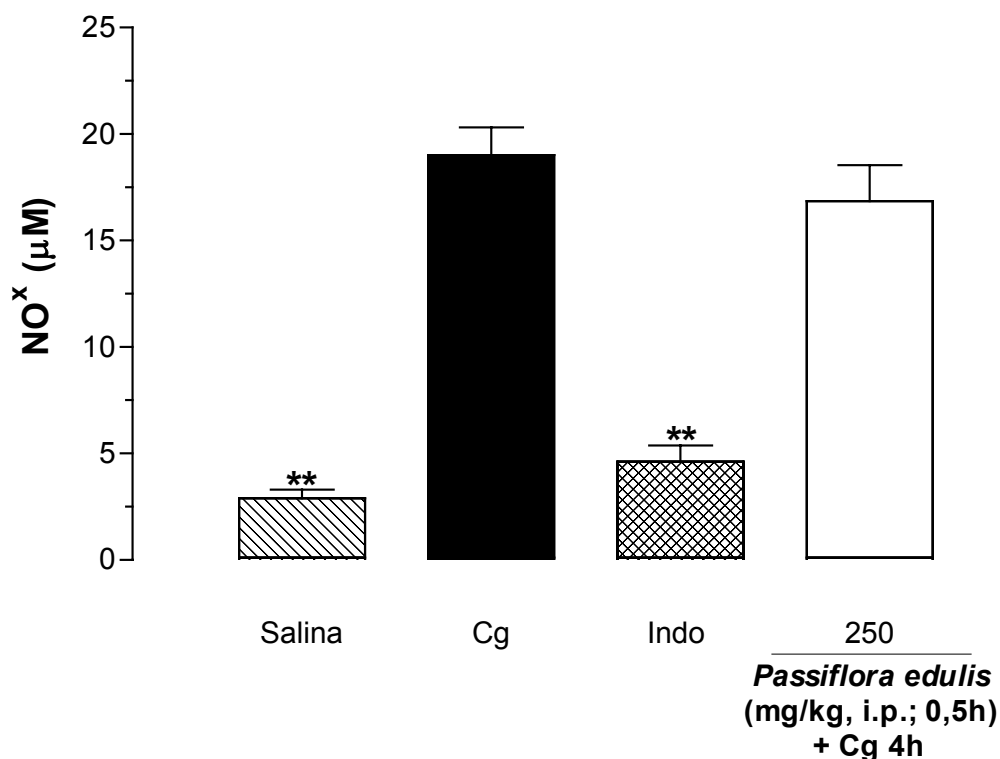




**Figura 22:** Efeito do Extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims (250 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1% / cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis mieloperoxidase. Salina = Animais somente tratados com salina estéril (i.pl./cav.), Cg = Animais tratados apenas com Cg e Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) e Cg. Cada grupo representa uma média de 5 a 9 animais e a barra vertical o e.p.m. \*\* P < 0,01 representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a Cg e os demais grupos.



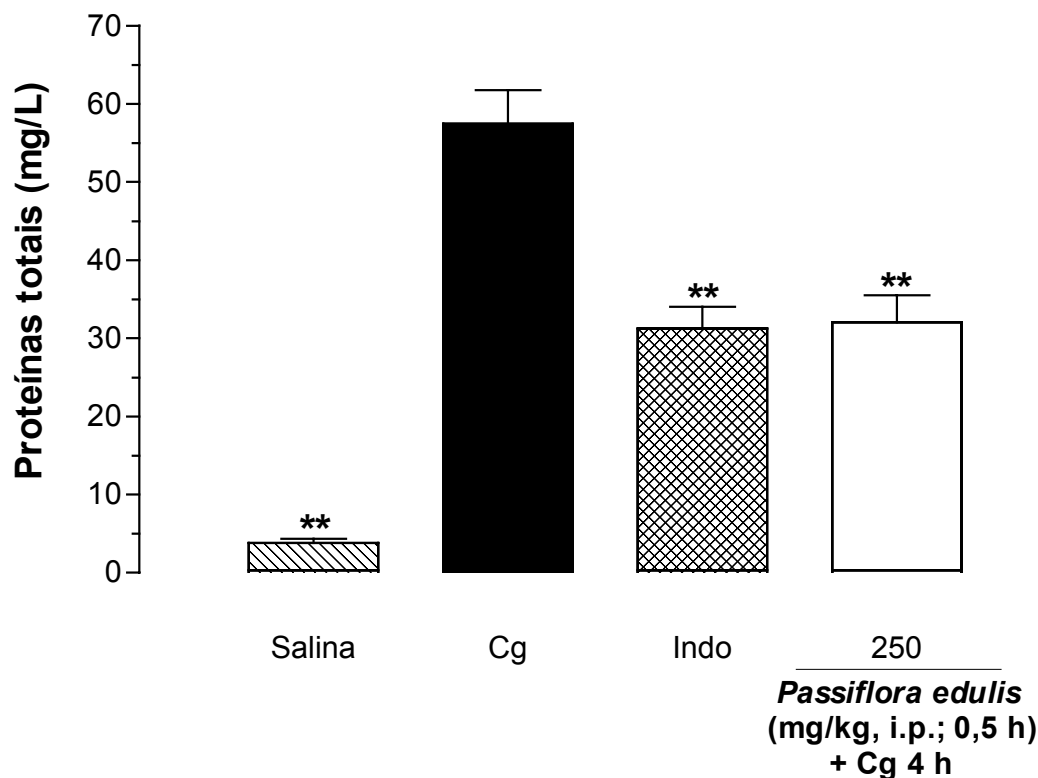
**Figura 23:** Efeito do Extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims (250 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1% / cav.) em camundongos com pleurisia sobre a atividade da adenosina-deaminase. Salina = Animais somente tratados com salina estéril (i.pl./cav.), Cg = Animais tratados apenas com Cg e Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) e Cg. Cada grupo representa uma média de 4 a 10 animais e a barra vertical o e.p.m. \*\* P < 0,01 representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a Cg e os demais grupos.



**Figura 24:** Efeito do Extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims (250 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis de óxido nítrico (NO<sup>x</sup>). Salina = Animais somente tratados com salina estéril (i.pl./cav.), Cg = Animais tratados apenas com Cg e Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) e Cg. Cada grupo representa uma média de 6 a 15 animais e a barra vertical o e.p.m. \*\* P < 0,01 representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a Cg e os demais grupos.

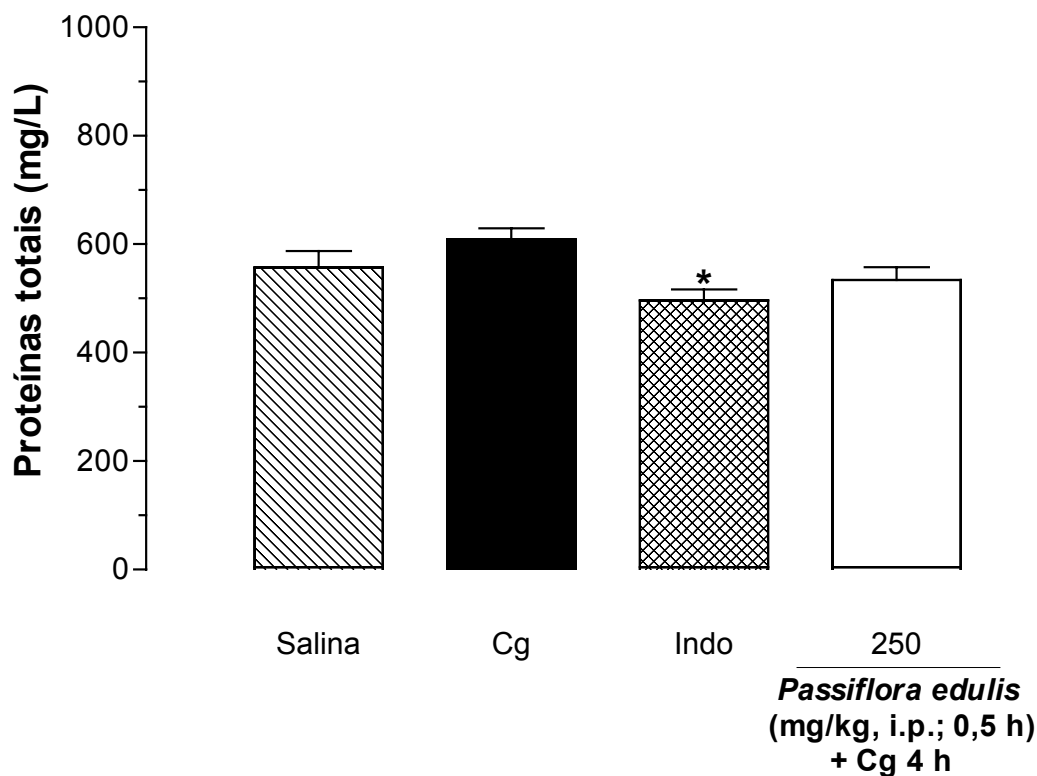
### 5.2.6 Efeito do extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims sobre os níveis de proteínas totais no exsudato e no soro de camundongos com pleurisia

O extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims (250 mg/kg; i.p., 0,5 h) diminuiu significativamente os níveis de proteínas totais no exsudato de animais inflamados, quando comparados com o grupo-controle carragenina (mg/L) (S: 3,8 ± 0,5; Cg: 57,4 ± 4,3; 250 mg/Kg: 32 ± 3,5) (P < 0,01) (Figura 25). Nas mesmas condições experimentais, a indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) demonstrou uma diminuição significativa nos níveis de proteínas totais no exsudato (mg/L) (S: 3,8 ± 0,5; Cg: 57,4 ± 4,3; Indo 10 mg/Kg: 31,2 ± 2,8) (P < 0,01) (Figura 25).



**Figura 25:** Efeito do Extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims (250 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis de proteínas totais no exsudato. Salina = Animais somente tratados com salina estéril (i.pl./cav.), Cg = Animais tratados apenas com Cg e Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) e Cg. Cada grupo representa uma média de 6 a 11 animais e a barra vertical o e.p.m. \*\* P < 0,01 representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a Cg e os demais grupos.

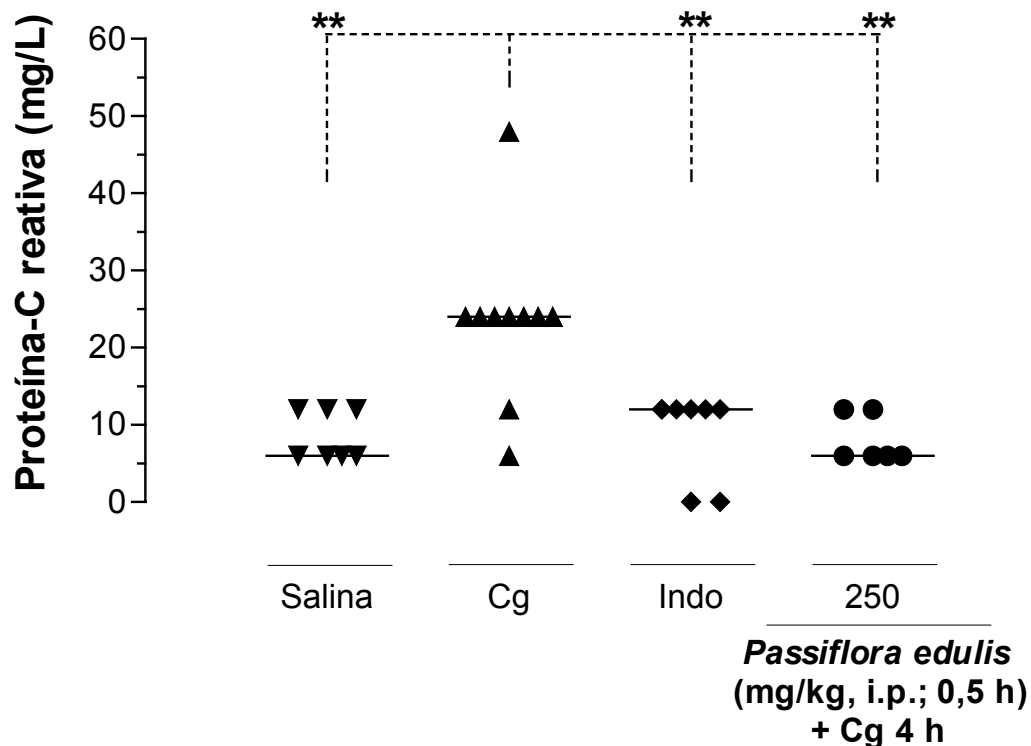
Em relação aos níveis de proteínas totais no soro, o extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims (250 mg/kg; i.p., 0,5 h) não alterou significativamente este parâmetro quando comparado aos animais inflamados ( $P > 0,05$ ) (Figura 26). Já a indometacina, diminuiu significativamente os níveis de proteínas totais séricas quando comparada aos animais inflamados (mg/L) (S:  $557,2 \pm 30,5$ ; Cg:  $609 \pm 20,1$ ; Indo 10 mg/Kg:  $496,4 \pm 18,9$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 26).



**Figura 26:** Efeito do Extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander (100 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/ cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis de proteínas totais no soro. Salina = Animais somente tratados com salina estéril (i.pl./cav.), Cg = Animais tratados apenas com Cg e Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) e Cg. Cada grupo representa uma média de 6 a 11 animais e a barra vertical o e.p.m. \* P < 0,05 representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a Cg e os demais grupos.

### 5.2.7 Efeito do extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims sobre os níveis de proteínas-C reativa no soro de camundongos com pleurisia

A administração do extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims (250 mg/kg; i.p.; 0,5 h) foi efetivo em diminuir significativamente os níveis de proteína-C reativa no soro quando comparada com animais inflamados, controle carragenina (mg/L) (Mediana e amplitude) (S: 9 (5,5-12,5); Cg: 24 (15,7-31,1); 250 mg/Kg: 6 (4,7-11,2) (P < 0,01) (Figura 27). A indometacina (10 mg/kg, i.p.; 0,5 h) foi efetiva em diminuir significativamente os níveis de proteína-C reativa quando comparada ao grupo-controle carragenina (mg/L) (Mediana e amplitude) (S:6 (5,5-12,5); Cg: 24 (15,7-31,1); Indo 10 mg/Kg: 12 (12,0-12,0) (P < 0,01) (Figura 27).



