



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA *Croton
antisyphiliticus* Mart. (*Euphorbiaceae*) NO MODELO DE
PLEURISIA INDUZIDA POR CARRAGENINA, EM
CAMUNDONGOS**

MESTRADO

Gustavo Oliveira dos Reis

**Florianópolis
2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

Gustavo Oliveira dos Reis

**ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA *Croton
antisyphiliticus* Mart. (*Euphorbiaceae*) NO MODELO DE
PLEURISIA INDUZIDA POR CARRAGENINA, EM
CAMUNDONGOS**

*Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Médicas do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Santa Catarina, como
requisito para a obtenção do título
de Mestre em Ciências Médicas.*

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Silvia Fröde.

Área de Concentração: Investigação Biomédica

Linha de Pesquisa: Mecanismos celulares e moleculares
envolvidos na patogênese e resposta
terapêutica da inflamação em vias aéreas

Florianópolis
2013

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

Reis, Gustavo Oliveira dos

Estudo do efeito anti-inflamatório da *Croton antisiphiliticus* Mart. (Euphorbiaceae) no modelo de pleurisia induzida por carragenina, em camundongos / Gustavo Oliveira dos Reis ; orientadora, Tânia Silvia Fróde - Florianópolis, SC, 2013.

94 p.

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

Inclui referências

1. Ciências Médicas. 2. Efeito anti-inflamatório. 3. *Croton antisiphiliticus*. 4. Pleurisia. 5. Produtos Naturais. I. Fróde, Tânia Silvia . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. III. Título.

Dedico este trabalho a Deus, por ter me proporcionado um momento tão especial na minha vida.

À minha mãe, Maria Madalena Duarte, pelo apoio incondicional e por lutar comigo para que este trabalho fosse realizado.

À minha família e amigos por toda ajuda, momentos de alegria e companheirismo.

À professora Tânia Silvia Fröde pela dedicação e confiança depositada durante todos esses anos de trabalho, dedicação, amizade, disponibilidade e contribuição na minha formação acadêmica e profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder saúde e força para a realização deste trabalho.

À minha mãe, Maria Madalena Duarte, por ser o meu forte pilar durante a execução