**Figura 27:** Efeito do Extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims (250 mg/kg; i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1% / cav.) em camundongos com pleurisia sobre os níveis de proteína-C reativa no soro. Salina = Animais somente tratados com salina estéril (i.pl./cav.), Cg = Animais tratados apenas com Cg e Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.) e Cg. Cada grupo representa uma média de 6 a 10 animais. Os símbolos representam os valores individuais da PCR e a barra horizontal sobre os símbolos, a mediana. \*\* P < 0,01 representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a Cg e os demais grupos.

As possíveis correlações entre os parâmetros inflamatórios estudados nas amostras de exsudato e soro de animais inflamados e tratados com *Passiflora edulis* Sims, estão listados nas tabelas 8 e 9, respectivamente.

**Tabela 8:** Correlações entre os diversos parâmetros inflamatórios analisados no lavado da cavidade pleural de animais com pleurisia, tratados previamente com o extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims, na pleurisia induzida por Cg, em camundongos

Variáveis	Regressão linear (R)	Correlação de Pearson (r)	Correlação de Spearman (r)
Proteínas totais X Leucócitos totais	0,2411	0,2411	0,1921
Proteínas totais X Azul de Evans	0,2914	0,2914	0,2608
Proteínas totais X PMN	0,2552	0,2552	0,2283
Proteínas totais X MPO	0,6186**	0,6186**	0,6688**
Proteínas totais X ADA	0,4741*	0,4741*	0,5606**
Azul de Evans X Leucócitos totais	0,8137**	0,8137**	0,8065**
Azul de Evans X PMN	0,7366**	0,7366**	0,7524**
Azul de Evans X MPO	0,04632	0,04632	0,0006496
Azul de Evans X ADA	0,04497	0,04497	0,1156
MPO X PMN	0,01187	0,01187	-0,06307
ADA X Leucócitos totais	0,05897	0,05897	-0,01909
ADA X MONO	-0,2891	-0,2891	-0,3551*

Os dados representam os valores estatísticos obtidos através da análise de regressão linear (R), correlação paramétrica de Pearson (r) e não paramétrica de Spearman (r). \* P < 0,05 e \*\* P < 0,01 representam a significância da diferença entre o grupo tratado com carragenina e aqueles tratados com o extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims. PMN: polimorfonucleares; MONO: monucleares MPO: mieloperoxidase; ADA: adenosina-deaminase.

**Tabela 9:** Correlações entre os diversos parâmetros analisados no sangue de animais com pleurisia, tratados previamente com o extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims, na pleurisia induzida por Cg, em camundongos

<b>Variáveis</b>	<b>Regressão linear (R)</b>	<b>Correlação de Pearson (r)</b>	<b>Correlação de Spearman (r)</b>
PCR X Leucocitos totais	-0,05714	-0,05714	-0,1784
PCR X PMN	-0,03037	-0,03037	-0,1478
PCR X MONO	-0,2313	-0,2313	-0,3130
PCR X Proteínas totais	-0,1583	-0,1583	-0,1154

Os dados representam os valores estatísticos obtidos através da análise de regressão linear (R), correlação paramétrica de Pearson (r) e não paramétrica de Spearman (r). PMN: polimorfonucleares; MONO: monucleares MPO: mieloperoxidase; ADA: adenosina-deaminase.

## 6. DISCUSSÃO

Para avaliação da atividade antiinflamatória das espécies selecionadas do gênero *Passiflora*, *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims, utilizou-se o modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. Neste modelo é observado uma significativa resposta inflamatória 4 horas após a indução da pleurisia pela carragenina. Nesta fase ocorre um aumento de leucócitos do tipo polimorfonucleares, aumento da atividade de enzimas relacionadas ao processo de inflamação: mieloperoxidase e adenosina deaminase, aumento dos níveis de metabólitos do óxido nítrico (nitrito e nitrato) e ainda aumento da exsudação tanto pleural (local), como sistêmica (órgãos) (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996; SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1999; FRODE; MEDEIROS, 2001; DALMARCO; FRODE; MEDEIROS 2002; 2004, DA SILVA; FARGES; FRODE, 2004).

De modo geral, ao avaliarmos os efeitos da *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims observamos um perfil antiinflamatório semelhante. No entanto, as diferenças observadas, podem ser explicadas de acordo com estudos realizados por DE-PARIS e colaboradores (2002). Os extratos testados apresentam algumas variações fitoquímicas, as quais podem explicar as diferenças observadas quanto ao perfil de inibição dos parâmetros inflamatórios avaliados no modelo utilizado. Neste estudo os autores demonstraram espectros semelhantes para ambos os extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims, no ultravioleta. No entanto, através da absorção no ultravioleta do complexo  $AlCl_3$ -flavonóide, o extrato da *Passiflora edulis* Sims apresentou um conteúdo total de flavonóides, duas vezes maior que a *Passiflora*



*alata* Dryander. O total de flavonóides nos extratos aquosos em questão foram 4,04% (m/m) e 1,9% (m/m), respectivamente (DE-PARIS et al., 2002).

Na análise conjunta dos resultados obtidos com os extratos aquosos da *Passiflora alata* Dryander ou *Passiflora edulis* Sims, observamos que ambos os extratos, quando administrados sistemicamente (i.p.), foram eficazes em inibir a migração de leucócitos para a cavidade pleural, 4 h após a indução da pleurisia pela carragenina. Esta inibição ocorreu às custas da migração de polimorfonucleares, principais células a migrarem para a cavidade pleural, nesta fase inicial da resposta inflamatória, neste modelo experimental (SALEH CALIXTO; MEDEIROS, 1999). Neste contexto, cabe salientar que a inibição deste parâmetro inflamatório por parte dos extratos aquosos avaliados foi duradoura, uma vez que observamos inibição da migração celular, até mesmo quando os extratos foram administrados 2 h antes da indução da pleurisia induzida por carragenina.

Dentre as hipóteses que podem estar relacionadas à inibição da migração dos leucócitos para cavidade pleural, citam-se: a inibição da produção de substâncias quimiotáticas e/ou a inibição da expressão de moléculas de adesão.

Os leucócitos requerem substâncias que facilitem sua migração para o local onde esta ocorrendo à injúria, inflamação, para então desencadear seus efeitos na tentativa de destruir o agente agressor (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Estas substâncias são denominadas de substâncias quimiotáticas, e dentre elas encontram-se: o leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) (PATCHA et al., 2004; SALLUSTO; MACKAY, 2004; ZHELEV; ALTERAI; CHODNIEWICZ, 2004), o fator ativador de plaquetas (PAF) (ZHELEV; ALTERAI; CHODNIEWICZ, 2004), a proteína do sistema complemento C5a (SALLUSTO; MACKAY, 2004; ZHELEV;

ALTERAI; CHODNIEWICZ, 2004), todas atraentes de neutrófilos. Além disso, as citocinas também são consideradas agentes quimiotáticos, como por exemplo, as quemocinas, responsáveis tanto pela atração como ativação de leucócitos, atuando na regulação da adesão celular, fagocitose, secreção de outras citocinas, apoptose e proliferação celular (CARTIER et al., 2004).

Em relação ao LTB<sub>4</sub>, podemos mencionar que, é um produto derivado do metabolismo do ácido araquidônico, via a ativação da lipooxigenase (5-LOX) (PARENTE; PERRETTI, 2003), o qual apresenta um importante papel na quimiotaxia de neutrófilos, dentre outros efeitos, para o foco da inflamação. SOBOTTKA e colaboradores (2000), estudaram alguns flavonóides do tipo alcoxiflavonol e hidroxiflavonol, e demonstraram para alguns deles e para o conhecido flavonóide antiinflamatório quercetina, efeitos antiinflamatórios *in vivo* e *in vitro*. Nestes estudos foi demonstrado, que os flavonóides inibiram: tanto o edema de pata induzido por carragenina em ratos, quanto às enzimas ciclooxigenase e 5-lipoxigenase, utilizando-se uma suspensão de plaquetas e polimorfonucleares bovinos, estimuladas com ionofóro de cálcio 23187. Já estudos realizados por CHI e colaboradores (2001), demonstraram que alguns dos flavonóides prenilados, isolados de plantas medicinais, além da inibirem, *in vitro*, as enzimas COX-1 (de homogenato de plaquetas bovinas adicionados de ácido araquidônico) e COX-2 (de cultura de células RAW 264,7, com COX-1 inativada por aspirina e COX-2 ativada por LPS), inibem as enzimas 5-LOX (de homogenato de polimorfonucleares bovinos) e 12-LOX (de homogenato de plaquetas bovinas adicionadas de ácido araquidônico). Neste contexto, podemos hipotetizar, que em consequência a uma inibição da via da 5-LOX, por constituintes dos extratos aquosos das espécies testadas, dentre eles os

flavonóides, há uma inibição da formação, dentre outras substâncias, de LTB<sub>4</sub> e conseqüentemente de seu efeito quimioatraente. Desta forma ocorre uma inibição da quimiotaxia de neutrófilos para o foco inflamatório, ou seja, para a cavidade pleural. Da mesma forma, estes extratos poderiam ser efetivos em inibir outros importantes agentes quimiotáticos, tais como, o PAF e/ou frações do sistema complemento.

Durante o processo inflamatório, os leucócitos são recrutados para o sítio da lesão, pela ação de substâncias quimiotáticas, contudo, para que estas células migrem dos vasos sanguíneos para o tecido inflamado, é necessário à participação de moléculas de adesão (HEIDE et al., 2002; CONRAN et al., 2003; KEVIL, 2003). A adesão dos leucócitos circulantes ao endotélio vascular é fundamental para uma efetiva defesa do organismo contra infecções e/ou injúria no local da resposta inflamatória. Portanto, uma outra hipótese para explicar a inibição dos leucócitos, seria que os extratos da *Passiflora alata* Dryander ou *Passiflora edulis* Sims poderiam interferir em qualquer etapa do recrutamento de leucócitos, inibindo a expressão e/ou função das moléculas de adesão, diminuindo a infiltração de células para o local da lesão e assim reduzir a inflamação (HENRICKS; NIJKAMP, 1998).

Estudos realizados por TANG; FISCUS (2001), demonstraram a importância das moléculas de adesão na migração de leucócitos. Nestes estudos, a infiltração de leucócitos no lavado bronco-alveolar, de animais sensibilizados por ovalbumina, foi significativamente reduzido em camundongos deficientes das moléculas de adesão: intercelular (ICAM)-1 ou L-selectina. Em estudos realizados por SINGBARTL; GREEN; LEY (2000), também foi demonstrado a importância da P-selectina na migração de leucócitos, uma vez que animais *knockout* para a molécula de adesão P-selectina, apresentaram uma diminuição significativa da atividade da

mieloperoxidase, indiretamente indicando uma inibição do influxo de neutrófilos, no modelo de falência renal induzida pela isquemia/reperfusão, em camundongos C57BL/6. Além disso, também foi evidenciado neste modelo experimental uma diminuição nos níveis de creatinina e uréia, indicando uma diminuição da falência renal nos animais *knockout* para molécula de adesão P-selectina, quando comparados com os animais do grupo-controle (camundongos inflamados). Outro estudo interessante, que pode auxiliar na compreensão desta hipótese relacionada à eficácia dos extratos na inibição da migração celular para o foco inflamatório, é o descrito por TAKANO-ISHIKAWA e colaboradores (2003). Estes autores demonstraram efeitos inibitórios de flavonóides sobre a expressão da E-selectina em células endoteliais de veias umbilicais humanas, estimuladas por TNF- $\alpha$ , resultados os quais podem auxiliar a compreensão da eficácia de flavonóides como compostos antiinflamatórios. Estudos posteriores deverão ser realizados para confirmar se a inibição da migração de leucócitos para o foco inflamatório deve-se a um efeito sobre a inibição da expressão ou função das moléculas de adesão.

Em relação à duração do efeito antiinflamatório dos extratos sobre a migração de leucócitos para o foco inflamado, propõe-se que tal efeito esteja relacionado à absorção e/ou metabolismo do extrato. Alguns compostos demoram mais para serem absorvidos e/ou para serem metabolizados, permanecendo ativos por um período mais prolongado. Tal hipótese pode ser viável, tendo em vista que os extratos aquosos testados, serem constituídos por mais de um componente, como demonstrado no estudo realizado por DE-PARIS e colaboradores (2002).

Ao avaliarmos os efeitos dos extratos observamos um perfil de ação diferente, sendo que o extrato aquoso de *Passiflora alata* Dryander, de uma forma geral diminuiu significativamente os leucócitos no sangue de animais inflamados,

principalmente as custas de mononucleares. A administração isolada (animais sem indução da inflamação por carragenina) do extrato aquoso da *Passiflora alata* Dryander, evidenciou uma diminuição nos leucócitos circulantes (mononucleares). Já extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims, não alterou significativamente os níveis de leucócitos no sangue de animais inflamados, somente em sua maior dose houve uma diminuição significativa dos leucócitos, as custas de mononucleares. A administração isolada do extrato aquoso da *Passiflora edulis* Sims, não proporcionou alterações significativas nos leucócitos circulantes. As diferenças nos efeitos dos extratos aquosos podem ser explicadas, principalmente por sua distinta composição e/ou presença e teor de alguns flavonóides (DE-PARIS et al., 2002).

A atividade antiinflamatória de muitos fármacos tem sido atribuída à inibição da MPO de leucócitos (VAN ZYL; KRIEGLER; VAN DER WALT, 1993 apud PABUÇCUOGLU et al., 2003, RAMOS; POU; ROSEN, 1995 apud PABUÇCUOGLU et al., 2003). Ao inibir a MPO, estes fármacos, demonstram diminuir a produção de ácido hipocloroso (HOCl) e outras substâncias oxidantes, as quais são extremamente citotóxicas e reativas com moléculas biológicas, culminando na degradação de proteínas estruturais e inativação de enzimas. Neste contexto, NEVE; PARIJ; MOGUILEVSKY (2001), demonstraram que alguns fármacos antiinflamatórios não esteroidais (FAINEs) apresentam efeitos inibitórios sobre a atividade da MPO. Desde que KLEBANOFF (1967 apud WINTERBOURN; VISSERS; KETLE, 2000) demonstrou que a mieloperoxidase possui atividade fortemente bactericida, esta enzima recebeu considerável destaque como um importante componente da atividade antimicrobiana dos neutrófilos e na promoção de lesões teciduais em numerosas doenças inflamatórias.

A MPO é uma proteína presente nos neutrófilos, em maior concentração, encontrando-se também presente nos monócitos (WINTERBOURN; VISSERS; KETLE, 2000). Ela está localizada nos grânulos azurófilos de neutrófilos e no lisossoma de monócitos (KLEBANOFF et al., 1999). A MPO é liberada dos grânulos dos neutrófilos após sua ativação quando, então, pode liberar espécies reativas de oxigênio fazendo, dessa forma, parte do sistema imune inato (GASSER et al., 2003). As espécies reativas de oxigênio formadas podem provocar danos ao tecido e contribuir para a amplificação da resposta inflamatória.

Estudos realizados por 'T HART e colaboradores (1990) (apud MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000), demonstraram que os flavonóides apresentam efeitos inibitórios tanto na liberação de MPO quanto na atividade desta enzima. Neste estudo foi demonstrado que os flavonóides inibiram a liberação/produção de espécies reativas do oxigênio pela ação da MPO, de neutrófilos humanos. Este efeito observado foi quantificado utilizando-se a metodologia da quimiluminescência. Ainda, PINCEMAIL e colaboradores (1988) (apud MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000) demonstraram que o flavonóide quercitina inibiu a MPO de neutrófilos humanos, *in vitro*. Neste contexto, MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES (2000), descreveram que os flavonóides podem inibir a produção do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e do radical hidroxil (OH), bem como a formação do ácido hipocloroso, e do íon hipoclorito ( $OCl^-$ ), via inibição da atividade da MPO.

Em nossos experimentos, ambos os extratos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims, demonstraram serem efetivos em inibir as concentrações da MPO no exsudato pleural de animais inflamados. Este fato evidencia mais uma vez

os efeitos antiinflamatórios dos extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims.

Neste contexto, é importante ressaltar que outros estudos também demonstraram que fármacos com atividade antiinflamatória, como a indometacina, diclofenaco, piroxicam, sulindaco entre outros FAINES, são efetivos em inibir o sistema de geração de radicais livres via MPO (NEVE; PARIJ; MOGUILVSKY, 2001), podendo ser esta inibição um mecanismo importante de seus efeitos antiinflamatórios.

Outro foco, para a avaliação antiinflamatória dos extratos das espécies de *Passiflora* estudadas foi seu efeito sobre a atividade da enzima adenosina-deaminase (ADA). A atividade da ADA está proporcionalmente relacionada à concentração da adenosina, uma vez que em condições de injúria tecidual, como a que ocorre em processos inflamatórios, às células ali ativadas liberam grandes quantidades desta enzima no local da inflamação (BLACKBURN, 2003). Sendo que a ação conjunta da adenosina-quinase e da ADA é a fosforilação e deaminação do autacóide adenosina (CRONSTEIN; NAIME; FIRESTEINM 1995, apud HITOGLOU et al., 2001). Desta forma, a ação da ADA é expressiva para a manutenção do equilíbrio entre a razão: produção-liberação e hidrólise da adenosina. Em certas circunstâncias a ADA pode alterar a concentração extracelular da adenosina via sua degradação (HITOGLOU et al., 2001; YONEYAMA et al., 2002, MABLEY et al., 2003). Portanto, alta atividade da ADA pode estar relacionada a baixas concentrações de adenosina.

Os efeitos observados pela adenosina são pleiotrópicos e dependentes da ativação de receptores. Para adenosina já foram caracterizados farmacologicamente os seguintes receptores:  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$  (FREDHOLM et al., 2001; LINDEN, 2001).

Alguns estudos demonstraram que os níveis do autacóide adenosina podem estar relacionados ao desenvolvimento de uma série de doenças inflamatórias pleurais (SZABO et al., 1998 apud MABLEY et al., 2003). Estudos revelaram que os efeitos da adenosina são mediados parcialmente pela inibição dos efeitos de citocinas pró-inflamatórias e radicais livres (HASKO et al., 2000, apud MABLEY et al., 2003).

Estudos realizados por LEE e colaboradores (2004), utilizando-se camundongos *knockout* para o receptor  $A_1$  e selvagens demonstraram a importância dos efeitos da adenosina ao constatar que um agonista para o receptor  $A_1$  (CCPA), no modelo de isquemia e reperfusão nos rins de camundongos, demonstraram: redução significativa da atividade da MPO, na infiltração de neutrófilos; diminuição da expressão de moléculas de adesão do tipo ICAM-1 e de citocinas do tipo TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Além disso, neste modelo experimental, também foi demonstrado que o antagonista para o receptor  $A_1$  (DPCPX) reverte os efeitos antiinflamatórios mencionados anteriormente.

Atualmente o enfoque para a atividade de novos fármacos com propriedades antiinflamatórias está baseada na ativação de receptores da adenosina, em especial o subtipo ( $A_{2A}$ ) (CRISTALLI et al., 2003, SULLIVAN, 2003). Neste contexto, estudos realizados por SULLIVAN e colaboradores (2004), demonstraram que a ativação de receptores  $A_{2A}$  inibiu a expressão da molécula de adesão do tipo integrina (VLA-4) de neutrófilos humanos estimulados por LPS de *Escherichia coli* ou TNF- $\alpha$ , adicionados de FMLP. FOZARD e colaboradores (2002), também demonstraram que a ativação dos receptores  $A_{2A}$ , por meio do agonista seletivo para este receptor (CGS 21680), inibiu de forma dose-dependente o número de leucócitos, a concentração de proteínas totais, a atividade da mieloperoxidase e da peroxidase no



lavado broncoalveolar de ratos sensibilizados com ovoalbumina, no modelo de inflamação alérgica.

Estudos também demonstraram o efeito da interação da adenosina com o seu receptor tipo 2 ( $A_{2B}$ ). A adenosina e o agonista do receptor  $A_{2B}$  (NECA), significativamente reduziram, *in vitro*, a migração trans-endotelial de leucócitos humanos, ativados por TNF- $\alpha$ , em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). Neste estudo também foi avaliado a capacidade da adenosina em modular a liberação do fator de permeabilidade vascular (VEGF) por neutrófilos ativados. Nesta avaliação, após a incubação dos neutrófilos juntamente com a adenosina, constatou-se que a liberação do VEGF foi inibida de forma dose-dependente pela adenosina. Além disso, neste mesmo estudo observou-se que estes efeitos acima citados foram revertidos pelo 3,7-dimetil-1-propargilxantina, um antagonista dos receptores  $A_2$  (WAKAI et al., 2001).

KRUMP; BERGEAT (1999), demonstraram que a adenosina, em cultura de leucócitos do tipo polimorfonucleares estimulados pelo fator de ativação plaquetária (PAF), inibe a liberação do ácido araquidônico (AA) e conseqüentemente a síntese do eicosanóide pró-inflamatório, o leucotrieno  $B_4$  ( $LTB_4$ ). Além disso, neste estudo observou-se que a teofilina, um antagonista não seletivo dos receptores da adenosina, reverteu o efeito da adenosina, promovendo um significativo aumento na liberação de AA e síntese de  $LTB_4$ .

Efeitos antiinflamatórios da ativação dos receptores  $A_3$  também já foram demonstrados por MABLEY e colaboradores (2003), os quais utilizaram o agonista seletivo deste receptor, o IB-MECA, no modelo de inflamação intestinal induzida pelo dextran, em camundongos. Estes autores evidenciaram uma redução significativa na infiltração de leucócitos para o intestino. Além disso, estes autores observaram

também uma inibição significativa no metabolismo oxidativo associado à infiltração celular e ainda um aumento de peso e redução no sangramento pelas fezes de camundongos com colite induzida por dextran.

No presente trabalho, evidenciamos que os extratos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims inibiram de forma significativa à atividade da ADA no fluido pleural de animais inflamados com carragenina, o que possivelmente resultou em um aumento nos níveis de adenosina no exsudato pleural. Este possível aumento nos níveis de adenosina e conseqüentemente sua maior disponibilidade para deflagrar sua ação, via ativação de seus receptores, poderia também explicar parcialmente, os efeitos antiinflamatórios dos extratos avaliados, tais como a inibição na migração de leucócitos.

Já foi demonstrado em alguns estudos que certos fármacos com efeitos antiinflamatórios agem também via aumento de adenosina nos sítios inflamados e por conseqüência, pela ativação de receptores da adenosina. Dentre eles, encontram-se o consagrado antiinflamatório ácido acetilsalicílico, a aspirina (CRONSTEIN; MONTESINOS; WEISSMANN, 1999), e também a sulfasalazina (GADANGI et al., 1996).

Ainda para o estudo da atividade antiinflamatória destas espécies de *Passiflora*, avaliamos seus efeitos sobre os níveis de exsudação na cavidade pleural. O aumento da exsudação na cavidade dos animais inflamados pode ser mediado, em parte, pelo aumento da formação e/ou liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios. Dentre estes mediadores destacam-se a histamina, o óxido nítrico (NO), a bradicinina (BK), as prostaglandinas (PG) entre outros.

A histamina é uma amina básica formada a partir da histidina. Esta é armazenada em grânulos intracelulares, sendo liberada, após traumas e processos

inflamatórios. Conforme estudos anteriores, foi demonstrado que a histamina através de seus receptores do tipo H<sub>1</sub> aumenta a exsudação e a permeabilidade vascular em pacientes com rinite alérgica (TOGIAS, 2003).

Na pleurisia induzida por carragenina em camundongos, SALEH; CALIXTO; MEDEIROS (1999), demonstraram a participação de receptores H<sub>1</sub> na inflamação gerada 4 h após a indução com o agente flogístico. Tal efeito foi observado quando da utilização do fármaco terfenandina, um antagonista seletivo de receptores histaminérgicos H<sub>1</sub>. Este fármaco inibiu significativamente a migração de leucócitos do tipo polimorfonucleares e os níveis de exsudato na cavidade pleural de animais inflamados com carragenina.

Outro mediador pró-inflamatório importante é a bradicinina, que é um peptídeo vasoativo, sendo liberado, assim como a histamina, após traumas e processos inflamatórios, promovendo relaxamento das arteríolas e constrição das vênulas, gerando um aumento da permeabilidade microvascular e conseqüentemente aumento do extravasamento plasmático (KAPLAN et al., 1998). A maioria dos efeitos pró-inflamatórios da BK são mediados pela ativação do seu receptor B<sub>2</sub> (SALEH et al., 1998), embora existam estudos demonstrando que a ativação do receptor B<sub>1</sub> da BK também está envolvido no aumento da exsudação e da permeabilidade vascular como foi demonstrado por VIANNA; CALIXTO, 1998 e HAYASHI e colaboradores (2002), no modelo da pleurisia induzida pela BK, em camundongos e em ratos, respectivamente.

No modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, SALEH e colaboradores (1998), demonstraram a participação da bradicinina neste modelo de inflamação aguda, uma vez que, a utilização do antagonista seletivo para os receptores B<sub>2</sub> (HOE 140) da BK evidenciou uma diminuição significativa da

exsudação na cavidade pleural dos camundongos com pleurisia. Recentemente, YUHKI e colaboradores (2004), também demonstraram a participação da BK na formação de exsudato neste mesmo modelo experimental. Estes autores demonstraram que à administração do fármaco captopril, um inibidor da quininase, aumentou a formação de exsudato e das prostaglandinas PGE<sub>2</sub> e 6-cetoPGF<sub>1 $\alpha$</sub> , e que a administração do FR173657, um antagonista do receptor B<sub>2</sub> da bradicinina, inibiu a formação do exsudato na cavidade pleural. Estes efeitos da BK na formação do exsudato na cavidade pleural podem ser devido à indução da produção e/ou liberação de citocinas pró-inflamatórias, estimuladas pela BK. HAYASHI e colaboradores (2000) demonstraram que a BK induz, *in vitro*, a síntese das citocinas IL-6 e IL-8, em fibroblastos humanos, via a ativação de receptores B<sub>2</sub>. Além disso, cabe salientar, que alguns trabalhos demonstraram que a BK é capaz de estimular a síntese de citocinas pela ativação do NF- $\kappa$ B como demonstrado por PAN e colaboradores (1998), que evidenciaram a ativação do NF- $\kappa$ B por BK, em cultura de células epiteliais humanas. Neste contexto, HUANG e colaboradores (2003), demonstraram que a BK induz a produção de IL-6 em células humanas da musculatura lisa das vias aéreas e que este efeito é inibido pelo glicocorticóide dexametasona.

Entre a diferentes espécies de prostaglandinas (PGs), a PGI<sub>2</sub> e a PGE<sub>2</sub>, tem sido implicadas, como as PGs responsáveis pela inflamação, uma vez, terem sido detectadas em tecidos e exsudatos de processos inflamatórios e ainda por apresentarem uma ampla variedade de efeitos pro-inflamatórios quando administrados *in vivo* (YUHKI et al., 2004). SALEH; CALIXTO; MEDEIROS (1999) demonstraram a participação de prostanóides na pleurisia induzida por carragenina em camundongos, uma vez que fármacos antiinflamatórios não esteroidais, inibiram

além da migração de leucócitos, a mieloperoxidase e a exsudação pleural. YUHKI e colaboradores (2004), recentemente demonstraram a participação das PGs na formação de exsudato na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, tendo em vista que este parâmetro inflamatório foi inibido pela indometacina. Neste estudo também foi demonstrado que a exsudação pleural, em camundongos *Knockout* para receptores EP1, EP2 e EI das prostaglandinas PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub>, é significativamente reduzida quando comparada com a gerada em camundongos normais, demonstrando claramente a participação das prostaglandinas na formação de exsudato, na pleurisia induzida por carragenina.

Na avaliação dos níveis de exsudação pleural observamos diferenças nos efeitos inibitórios deste parâmetro inflamatório por parte das duas espécies de *Passiflora*, sendo que somente a *Passiflora edulis* Sims, e não a *Passiflora alata* Dryander, nas doses estudadas foi efetiva em inibir os níveis de exsudato pleural de animais inflamados 4 h após a indução.

De acordo com os nossos resultados algumas hipóteses em relação ao efeito antiedematogênico, da *Passiflora edulis* Sims podem ser comentadas. A *Passiflora edulis* Sims não foi efetiva em diminuir significativamente, na dose estudada, os níveis de óxido nítrico da cavidade pleural de animais inflamados. Portanto, supõe-se que a diminuição dos níveis de exsudato pleural não esteja relacionada a efeitos do extrato sobre os níveis de NO. Desta forma, as hipóteses desta ação antiinflamatória poderiam ser atribuídas a inibição de efeitos relacionados a ações das substâncias pró-inflamatórias: histamina, bradicinina e prostaglandinas, mediadores que participam da inflamação induzida por carragenina, e envolvidos na exsudação. Além disso, a efetividade somente da *Passiflora edulis* Sims em inibir o

edema, pode estar relacionada, principalmente, por sua distinta composição e/ou presença e teor de alguns flavonóides (DE-PARIS et al., 2002).

A resposta inflamatória induzida pela carragenina, inicialmente local, na cavidade pleural, torna-se sistêmica, afetando órgãos como: pulmão, coração, fígado, baço e rim. Estudos histológicos já demonstraram que na inflamação sistêmica induzida pela carragenina, estes órgãos exibem claros sinais de inflamação, tais como: infiltração de células e edema (DALMARCO, 2003; DA SILVA, 2004). Estes mesmos autores já demonstraram um aumento da permeabilidade vascular nestes órgãos, em animais com inflamação pleural induzida por carragenina, de maneira indireta pelo acúmulo do corante azul de Evans nestes órgãos.

Em nossos experimentos, observamos também que ambos os extratos aquosos não foram efetivos em inibir significativamente, nas doses testadas, a permeabilidade vascular nos animais inflamados. Como a *Passiflora alata* Dryander já não tinha sido efetiva em inibir a exsudação local, pouco se esperava um efeito sobre este parâmetro inflamatório, em nível sistêmico. Já em relação à *Passiflora edulis* Sims, podemos sugerir que a ineficácia em inibir o edema em nível sistêmico possa ser atribuída à dose utilizada ou pela farmacocinética dos componentes responsáveis por este efeito, além da participação de mediadores pró-inflamatórios distintos aos inibidos por este extrato na inflamação local.

Durante o processo inflamatório, um dos sinais iniciais da inflamação é a formação de edema, que é causado por um fluxo transvascular de um fluido rico em proteínas do compartimento intravascular para o interstício (FRIEDL et al., 1989 apud SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Este processo é desencadeado pela ação de mediadores que modificam a anatomia e as funções dos pequenos

vasos sanguíneos, aumentando a permeabilidade dos capilares e vênulas promovendo a passagem de água e proteínas para o espaço extravascular (DEMLING et al., 1982, apud SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Neste contexto, avaliamos os níveis de proteínas totais na cavidade pleural de animais inflamados e constatamos que somente o extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims foi efetivo em diminuir os níveis de proteínas totais, desta forma demonstrando seu potencial antiedematogênico. Este resultado coincide com aqueles nossos resultados observados pelo qual a *Passiflora edulis* Sims inibiu os níveis de azul de Evans no fluído pleural de animais com pleurisia. Vale a pena comentar que o corante azul de Evans é um corante que mede indiretamente o edema, uma vez que se liga a albumina, substância indicadora indiretamente da formação de edema. Tal efeito, na diminuição de proteínas do exsudato, pode ser atribuído a inibição de mediadores relacionados a este processo. Já a *Passiflora alata* Dryander nas doses estudadas, possivelmente não atua na inibição de mediadores relacionados à formação do edema.

A inflamação e a ativação do sistema imune são caracterizadas pela síntese de proteínas específicas que apresentam papel crucial na defesa do organismo frente a estímulos lesivos (FLOC'H; MELCHIOR; OBLED, 2004). Uma vez desencadeado a resposta inflamatória, há rapidamente a indução da produção de proteínas, denominadas proteínas de fase aguda da inflamação. A proteína-C reativa (PCR) é uma importante proteína de fase aguda, a qual é sintetizada principalmente pelo fígado, a partir de estímulos dentre eles pela ação de diferentes citocinas como a IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  (KUSHNER, 1993; VOLANAKIS, 2001 apud ABLIJ; MEINDER, 2002, FLOC'H; MELCHIOR; OBLED, 2004). Desta forma, a PCR

é amplamente usada como um sensível bioindicador de inflamação aguda (GIFFEN et al., 2003).

Em nossos experimentos constatamos que os extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander ou *Passiflora edulis* Sims, proporcionaram uma inibição significativa dos níveis de PCR no soro de animais inflamados.

Ainda, dentre as hipóteses que estamos propondo para explicarmos os efeitos antiinflamatórios obtidos com os extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims, podemos destacar um possível efeito antiinflamatório via supressão da atividade do NF- $\kappa$ B.

O NF- $\kappa$ B tem sido alvo de muitos estudos, tendo em vista seu papel central na regulação da expressão de genes que codificam importantes moléculas pró-inflamatórias, dentre elas: as citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ), quemocinas (IL-8), moléculas de adesão (ICAM-1) (CHRISTMAN; SADIKOT; BLACKWELL, 2000; TURUTIN et al., 2003) e enzimas (iNOS e COX-2) (CHRISTMAN; SADIKOT; BLACKWELL, 2000). Desta forma, a regulação e o controle da ativação do fator NF- $\kappa$ B, pode ser, portanto uma estratégia terapêutica na liberação de mediadores inflamatórios e da expressão de moléculas de adesão (BREMER; HEINRICH, 2002, ZINGARELLI; SHEEHAN; WONG, 2003).

Neste contexto, estudos *in vitro* realizados por ISHIKAWA e colaboradores (1999) demonstraram que o flavonóide quercetina, desencadeou uma inibição da produção da citocina, proteína quimiotática para monócitos-1 (MCP-1) de células mesangliais ativadas por IL-1, via supressão do NF- $\kappa$ B. RANGAN e colaboradores (1999), também demonstraram efeitos inibitórios, por parte do flavonóide quercetina, na indução de substâncias pró-inflamatórias em células tubulares proximal de ratos, induzidas por LPS, via supressão da indução da transcrição de proteínas pelo NF-



$\kappa$ B. Dentre as hipóteses postuladas para este efeito, estes autores destacaram uma possível ação antioxidante do flavonóide, tendo em vista que o NF- $\kappa$ B é sensível a reações de redução e oxidação, e ainda ser ativado pelo *stress* oxidativo. Desta forma, os antioxidantes podem ser considerados como potenciais inibidores do NF- $\kappa$ B (ZINGARELLI; SHEEHAN; WONG, 2003).

Estudos realizados por BUDZIANOWSKI; PAKULSKI; ROBAK (1991) demonstraram efeito antioxidante dos flavonóides orientina e isoorientina. Em 2003, MUN'IM; NEGISHI; OZAWA, também demonstraram efeitos antioxidantes para orientina e isoorientina, nos modelos de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) e peroxidação do ácido linoléico. Estes autores também demonstraram um efeito protetor destas substâncias contra a ação bactericida, frente a *Staphylococcus aureus*, do oxidante radical peroxil, protegendo esta bactéria dos efeitos deletérios deste oxidante. LIN e colaboradores (2002), demonstraram que a isovitexina, protegeu células HL-60 da ação de espécies reativas do oxigênio produzidas pela enzima xantina-oxidase, protege o DNA dos danos da reação de Fenton e ainda, suprime significativamente a produção de peróxido de hidrogênio de células ovarianas A2780, induzidas pelo cádmio. Ainda é importante relatar que os flavonóides, em um contexto geral, apresentam diversas propriedades antioxidantes, desde a atuação na regulação da produção e liberação de espécies reativas do oxigênio por parte de células fagocíticas, até a ações sobre a peroxidação lípidica em muitas moléculas biológicas (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000).

Assim, propomos a hipótese de uma possível inibição do NF- $\kappa$ B via efeitos antioxidantes exercidos pelos extratos testados, os quais apresentam em sua constituição flavonóides, dentre eles os já demonstrados exercerem efeitos

antioxidantes, a orientina, a isoorientina e a isovitexina, presentes na *Passiflora edulis* Sims (DE-PARIS et al., 2002). Assim uma inibição deste fator de transcrição, NF- $\kappa$ B, além de inibir a produção de mediadores, tais como os eicosanóides, as citocinas pró-inflamatórias, dentre elas a interleucina-8 (IL-8), quimiotática para neutrófilos, poderá haver também uma inibição de moléculas de adesão, e conseqüentemente uma inibição na migração de neutrófilos, para o local da injúria.

Além disso, um possível efeito antioxidante por parte dos extratos poderia estar prevenindo diretamente os danos gerados por radicais livres, uma vez que estes estão associados, como um evento primário na progressão de doenças em humanos ou como uma conseqüência secundária da injúria tecidual (HALLIWELL et al., 1992, apud MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000).

Por fim, os resultados obtidos em nosso trabalho demonstraram que os extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims, possuem importantes propriedades antiinflamatórias, diferindo em alguns parâmetros. Ambos os extratos demonstraram ser eficazes em inibir a inflamação induzida pela carragenina em camundongos, pela a capacidade de inibir significativamente os parâmetros inflamatórios: migração celular, mieloperoxidase, adenosina deaminase, a proteína-C reativa. Porém, o extrato aquoso de *Passiflora edulis* Sims, além de inibir os parâmetros anteriormente citados, inibiu também a exsudação local e ainda os níveis de proteínas totais na cavidade pleural.

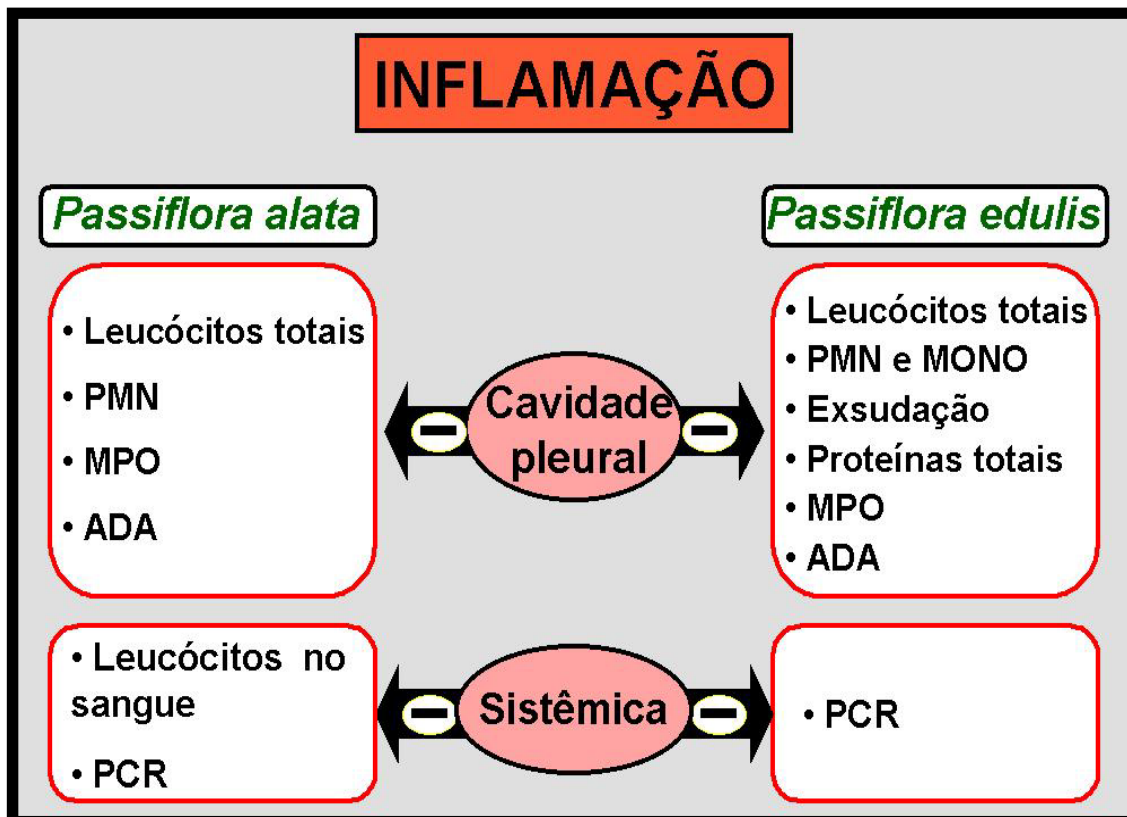
Assim, futuros estudos com os extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims, englobando a extração, separação, identificação e avaliação farmacológica de suas substâncias, poderão revelar se estes efeitos antiinflamatórios pertencem a uma substância em particular, ou ao extrato como um todo, via efeitos sinérgicos entre substâncias.

## 7. CONCLUSÕES

1. Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que os extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims possuem importantes efeitos antiinflamatórios no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos, pois inibiram:
  - A migração de leucócitos para a cavidade pleural;
  - As enzimas que participam do processo inflamatório, neste modelo experimental, a MPO e a ADA;
  - Os níveis de proteína-C reativa no soro de animais inflamados;
2. A *Passiflora alata* Dryander diminuiu significativamente os níveis de leucócitos no sangue: de animais inflamados (as custas de mononucleares), e de animais somente tratados com salina.
3. A *Passiflora edulis* Sims ainda foi efetiva em inibir, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, os parâmetros inflamatórios:
  - Formação do edema na cavidade pleural;
  - Níveis de proteínas totais no exsudato pleural;
4. Observamos diferenças no perfil antiinflamatório dos extratos, sendo que a *Passiflora edulis* Sims, inibiu além dos parâmetros migração de leucócitos, MPO, ADA e PCR ainda a exsudação e os níveis de proteínas na cavidade pleural. Tais efeitos podem estar relacionados a diferenças em seu conteúdo e composição,

no entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar melhor o mecanismo de ação antiinflamatório dos extratos estudados.

A figura 28 representa um resumo dos efeitos antiinflamatórios dos extratos aquosos da *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims, no modelo da pleurisia induzida por carragenina em camundongos.



**Figura 28:** Resumo dos efeitos antiinflamatórios dos extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. PMN: polimorfonucleares; MONO: mononucleares; MPO: mieloperoxidase; ADA: adenosina-deaminase; PCR: proteína-C reativa.

## 8. PERSPECTIVAS

1. Avaliar o mecanismo de ação dos extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims utilizando-se diferentes agentes flogísticos, bradicinina, substância P e histamina, no modelo da pleurisia, em camundongos;
2. Avaliar compostos isolados da fração aquosa de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims;
3. Avaliar a participação de citocinas e das moléculas de adesão no efeito antiinflamatório dos extratos aquosos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims;
4. Avaliar o efeito dos extratos e compostos isolados, quando administrados por via oral, em modelos de inflamação.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, v. 357, p. 593-615, 2001.
- ALI, H.; HARIBABU, B.; RICHARDSON, R.M.; SNYDERMAN, R.C. Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. *Med Clin North Am*, v. 81, p. 1-28, 1997.
- AMARAL, K.M.; SCHENKEL, E.P.; LANGELOH, A. Avaliação da toxicidade reprodutiva dos extratos aquosos liofilizados de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims em ratas Wistar. *Acta Farm Bonaerense*, v. 20, p. 215-220, 2001.
- BALDWIN, A.S. The NF- $\kappa$ B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Ann Rev Immunol*, v. 14, p. 649-683, 1996.
- BARNES, P.J.; CHUNG, K.F.; PAGE, C.P. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol Rev*, v. 50, p. 515-596, 1998.
- BENJAMINI, E.; COICO, R.; SUNSHINE, G. *Imunologia*. 4ª Ed. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan, 2002. p. 9-21.
- BIASI, D.; CARLETTO, A.; CARAMASCHI, P.; BONELLA, F.; BAMBARA, V.; PACOR, M.L.; BAMBARA, L.M. Neutrophils in rheumatoid inflammation. *Recenti Prog Med*, v. 94, p. 25-30, 2003.
- BLACKBURN, M.R. Too much of a good thing: adenosine overload in adenosine-deaminase-deficient mice. *Trends Pharmacol Sci*, v. 24, p. 66-70, 2003.
- BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J. *Herbal Medicine: Expanded Commission E monographs*. Austin: American Botanical Council, 2000. p. 293-296.
- BORRELLI, F.; PINTO, L.; IZZO, A.A.; MASCOLO, N.; CAPASSO, F. Anti-inflammatory activity of *Passiflora incarnata* L. in rats. *Phytother Res*, v. 10, p. 104-106, 1996.
- BREMER, P.; HEINRICH, M. Natural products as targeted modulators of the nuclear factor-kappaB pathway. *J Pharm Pharmacol*, v. 54, p. 453-472, 2002.
- BUDZIANOWSKI, J.; PAKULSKI, G.; ROBAK, J. Studies on antioxidative activity of some C-glycosylflavones. *Pol J Pharmacol Pharm*. v. 43, p. 395-401, 1991.
- BUT, P.G.; MURAV'EV, R.A.; FOMINA, V.A.; ROGOVIN, V.V. Antimicrobial activity of myeloperoxidase from neutrophilic peroxisome. *Biol Bull*, v. 29, p. 266-270, 2002.
- CARRAWAY, M.S.; WELTY-WOLF, K.E.; MILLER, D.L.; ORTEL, T.L.; IDELL, S.; GHIO, A.J.; PETERSEN, L.C.; PIANTADOSI, C.A. Blockade of tissue factor: treatment for organ injury in established sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*., v. 167, p. 1200-1209, 2003.

CARTIER, L.; HARTLEY, O.; DUBOIS-DAUPHIN, M.; KRAUSE, K-H. Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev*, 2004. Article in press.

CHASSAGNE, D.; CROUZET, J. A.; BAYONOVE, C. L.; BAUMES, R. L. Identification and quantification of passion fruit cyanogenic glycosides. *J Agric Food Chem*, v. 44, p. 3817-3820, 1996.

CHASSAGNE, D.; CROUZET, J. A cyanogenic glycoside from *Passiflora edulis* fruit. *Phytochemistry*, v. 49, p. 757-759, 1998.

CHI, Y.S.; JONG, H.G.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; KANG, S.S.; KIM, H.P. Effects of naturally prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochem Pharmacol*, v. 62, p. 1185-1191, 2001.

CHRISTMAN, J.W.; SADIKOT, R.T.; BLACKWELL, T.S. The role of nuclear factor- $\kappa$ B in pulmonare disease. *Chest*, v. 5, p. 1482-1487, 2000.

CIRINO, C.; FIORUCCI, S.; SESSA, W.C. Endothelial nitric oxide synthase: the cinderella of inflammation? *Trends in Pharmacol Sci.*, v. 24, p. 91-95, 2003.

COLE, D.S.; MORGAN, B.P. Beyond lysis: how complement influences cell fate. *Clinical science*, v. 104, p. 455-466, 2003 apud SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, v.18, p. 385-405, 2004.

CONRAN, N.; GAMBERO, A.; FERREIRA, H.H.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; Nitric oxide has a role in regulating VLA-4-integrin expresión on the human neutrophil cell surface. *Biochem Pharmacol*. v. 66, p. 43-50, 2003.

COUTURE, R.; HARRISSON, M.; VIANNA, R.M.; CLOUTIER, F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol*, v. 429, p. 161-176, 2001.

CRISTALLI, G.; LAMBERTUCCI, C.; TAIF, S.; VITTORI, S.; VOLPINI, R. Medicinal chemistry of adenosine A2A receptor agonist. *Curr Top Med Chem*, v .3, p. 387-401, 2003.

CRONSTEIN, B.N.; MONTESINOS, M.C.; WEISSMANN G. Salicylates and sulfasalazine, but not glucocorticoids, inhibit leukocyte accumulation by an adenosine-dependent mechanism that is independent of inhibition of prostaglandin synthesis and p105 of NF $\kappa$ B. *Proc Natl Acad Sci U S.A.*, v. 96, p. 6377-6381, 1999.

CRONSTEIN, B.N.; NAIME, D.; FIRESTEIN, G. The anti-inflammatory effects of an adenosine kinase inhibitor are mediated by adenosine. *Arthritis Rheum*, v. 38, p. 1040-1045, 1995 apud HITOGLOU, S.; HATZISTILIANOU, M.; GOUGOUSTAMOU, D.; ATHANASSIADOU, F.; KOTSIS, A.; CATRIU, D. Adenosine-deaminase activity and its isoenzyme pattern in patients with juvenile rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*, v. 20, p. 411-416, 2001.

CROSS, S.S.; BURY, J.P. Molecular biology in diagnostic histopathology: part II-cell adhesion molecules. *Curr Diag Path*, v. 9, p. 313-321, 2003.

CUZZOCREA, S., SAUTEBIN, L., DE SARRO, G., COSTANTINO, G., ROMBOLA, L., MAZZON, E., IALENTI, A., DE SARRO, A., CILIBERTO, G., DI ROSA, M., CAPUTI, A.P., THIEMERMANN, C. Role of IL-6 in the pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *J Immunol*, v. 163, p. 5094-5104, 1999.

CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; CALABRO, G.; DUGO, L.; DE SARRO, A.; VAN DE LOO, F.A.; CAPUTI, A.P. Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 162, p. 1859-1866, 2000.

CUZZOCREA, S.; ROSSI, A.; SERRAINO, I.; MAZZON, E.; DI PAOLA, R.; DUGO, L.; GENOVESE, T.; CALABRO, G.; CAPUTI, A.P.; SAUTEBIN, L. 5-Lipoxygenase knockout mice exhibit a resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *J Leukoc Biol*, v. 73, p. 739-746, 2003.

D'ACQUISTO, F.; IANARO, A.; IALENTI, A.; IUVONE, T.; COLANTUONI, V.; CARNUCCIO, R. Activation of nuclear transcription factor  $\kappa$ B in rat carragenin-induced pleurisy. *Eur J Pharmacol*, v. 36 p. 233-236, 1999.

D'OLIVEIRA, H.V. *Systema de Materia Medica Vegetal Brasileira*. Rio de Janeiro, Brasil: Eduardo & Henrique Laemmert, 1854. p. 58.

DA SILVA, M.B.S. *Efeito antiinflamatório dos ligantes do receptor benzodiazepínico periférico (PK 11195 e Ro5-4864) no modelo da pleurisia induzida por carragenina, em camundongos*. 2004. 156 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Programa de Pós-graduação em Farmácia. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil. 2004.

DA SILVA, M.B.; FARGES, R.C. FRODE, T.S. Involvement of steroids in anti-inflammatory effects of PK11195 in a murine model of pleurisy. *Mediators Inflamm*. v. 13, p. 93-103, 2004.

DALMARCO, E.M. *Análise da atividade antiinflamatória do metotrexato e da ciclosporina A, no modelo da pleurisia induzida por carragenina, em camundongos*. 2003. 136 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Programa de Pós-graduação em Farmácia. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil. 2003.

DALMARCO, E.M.; FRODE, T.S.; MEDEIROS, Y.S., Effects of methotrexate upon inflammatory parameters induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators Inflamm*, v. 11, p. 299-306, 2002.

DALMARCO, E.M.; FRODE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. Additional evidence of acute anti-inflammatory effects of cyclosporin A in a murine model of pleurisy. *Transpl Immunol*, v. 12, p. 151-157, 2004.



DE SOUZA, K.C.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L.; ORTEGA, G.G. The adjuvants aerosil 200 and Gelita-Sol-P influence on the technological characteristics of spray-dried powders from *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*. *Drug Dev Ind Pharm*, v. 26, p. 331-336, 2000.

DEMLING, R.H.; HARMS, B.; KRAMER, G.; GUNTHER, R. Acute versus sustained hypoproteinemia and posttraumatic pulmonary edema. *Surgery*, v. 92, p. 79-86, 1982 apud SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, v. 18, p. 385-405, 2004.

DE-PARIS, F.; PETRY, R.D.; REGINATTO, F.; GOSMANN, G.; SALGUEIRO, J.B.; QUEVEDO, J.; KAPEZINSKI, F.; ORTEGA, G.G., SCHENKEL, E.P. Pharmacochemical Study of Aqueous Extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. *Acta Farm Bonaerense*, v. 21, p. 5-8, 2002.

DER MARDEROSIAN, A; BEUTLER, J.A. The review of natural products. Saint Louis, USA: Facts and Comparisons, 2002. p. 455-458.

DHAWAN; K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Anxiolytic activity of aerial and underground parts of *Passiflora incarnata*. *Fitoterapia*, v. 72, p. 922-926, 2001.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Suppression of alcohol-cessation-oriented hyper-anxiety by the benzoflavone moiety of *Passiflora incarnata* Linneaus in mice. *J Ethnopharmacol*, v. 81, p. 239-244, 2002.

DHAWAN, K; SHARMA, A. Antitussive activity of the methanol extract of *Passiflora incarnata* leaves: *Fitoterapia*, v. 73, p. 397-399, 2002.a

DHAWAN, K; SHARMA, A. Prevention of chronic alcohol and nicotine-induced azospermia, sterility and decreased libid, by a novel tri-substituted benzoflavone moiety from *Passiflora incarnata* Linneaus in healthy male rats. *Life Sci*, 71, 3059-3069, 2002. b

DINARELLO, C.A. Proinflammatory cytokines. *Chest*, v. 118, p. 503-508, 2000.

DI ROSA, M.; LALENTI, A.; IANARO, A.; SAUTENBIN, L. Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathway. *Prostag Leukot Ess*, v. 54, p. 229-238, 1996.

DU CLOS, T.W.; MOLD, C. The role of C-reactive protein in the resolution of bacterial infection. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 14, p. 289-293, 2001 apud MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J*, v. 168, p. 28-40, 2004.

ESCOPE. *Passiflora Herba*: Monographs on the medicinal uses of plant drugs, Fascicule 4. Exeter, United kingdom, 1997. p. 1-5.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. CUNHA, F.A.; OLIVEIRA, E.; SUASSUNA, I.; SILVA, J.A.P.; SOLLERO, L.; NOBREGA, M.A.; COSTA, P.D. (eds). 3<sup>a</sup> Ed. São Paulo, Brasil: Andrei, 1977. p. 839.

- FAURSCHOU, M; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*, v. 5, p. 1317-1327, 2003.
- FISHELSON, Z. C3: a molecular mosaic of binding sites. *Mol Immunol*, v. 28, p. 545-552, 1991 apud SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, v. 18, p. 385-405, 2004.
- FITZGERALD, G.A.; PATRONO, C. The COXIBS, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *New Engl J Med*, v. 345, p. 433-442, 2001.
- FLOCH, N.L.; MELCHIOR, D.; OBLED, C. Modifications of protein and amino acid metabolism during inflammation and immune system activation. *Livestock Production Sci*, v. 7, p. 37-45, 2004.
- FORSTERMANN, U.; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schimiedebergs Arch Pharmacol*, v. 352, p. 351-364, 1995.
- FOZARD, J.R.; ELLIS, K.M.; VILLELA DANTAS, M.F.; TIGANI, B.; MAZZONI, L. Effects of CGS 21680, a selective adenosine A2A receptor agonist, on allergic airways inflammation in the rat. *Eur J Pharmacol*, v. 438, p. 183-188, 2002.
- FRANGOIANNIS, N.G.; SMITH, C.W.; ENTMAN, M.L. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, v. 53, p. 31-47, 2002.
- FREDHOLM, B.B.; IJZERMAN, A.P.; JACOBSON, K.A.; KLOTZ, K.N.; LINDEN J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Ver*, 53: 527-52, 2001.
- FRIEDL, H.P.; TILL, G.O.; TRENTZ, O.; WARD, P.A. Roles of histamine, complement and xanthine oxidase in thermal injury of skin. *Am J Pathol*, v. 135, p. 203-217, 1989 apud SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, v. 18, p. 385-405, 2004.
- FRODE-SALEH, T.S.; CALIXTO, J.B. Synergistic antiinflammatory effect of NF-kappaB inhibitors and steroidal or non steroidal antiinflammatory drugs in the pleural inflammation induced by carrageenan in mice. *Inflamm Res*, v. 49, p. 330-337, 2000.
- FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators Inflamm*, v. 10, p. 223-227, 2001.
- FRÖDE, T.S.; SOUZA, G.E.; CALIXTO, J.B. The effects of IL-6 and IL-10 and their specific antibodies in the acute inflammatory response induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine*, v. 17, p. 149-156, 2002.
- GADANGI, P.; LONGAKER, M.; NAIME, D.; LEVIN, R.I.; RECHT, P.A.; MONTESINOS, M.C.; BUCKLEY, M.T.; CARLIN, G.; CRONSTEIN, B.N. The anti-inflammatory mechanism of sulfasalazine is related to adenosine release at inflamed sites. *J Immunol*, v. 156, p. 1937-1941, 1996.

GARCIA, E.S.; SILVA, A.C.P.; GILBERT, B.; CORRÊA, C.B.V.; CAVALHEIRO, M.S.V.; SANTOS, R.R.; TOMASINI, T. *Fitoterápicos*. Campinas: André Tosello, p.17, 1996 apud NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Geográficos, Legais e Éticos in: *Farmacognosia da Planta ao medicamento*. 5ª Ed. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL E.P., GOSMANN G.; DE MELLO J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK P.R. (eds). Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/UFRGS/ Editora UFSC/ Brasil, 2003. p. 13-28.

GASSER, O.; HESS, C.; MIOT, S.; DEON, C.; SANCHEZ, J.C.; SCHIFFERLI, J.A. Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Exp Cell Res*, v. 285, p. 243-257, 2003.

GAUT, J.P.; YEH, G.C.; TRAN, H.D.; BYUN, J.; HENDERSON, J.P.; RICHTER, G.M.; BRENNAN, M.L.; LUSIS, A.J.; BELAAOUAJ, A.; HOTCHKISS, R.S.; HEINECKE, J.W. Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, v. 98, p. 11961-11966, 2001.

GHOSH, S.; MAY, M.J.; KOPP, E.B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Ann Rev Immunol*, v. 16, p. 225-260, 1998.

GIFFEN, P.S.; TURTON, J.; ANDREWS, C.M.; BARRETT, P.; CLARKE, C.J.; FUNG, K.W.; MUNDAY, M.R.; ROMAN, I.F.; SMYTH, R.; WALSHE, K.; YORK, M.J. Markers of experimental acute inflammation in the wistar han rats with particular reference to haptoglobin an C-reactive protein. *Arch Toxicol*, v. 77, p. 392-402, 2003.

GIL, B.; SANZ, M.J.; TERCENIO, M.; FERRANDIZ, M.L.; BUSTOS, G.; PAYA, M.; GUNASEGARAN, R.; ALCARAZ, M.J. Effects of flavonoids on *Naja naja* and human recombinant synovial phospholipase A2 and inflammatory responses in mice. *Life Sci*, v. 54, p. 333-338, 1994 apud MIDDLETON, E.J.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev*, v. 52, p. 73-751, 2000.

GIUSTI, G.; GALANTI, B. Adenosine-deaminase: colorimetric method In: Methods of enzymatic analyses. BERGMAYER, H.U. (ed). New York: Verlac Chemie, 1984, p. 315.

GOLDFRANK, L.; LEWIN, N.; FLOMENBAUM, N.; HOWLAND, M.A. The pernicious panacea: herbal medicine. *Hospital physician*, v. 10, p. 64-86, 1982 apud RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603-613, 2001.

GOTTLIEB, O.; KAPLAN, M.A. Das plantas medicinais aos fármacos naturais. *Ciência Hoje*, v. 15, p. 51-54, 1993 apud RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603-613, 2001.

GREEN, I.C.; WAGNER, D.A.; GLOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.B. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, v. 126, p. 131-138, 1982.

GROOTEMAN, M.P.; VAN TELLINGEN, A.; VAN HOUTE, A.J.; BOS, J.C.; SCHOORL, M.; VAN LIMBEEK, J.; NUBE, M.J. Hemodialysis-induced degranulation of polymorfonuclear cells: no correlation between membrane markers and degranulation products. *Nephron*, v. 85, p. 267-274, 2000.

GRUYS, E.; OBWOLO, M.J.; TOUSSAINT, M.J.M. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. *Vet Bull*, v. 64, p. 1009-1018, 1994 apud MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J*, v. 168, p. 28-40, 2004.

GUPTA, M.P. *270 Plantas medicinales iberoamericanas*. Bogotá: Convenio Andres Bello, 1995, p. 422-428.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C.; CROSS, C.E. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med*, v. 119, p. 598-620, 1992 apud MIDDLETON, E.J.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev*, v. 52, p. 73-751, 2000.

HAMBURGUER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, v. 30, p. 3864-3874, 1991 apud RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603-613, 2001.

HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev*, v. 13, p. 413-421, 2002.

HASHIMOTO, S.; SUZUKI, T.; DONG, H.Y.; NAGAI, S.; YAMAZAKI, N.; MATSUSHIMA, K. Serial analysis of gene expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, v. 94, p. 845-852, 1999.

HASKO, G.; KUHEL, D.G.; CHEN, J.F.; SCHWARZSCHILD, M.A.; DEITCH, E.A.; MABLEY, J.G.; MARTON, A.; SZABÓ, C. Adenosine inhibits IL-12 and TNF- $\alpha$  production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J*, v. 14, p. 2065-2074, 2000.

HAYASHI, R.; YAMASHITA, N.; MATSUI, S.; FUJITA, T.; ARAYA, J.; SASSA, K.; ARAI, N.; YOSHIDA, Y.; KASHII, T.; MARUYAMA, M.; SUGIYAMA, E.; KOBAYASHI, M. Bradykinin stimulates IL-6 and IL-8 production by human lung fibroblasts through ERK- and p38 MAPK-dependent mechanisms. *Eur Respir J*, v. 16, p. 452-458, 2000.

HAYASHI, I.; AMANO, H.; ISHIHARA, K.; KUMAGAI, Y.; YOSHIMURA, H.; MAJIMA M.C. The role of kinin B1 in the plasma extravasation of carrageenin-induced pleurisy. *Life Sci*, v. 70, p. 937-949, 2002.

HEDQVIST, P.; GAUTAN, N.; LINBOM, L. Interactions between leukotrienes and other inflammatory mediators/modulators in the microvasculature. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 161, p. 117-119, 2000.

HEIDE, D.; RAAB, M.; MARKOVIC, S.; KARIMI, A.; GRIESMACHER, A.; MUELLER, M. Endothelial adhesion molecule expression in an in vitro model of inflammation international. *J Clin Chem*, v. 325, p. 171, 2002.

HENRICKS, P.A.J.; NIJKAMP, F.P. Pharmacological modulation of cell adhesion molecules. *Eur J Pharmacol*, v. 344, p. 1-13, 1998.

HENRIQUES, M.G. *Estudo da reação inflamatória induzida por carragenina em camundongos*. 1993. 181 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. 1993.

HENSLEY, K.; ROBINSON, K.A.; GABBITA, S.P.; SALSMAN, S.; FLOYD, R.A. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med*, v. 28, p. 1456-1462, 2000.

HERATH, H.M.; TAKANO-ISHIKAWA, Y.; YAMAKI, K. Inhibitory effect of some flavonoids on tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage cell line J774.1. *J Med Food*, v. 6, p. 365-370, 2003.

HIGA, S.; HIRANO, T.; KOTANI, M.; MATSUMOTO, M.; FUJITA, A.; SUEMURA, M.; KAWASE, I.; TANAKA, T. Fisetin, a flavonol, inhibits TH2-type cytokine production by activated human basophils. *J Allergy Clin Immunol*, v. 111, p. 1299-1306, 2003.

HITOGLOU, S.; HATZISTILIANOU, M.; GOUGOUSTAMOU, D.; ATHANASSIADOU, F.; KOTSIS, A.; CATRIU, D. Adenosine-deaminase activity and its isoenzyme pattern in patients with juvenile rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*, v. 20, p. 411-416, 2001.

HOLLOWAY, A.F.; RAO, S.; SHANNON, M.F. Regulation of cytokine gene transcription in the immune system. *Mol Immunol*, v. 38, p. 567-580, 2002.

HOPKINS, S.J. The pathophysiological role of cytokines. *Leg Med*, v. 5, p. S45-S57, 2003.

HUANG, C.D.; TLIBA, O.; PANETTIERI, R.A. JR; AMRANI, Y. Bradykinin induces interleukin-6 production in human airway smooth muscle cells: modulation by Th2 cytokines and dexamethasone. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v. 28, p. 330-338, 2003.

HULE, R.E.; PADMAJA, S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radical Res Commun*, v. 18, p. 195-199, 1993.

ISHIKAWA, Y.; SUGIYAMA, H.; STYLIANOU, E.; KITAMURA, M. Bioflavonoid quercetin inhibits interleukin-1-induced transcriptional expression of monocyte chemoattractant protein-1 in glomerular cells via suppression of nuclear factor-kB. *J Am Soc Nephrol*, v. 10, p. 2290-2296, 1999.

JANG, D.S., CUENDET, M., HAWTHORNE, M.E., KARDONO, L.B.S., KAWANISHI, K., FONG, H.H.S., METHA, R.G., PEZZUTO, J. M., KINGHORN, A.D. Prenylated flavonoids of the leaves of *Macaranga conifera* with inhibitory activity against cyclooxygenase-2. *Phytochemistry*, v. 61, p. 867-872, 2002.

KAPLAN, A.P.; JOSEPH, K.; SHIBAYAMA, Y.; NAKAZAWA, Y.; GHEBREHIWET, B.; REDDIGARI, S.; SILVERBERG M. Bradykinin formation. Plasma and tissue pathways and cellular interactions. *Clin Rev Allergy Immunol*, v. 16, p. 403-429, 1998.

KAYACAN, O.; KARNAK, D.; DELIBALTA, M.; BEDER, S.; KARACA, L.; TUTKAK, H. Adenosine deaminase activity in bronchoalveolar lavage in Turkish patients with smear negative pulmonary tuberculosis. *Respir Med*, v. 96, p. 536-541, 2002.

KEVIL, C.G. Endothelial cell activation in inflammation: lessons from mutant mouse model. *Pathophysiol*, v. 9, p. 63-74, 2003.

KIM, H.S.; KIM, W.D.; LEE, Y.H. Production and expression of gro-alpha and RANTES by peripheral blood mononuclears cells isolated from patients with Kawasaki disease and measles. *J Korean Med Sci*. v. 18, p. 381-386, 2003.

KLEBANOFF, S.J. A peroxidase-mediated antimicrobial system in leukocytes. *J Clin Invest*, v. 46, p. 1078, 1967 apud WINTERBOURN, C.C.; VISSERS, M.C.M.; KETLE, A.J. Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol*, v. 7, p. 53-58, 2000.

KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians*, v. 111, p. 383-389, 1999.

KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, v. 298, p. 249-258, 1994.

KOTANI, M.; FUJITA, A.; TANAKA, T. Inhibitory effects of persimmon leaf extract on allergic reaction in human basophilic leukemia cells and mice. *J Jpn Soc Nutr Food Sci*, v. 52, p. 147-151, 1999 apud HIGA, S.; HIRANO, T.; KOTANI, M.; MATSUMOTO, M.; FUJITA, A.; SUEMURA, M.; KAWASE, I.; TANAKA, T. Fisetin, a flavonol, inhibits TH2-type cytokine production by activated human basophils. *J Allergy Clin Immunol*, v. 111, p. 1299-1306, 2003.

KRIEGLSTEIN, C.F.; GRANGER, D.N. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens*, v. 14, p.44-54, 2001.

KRUMP, E.; BORGEAT, P. Adenosine. An endogenous inhibitor of arachidonic acid release and leukotriene biosynthesis in human neutrophils. *Adv Exp Med Biol*, v. 447, p. 107-115, 1999.

KUSHNER, I. Regulation of the acute phase response by cytokines. *Perspect Biol Med*, v. 36, p. 611-622, 1993.

KYRIAKIS, J.M.; AVRUCH, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Ver*, v. 81, p. 808-860, 2001.

LANZA, F. Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. *J Mol Med*, v. 6, p. 676-681, 1998.

- LAWRENCE, T.; GILROY, D.W.; COLVILLE-NASH, P.R.; WILLOUGHBY, D.A. Possible new role of NF- $\kappa$ B in the resolution of inflammation. *Nat Med*, v. 7, p. 1291-1297, 2001.
- LECCI, A.; GIULIANI, S.; TRAMONTANA, M.; CARINI, F.; MAGGI, C.A; Peripheral actions of thachykininis. *Neuropeptides*, v. 34, p. 303-313, 2000.
- LEE, T-P.; MATTELIANO, M.L.; MIDDLETON, E. Effect of quercetin on human polymorphonuclear leukocyte lysosomal enzyme release and phospholipid metabolism. *Life Sci*, v. 31, p. 2765-2774, 1982 apud MIDDLETON, E.J.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev*, v. 52, p. 73-751, 2000.
- LEE, H.T.; XU, H.; NASR, S.H.; SCHNERMANN, J.; EMALA, C.W. A1 adenosine receptor knock-out mice exhibit increase renal injury following ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Renal*, v. 286, p. 298-306, 2004.
- LEY, K. Integration of inflammatory signals by rooling neutrophils. *Immunol Rev*, v. 186, p. 8-18, 2002.
- LIN, C.M.; CHEN, C.T.; LEE, H.H.; LIN, J.K. Prevention of cellular ROS damage by isovitexin and related flavonoids. *Planta Med*, v. 68, p. 365-367, 2002.
- LINDEN, J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, v. 41, p. 775-787, 2001.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002, p. 371-374.
- LUTOMSKI, J.; MALEK, B., Pharmacological investigations on raw materials of the genus passiflora. IV. The comparision of contents of alkaloids in some harman raw materials. *Planta Med*, v. 27, p. 381-386, 1975.
- MABLEY, J.; SORIANO, F.; PACHER, P.; HASKO, G.; MARTON, A.; WALLACE, R., SALZMAN, A., SZABO, C. The adenosine A3 receptor agonist, N6-(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-N-methyluronamide, is protective in two murine models of colitis. *Eur J Pharmacol*. v. 466, p. 323-329, 2003.
- MARECK, U.; HERRMANN, K.; GALENSKA, R.; WRAY, V. The 6-C-Chinovoside and 6-C-fucoside of luteolin from *Passiflora edulis*. *Phytochemistry*, v. 30, p. 3486-3487, 1991.
- MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; ANDO, S.; TOGUCHIDA, I.; YOSHIKAWA, M. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. *Bioorg Med Chem*, v. 11, p. 1995-2000, 2003.
- MELONI, F.; BALLABIO, P.; GORRINI, M.; DE AMICI, M.; MARENA, C.; MALANDRINO, S.; LUISETTI, M. Effects of 3'-hydroxyfarrerol (1dB 1031), a novel

flavonoid agent, on phagocyte products. *Inflammation*. v. 19, p. 689-699, 1995 apud MIDDLETON, E.J.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev*, v. 52, p. 73-751, 2000.

MENTZ, L.A.; SCHENCKEL, E.P. A coerência e a confiabilidade das indicações terapêuticas. *Caderno de Farmácia*, v. 5 (1/2), p. 93-119, 1989 apud RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603-613, 2001.

MIDDLETON, E.J.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev*, v. 52, p. 73-751, 2000.

MOLD, C.; RODRIGUEZ, W.; RODIC-POLIC, B.; DU CLOS, T.W. C-reactive protein mediates protection from lipopolysaccharide through interactions with Fc-gammaR. *J Immunol*, v. 169, p. 7019-7025, 2002. apud MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J*, v. 168, p. 28-40, 2004.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, v. 43, p. 109-142, 1991.

MOREIRA, N.J. Dicionario de plantas medicinais brasileiras. Rio de Janeiro, Brasil: Correio Mercantil, 1862. p. 144.

MORITA, I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, v. 68-69, p. 165-175, 2002.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A. *Medicinal plants of Brazil*. Algonac: Reference Publications, 2000, p. 267-271.

MORTENSEN, R.F.; ZHONG, W. Regulation of phagocytic leukocyte activities by C-reactive protein. *J Leukoc Biol*, v. 67, p. 495-500, 2000 apud MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J*, v. 168, p. 28-40, 2004.

MÜLLER, W.A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trend Immunol*, v. 24, p. 326-333, 2003.

MUN'IM, A.; NEGISHI, O.; OZAWA, T. Antioxidative compounds from *Crotalaria sessiliflora*. *Biosci Biotechnol Biochem*, v. 97, p. 410-414, 2003

NAGASE, H.; WOESSNER, J.F.JR. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, v. 274, p. 21491-21494, 1999.

NATHAN, C.; XIE, Q.W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*, v. 269, p. 13725-13728, 1994.

NATHAN, C. Inducible nitric oxide synthase. *J Clin Invest.*, 100: 2417, 1997.



- NATHAN, C. Points of control in inflammation. *Nature*, v. 420, p. 846-852, 2002
- NEEDLEMAN, P.; ISAKSON, P.C. The discovery and function of COX-2. *J Rheum*, v. 24, p. 6-8, 1997.
- NEVE, J.; PARIJ, N.; MOGUILVSKY, N. Inhibition of the myeloperoxidase chlorinating activity by non-steroidal anti-inflammatory drugs investigated with a human recombinant enzyme. *Eur J Pharmacol*, v. 417, p. 37-43, 2001.
- NEWALL, C.A.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D. *Herbal medicines: a guide for health care professionals*. London: Pharmaceutical, 1996, p. 206-207.
- NISBET, L.J.; MOORE, M. Will natural products remain an important source of drug research for the future? Current opinion in biotechnology, v. 8, p. 708-712, 1997 apud NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Geográficos, Legais e Éticos in: *Farmacognosia da Planta ao medicamento*. 5ª Ed. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL E.P., GOSMANN G.; DE MELLO J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK P.R. (eds). Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/UFRGS/ Editora UFSC/ Brasil, 2003. p. 13-28.
- NOMURA, Y. NF  $\kappa$ B activation and I kappaB alpha dynamism involved in iNOS and chemokine induction in astroglial cells. *Life Sci*, v. 68, p. 1695-1701, 2001.
- OGA, S.; FREITAS, P.C.D.; SILVA, A.C.G.; HANADA, S. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. *Planta Medica*, v. 51, p. 303-306, 1984.
- OPPENHEIM, J.J. Cytokines: past, present, and future. *Int J Hematol*, v. 74, p. 3-8, 2001.
- PAN, Z.K.; YE, R.D; CHRISTIANSEN, S.C.; JAGELS, M.A.; BOKOCH, G.M.; ZURAW, B.L. Role of the Rho GTPase in bradykinin-stimulated nuclear factor-kappaB activation and IL-1beta gene expression in cultured human epithelial cells. *J Immunol*, v. 160, p. 3038-3045, 1998.
- PANÉS, J. Adhesion molecules: their role in physiopathology and treatment of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol*, v. 22, p. 514-524, 1999.
- PANGBURN, M.K.; RAWAL, N. Structure and function of complement C5 convertase enzymes. *Biochem Soc Trans*, v. 30, p. 6-10, 2002 apud SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, v.18, p. 385-405, 2004.
- PARENTE, L.; PERRETTI, M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. *Biochem Pharmacol*, v. 65, p. 153-159, 2003.
- PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. *Lancet*, v. 357, p. 1777-1789, 2001.
- PATCHA, V.; WIGREN, J.; WINBERG, M.E.; RASMUSSEN, B.; LI, J.; SÄRND AHL, E. Differential inside-out activation of  $\beta$ 2-integrins by leukotriene B4 and fMLP in human neutrophils. *Experimental Cell Research*, v. 300, p. 308-319, 2004.

PATTERSON, C.E.; LUM, H. Update on pulmonary edema: the role and regulation of endothelial barrier function. *Endothelium*, v. 8, p. 75-105, 2001.

PAWLINSKI, R.; PEDERSEN, B.; KEHRLE, B. AIRD, W.C.; FRANK, R.D.; GUHA M.; MACKMAN, N. Regulation of tissue factor and inflammatory mediators by Erg-1 in a mouse endotoxemia model. *Blood*, v. 101, p. 3940-3947, 2003 apud SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, v. 18, p. 385-405, 2004.

PAYNE, G.; BRINGI, V.; PRINCE.; SHULLER, M. *The quest for commercial production of chemicals from plant cell culture, plant cell and tissue culture in liquid systems*. Oxford, University Press, Oxford, 1991 apud RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603-613, 2001.

PELAIA, G.; VARELLA, A.; CUDA, G.; MASELLI, R.; MARSICO, S.A. Molecular mechanisms of corticosteroid actions in chronic inflammatory airway disease. *Life Sci*, v. 72, p. 1549-1561, 2003.

PELZER, L.E.; GUARDIA, T.; JUAREZ, A.O. GUERREIRO, E. Acute and Chronic anti-inflammatory effects of plant flavonoids. *IL Farmaco*, n. 53, p. 421-424, 1998.

PESQUERO, J.B.; ARAUJO, R.C.;HEPPENSTALL, P.A.; STUCKY, C.L.; SILVA, J.A.; WALTHER, T.; OLIVEIRA, S.M.; PESQUERO, J.L.; PAIVA, A.C.M.; CALIXTO, J.B.; LEWIN, G.R.; BADER, M. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, v. 97, p. 8140-8145, 2000.

PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*, v. 83, p. 346-356, 1977.

PETRY, R.D.; REGINATTO, F.; DE-PARIS, F.; GOSMANN, G.; SALGUEIRO, J.B.; QUEVEDO, J.; KAPEZINSKI, F.; ORTEGA, G.G., SCHENKEL, E.P. Comparative Pharmacological Study of Hydroethanol Extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* Leaves. *Phytother Res*, v. 15, p. 162-164, 2001.

PINCEMAIL, J.; DEBY, C.; THIRION, A.; DE BRUYN-DISTER, M.; GOUTIER, R. Human myeloperoxidase activity is inhibited *in vitro* by quercetin. Comparison with three related compounds. *Experientia*, v. 44, p. 450-453, 1988 apud MIDDLETON, E.J.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev*, v. 52, p. 73-751, 2000.

PIO CORRÊA, M. *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. vol 5. Rio de Janeiro, Brasil: Imprensa Nacional, 1978. p. 108.

POSER, G.L.V.; MENTZ, L.A. Diversidade Biológica e Sistemas de Classificação In: *Farmacognosia da Planta ao medicamento*. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL E.P., GOSMANN G.; DE MELLO J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK P.R. (eds). Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/UFRGS/ Editora UFSC/ Brasil, 2003. p. 75-89.

PURICELLI, L.; DELL'AICA, I.; SARTOR, L.; GARBISA, S.; CANIATO, R. Preliminary evaluation of inhibition of matrix-metalloprotease MMP-2 and MMP-9 by *Passiflora edulis* and *P. foetida* aqueous extracts. *Fitoterapia*, v. 74, p. 302-304, 2003.

RAHMAN, I.; JOHN MARWICK, J.; KIRKHAM, P. Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF-kappaB and pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol*, v. 68, p. 1255-1267, 2004.

RAMOS, C.L.; POU, S.; ROSEN, G.M. Effects of anti-inflammatory drugs on myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical generation by human neutrophils. *Biochem Pharmacol*, v. 49, p. 1079-1084, 1995 apud PABUÇCUOĞLU, A.; KONYALIOĞLU, S.; BAS, M.; MERAL, G. E. The in vitro effects of *Hypericum* species on human leukocyte myeloperoxidase activity. *J Ethnopharmacol*, v. 87, p. 89-92, 2003.

RANGAN, G.K.; WANG, Y.; TAY, Y-C.; HARRIS, D.C.H. Inhibition of NFkB activation with antioxidants is correlated with reduced cytokine transcription in PTC. *Am J Physiol*, v. 277, p. 779-789, 1999.

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

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603-613, 2001.

REGINATTO, F.H.; KAUFFMANN, C.; SCHRIPSEMA, J.; GUILLAUME, D.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Steroidal and triterpenoidal glucosides from *Passiflora alata*. *Journal of Brazilian Chemistry Society*, v. 12, p. 32-36, 2001.

REGINATTO, F.H.; KAUFFMANN, C.; SCHRIPSEMA, J.; GUILLAUME, D.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Assay of quadranglucoside, the major saponin of the leaves of *Passiflora alata*, by HPLC-UV. *Phytochem anal*, v. 15, p. 195-197, 2004.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. *Patologia estrutural e funcional*. 6ª Ed. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan, 2001. p. 766.

RODRIGUES, M.R.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M.; CAMPA, A. Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 292, p. 869-873, 2002.

ROSSI, A.; CUZZOCREA, S.; MAZZO, E.; SERRAINO, I.; DE SARRO, A.; DUGO, L.; FELICE, M.R.; VAN DE LOO, F.A.J.; DI ROSA, M.; MUSCI, G.; CAPUTI, A.P.; SAUTEBIN, L. Regulation of prostaglandin generation in carrageenan-induced pleurisy by inducible nitric oxide synthase in knockout mice. *Life Sci*, v. 72, p. 1199-1208, 2003.

SAFAYHI, H.; SAILER, E.R. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta Med*, v. 63, p. 487-493, 1997.

SAKATA, K., HIROSE, Y., QIAO, Z., TANAKA, T., MORI, H. Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line. *Cancer Lett*, v. 199, p. 139-145, 2003.

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

SALEH, T.S.F.; VIANNA, R.M.J.; CRECZYNSKI-PASA, T.B; CHAKRAVARTY, B.J.M.; KYLE, D.J.; CALIXTO, J.B. Oral-anti-inflammatory action of NPC 18884, a novel bradykinin B<sub>2</sub> receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*, v. 363, p. 179-187, 1998.

SALEH, T.S.F; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides*, v. 20, p. 949-956, 1999.

SALLUSTO, F.; MACKAY, C.R. Chemoattractants and their receptors in homeostasis and Inflammation. *Curr Opin Immunol*, v. 16, p. 724-731, 2004.

SANTOS, R.I. Biodiversidade: Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários In: *Farmacognosia da Planta ao medicamento*. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL E.P., GOSMANN G.; DE MELLO J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK P.R. (eds). Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/UFRGS/ Editora UFSC/ Brasil, 1999. p. 323-354.

SARTOR, L.; PEZZATO, E.; DELL'AICA, I.; CANIATO, R.; BIGGIN, S.; GARBISA, S. Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. *Biochem Pharmacol*, v. 64, p. 229-227, 2002.

SCHILLER, J.; FUCHS, B.; ARNHOLD, J.; ARNOLD, K. Contribution of reactive oxygen species to cartilage degradation in rheumatic diseases: molecular pathways, diagnosis and potential therapeutic strategies. *Curr Med Chem*, v. 10, p. 2123-2145, 2003.

SCHNEIDER, E.; ROLLI-DERKINDEREN, M.; AROCK, M.; DY, M. Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis. *Trends Immunol*, v. 5, p. 255-263, 2002.

SEDGWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D.A. Initiation of inflammatory response and its prevention. In: *Handbook of inflammation*. BONTA, I.L.; BRAY, M.A.; PARNHAM, M.J. (eds), New York: Elsevier, 1985. p. 27-47.

SEIGLER, D.S.; PAULI, G.F.; NAHRSTEDT, A.; LEEN, R. Cyanogenic allosides and glucosides from *Passiflora edulis* and *Carica papaya*. *Phytochemistry*, v. 60, p. 873-882, 2002.

SENGELOV, H.; KJELDSSEN, L.; BORREGAARD, N. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol*, v. 150, p. 1535-1543, 1993 apud FAURSCHOU, M; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*, v. 5, p. 1317-1327, 2003.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, v. 18, p. 385-405, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. *Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul*. 5ª Ed. Porto Alegre, Brasil: Editora Universidade/UFRGS, 1998.

SINGBARTL, K.; GREEN, S.A.; LEY, K. Blocking P-selectin protects from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure. *FASEB J*, v. 14, p. 48-54, 2000.

SINGH, R.; AHMED, S.; ISLAM, N.; GOLDBERG, V.M.; HAQQI, T.M. Epigallocatechin-3-gallate inhibits interleukin-1 $\beta$ -induced expression of nitric oxide synthase and production of nitric oxide in human chondrocytes. *Arthritis Rheum*, v. 46, p. 2079-2086, 2002.

SMITH, W.L.; DEWITT, D.L.; GARAVITO, R.M. Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology. *Ann Rev Biochem*, v. 69, p. 145-182, 2000.

SOBOTTKA, A.M., WERNER, W., BLASCHKE, G., KIEFER, W., NOWE, U., DANNHARDT, G., SCHAPOVAL, E.E.S., SCHENKEL, E.P., SCRIBA, G.K.I. Effect of flavonol derivatives on the carrageenin-induced paw edema in rat and inhibition of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase *in vitro*. *Arch Pharm*, v. 333, p. 205-210, 2000.

SOULIMANI, R.; YOUNOS, C.; JARMOUNI, S.; BOUSTA, D.; MISSLIN, R.; MORTIER, F. Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and maltol in the mouse. *J Ethnopharmacol*, v. 57, p. 11-20, 1997.

SOUZA BRITO, A.R.M, How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries. *J Ethnopharmacol*, v. 54. p. 131-138, 1996.

SPECTOR, W.G. The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation. *J Pathol Bact*, v. 72, p. 367-380, 1956.

SPENCER, K.C.; SEIGLER, D. S. Cyanogenesis of *Passiflora edulis*. *J Agric Food Chem*, v. 31, p. 794-796, 1983.

SPERONI, E.; MINGHETTI, A. Neuropharmacological activity of extracts from *Passiflora incarnata*. *Planta Med*, v. 54, p. 488-491, 1988.

SPINELLA, M. The importance of pharmacological synergy in psychoactive herbal medicines (Herbal synergy review). *Altern Med Rev*, v. 7, 130-7, 2002.

SPLETTSTOESSER, W.D.; SCHUFF-WERNER, P. Oxidative stress in phagocytes - the enemy within. *Microsc Res Tech*. v. 57, p. 441-455, 2002 apud SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, v. 18, p. 385-405, 2004.

SUBBARAMAIAH, K.; DANNENBERG, A. Cyclooxygenase-2: a molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends in Pharmacol Sci*, p. 24, p. 96-102, 2003.

SUBONGKOT, S.; FRAME, D.; LESLIE, W.; DRAJER, D. Selective cyclooxygenase-2 inhibition: a target in cancer prevention and treatment. *Pharmacotherapy*, v. 23, p. 9-28, 2003.

SULLIVAN, G.W. Adenosine A2A receptor agonist as anti-inflammatory agents. *Curr Opin Investig Drugs*, v.4, p. 1313-1319, 2003.

SULLIVAN, G.W.; LEE, D.D.; ROSS, W.G.; DIVIETRO, J.A.; LAPPAS, C.M.; LAWRENCE, M.R. LINDEN, J. Activation A2A adenosine receptor inhibits expression of alpha 4/beta 1 integrin (very late antigen-4) on stimulated human neutrophils. *J Leukoc Biol*, v.75, p. 127-134, 2004.

SUZUKI, Y.; RUIZ-ORTEGA, M.; LORENZO, O.; RUPEREZ, M.; ESTEBAN, V.; EGIDO, J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Biol*, v. 35, p. 881-900, 2003.

SZABO, C.; SCOTT, G.S.; VIRAG, L.; EGNACZYC, G.; SALZMAN, A.L.; SHANLEY, T.P.; HASKO, G. Suppression of macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha production and collagen-induced arthritis by adenosine receptor agonists. *Br J Pharmacol*, v. 125, p. 379-387, 1998 apud MABLEY, J.; SORIANO, F.; PACHER, P.; HASKO, G.; MARTON, A.; WALLACE, R., SALZMAN, A., SZABO, C. The adenosine A3 receptor agonist, N6-(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-N-methyluronamide, is protective in two murine models of colitis. *Eur J Pharmacol*. v. 466, p. 323-329, 2003.

SZABÓ, C.; Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett*, v. 140, p. 105-112, 2003.

TAKANO-ISHIKAWA, Y., GOTO, M., YAMAKI, K. Inhibitory effects of several flavonoids on E-selectin expression on human umbilical vein endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor-alpha. *Phytother Res*, v. 17, p. 1224-1227, 2003.

TAKHTAJAN, A. *Diversity and classification of flowering plants*. New York: Columbia University, 1997. p. 643.

TAN, P.; LUSCINKAS, F.W.; HONNER-VANNIASINKAM, S. Cellular and molecular mechanisms of inflammation and thrombosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, v. 17, p. 373-389, 1999.

TANG, M.L.K.; FISCUS, L.C. Important roles for L-selectin and Icam-1 in the development of allergic airway inflammation in asthma. *Pulm Pharmacol*, v. 14, p. 203-210, 2001.

'T HART, B.A.; IP VIA CHING, T.R.; VAN DIJK, H.; LABADIE, R.P. How flavonoids inhibit the generation of luminol-dependent chemiluminescence by activated human neutrophils. *Chem Biol Interact*, v. 73, p. 323-335, 1990 apud MIDDLETON, E.J.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev*, v. 52, p. 73-751, 2000.

THOMAS, J.S. Overview of plasma proteins. In: *Schalm's Veterinary Hematology* 15<sup>a</sup> Ed. FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. (eds.). Lippincott Williams, Wilkins, Philadelphia, 2000. p.891-898 apud MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J*, v. 168, p. 28-40, 2004.

TOGIAS, A. H1-receptors: localization and role in airway physiology and in immune functions. *J Allergy Clin Immunol*, v. 112, p. 60-68, 2003.

TURUTIN, D.V.; KUBAREVA, E.A.; PUSHKAREVA, M.A.; ULLRICH, V.; SUD'INA, G.F. Activation of NF- $\kappa$ B transcription factor in human neutrophils by sulphatides and L-selectin cross-linking. *FEBS Letters*, v. 536, p. 241-245, 2003.

TYSON, J.J., CHEN, K, NOVAK, B. Network dynamics and cell physiology. *Nat Rev Mol Cell Biolec*, v. 2, p. 908-916, 2001.

UEDA, H.; YAMAZAKI, C.; YAMAZAKI, M. A hydroxyl group of flavonoids affects oral anti-inflammatory activity an inhibition of systemic tumor necrosis factor - $\alpha$  production. *Biosci Biotechnol Biochem*, v. 68, p. 119-125, 2004.

VALE, N.B.; LEITE, J.R. Efeitos psicofarmacológicos de preparações de *Passiflora edulis* (maracujá). *Ciência e Cultura*, v. 35, p. 11-24, 1983.

VAN ZYL, J.M.; KRIEGLER, A.; VAN DER WALT, B.J. Anti-oxidant properties of H<sub>2</sub>-receptor antagonists. *Biochem Pharmacol*, v. 45, p. 2389-2397, 1993 apud PABUÇCUOGLU, A.; KONYALIOGLU, S.; BAS, M.; MERAL, G. E. The in vitro effects of *Hypericum* species on human leukocyte myeloperoxidase activity. *J Ethnopharmacol*, v. 87, p. 89-92, 2003.

VIANNA, R.M.; CALIXTO, J.B. Characterization of the receptor and the mechanisms underlying the inflammatory response induced by des-Arg9-BK in mouse pleurisy. *Br J Pharmacol*, v. 23, p. 281-291, 1998.

VOLANAKIS, J.E. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Mol Immunol*, v. 38, p. 189-197, 2001 apud ABLIJ, H.C.; MEINDERS, A.E. C-reactive protein: history and revival. *European J Intern Med*, v. 13, p. 412-422, 2002.

VOOG, U.; ALSTERGREN, P.; LEIBUR, E.; KALLIKORM, R.; KOPP, S. Immediate effects of the serotonin antagonist granisetron on temporomandibular joint pain in patients with systemic inflammatory disorders. *Life Sci*, v. 68, p. 591-602, 2000.

VULTO, A.G.; SMET, P.A.G.M. *Meylor's side effects of drugs*. 11<sup>a</sup> Ed. DUKES, M.M.G. (ed.). Elsevier, Amsterdam, 1988. p. 999-1005 apud RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603-613, 2001.

WAGENER, F.A.; EGGERT, A.; BOERMAN, O.C.; OYEN, W.J.; VERHOFSTAD, A.; ABRAHAM, N.G.; ADEMA, G.; VAN KOOYK, Y.; DE WITTE, T.; FIGDOR, C.G. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood*, v. 98, p. 1802-1811, 2001 apud MURATA, H.; SHIMADA, N.;

YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J*, v. 168, p. 28-40, 2004.

WAKAI, A.; WANG, J.H.; WINTER, D.C.; STREET, J.T.; O'SULLIVAN, R.G.; REDMOND, H.P. Adenosine inhibits neutrophil vascular endothelial growth factor release and ransendothelial migration via A<sub>2B</sub> receptor activation. *Shock*, v. 15, p. 297-301, 2001.

WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from Discovery to clinic. *J. ethnopharmacol.* 51:239-254, 1996 apud NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Geográficos, Legais e Éticos in: *Farmacognosia da Planta ao medicamento*. 5<sup>a</sup> Ed. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL E.P., GOSMANN G.; DE MELLO J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK P.R. (eds). Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/UFRGS/ Editora UFSC/ Brasil, 2003. p. 13-28.

WILLIAMSON E.M. Synergy – myth or reality? In: Ernst, E. (ed). *Herbal medicine a concise overview for professionals*. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2000. p. 48-58.

WILLIAMSON, E.; OKPAKO, D.T.; EVANS, F.J.; *Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material*. Wiley, Chichester, 1996 apud RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603-613, 2001.

WINTERHALTER, P.J. Bound terpenoids in the juice of the purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *J Agric Food Chem*, v. 38, p. 452-455, 1990.

WINTERBOURN, C.C.; VISSERS, M.C.M.; KETLE, A.J. Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol*, v. 7, p. 53-58, 2000.

WITTE, M.B.; THORNTON, F.J.; TANTRY, U.; BARBUL, A. L-Arginine supplementation enhances diabetic wound healing: involvement of the nitric oxide synthase and argininase pathways. *Metabolism*, v. 51, p. 1269-1273, 2002.

YANG, F.; HAILE, D.J.; BERGER, F.G.; HERBERT, D.C.; VAN BEVEREN, E.; GHIO, A.J. Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 284, p. 402-409, 2003 apud MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J*, v. 168, p. 28-40, 2004.

YONEYAMA, Y.; SAWA, R.; SUZUKI, S.; OTSUBO, Y; MIURA, A.; KUWABARA, Y.; ISHINO, H.; KIYOKAWA, Y.; DOI, D.; YONEYAMA, K.; KOBAYASHI, H.; ARAKI, T. Serum adenosine-deaminase activity in women with pre-eclampsia. *Gynecol Obstet Invest*, v. 54, p. 164-167, 2002.

YOSHIKAWA, K.; KATSUTA, S.; MIZUMORI, J.; ARIHARA, S. Four cycloartane triterpenoids and six related saponins from *Passiflora edulis*. *J Nat Prod*, v. 63, p. 1229-1234, 2000.

YUHKI, K.; UENO, A.; NARABA, H.; KOJIMA, F.; USHIKUBI, F.; NARUMIYA, S.; OH-ISHI, S. Prostaglandin Receptors EP2, EP3, and IP Mediate Exudate Formation



in Carrageenin-Induced Mouse Pleurisy. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 311, p. 1218-1224, 2004.

ZHELEV, Z.D.; ALTERAI, A.M.; CHODNIEWICZ, D. Controlled Pseudopod Extension of Human Neutrophils Stimulated with Different Chemoattractants. *Biophys J*, v. 87, p. 688-695, 2004.

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

ZINGARELLI, B.; SHEEHAN, M; WONG, H.R. Nuclear factor- $\kappa$ B as a therapeutic target in critical care medicine. *Crit Care Med*, v. 31, p. 105-111, 2003.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides In: *Farmacognosia da Planta ao medicamento*. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL E.P., GOSMANN G.; DE MELLO J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK P.R. (eds). Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/UFRGS/ Editora UFSC/ Brasil, 1999. p. 489-516.

**ANEXO**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
Fone: (048) 331-9206 Fax: (048) 331-9599  
e-mail: [dap@proreitoria.ufsc.br](mailto:dap@proreitoria.ufsc.br)

Ofício nº 092/CEUA/DAP/PRPG

Florianópolis, 29 de outubro de 2003.

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

À: Prof Dra. Tânia Silvia Fröde  
Departamento de Análises Clínicas-CCS

Em relação ao Protocolo de Pesquisa sob sua responsabilidade, cadastrado sob os número 241/CÉU A e 23080.014622/2003-29/UFSC, intitulado "**Avaliação da atividade antiinflamatória de compostos extraídos da *Passiflora alata Dryander* e *Passiflora edulis Simii*, no modelo de pleurisia em camundongos**", em reunião do dia 24/10/2003 a CEUA, deliberou o seguinte:

**- APROVADO por 2 (dois) anos, a contar desta data, por 5 (cinco) votos favoráveis e 3 (três) votos contrários, envolvendo o uso de 650 camundongos albinos suíços, durante o período.**

Por ocasião do término ou de pedido de revalidação do presente Protocolo, deverá ser apresentado relatório detalhado relacionado o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados objetivos (por exemplo, anexando cópias dos resultados obtidos tais como trabalhos em revistas indexadas ou não, teses ou dissertações, resumos em congressos, capítulos de livro, processos e patentes, etc) e/ou benefícios resultantes da pesquisas para seres humanos e/ou para animais, sejam estes benefícios de natureza acadêmica, aplicada, industrial, etc.

Atenciosamente,

Presidente – CEUA/PRPG/UFSC  
Prof. Dr. Jamil Asseury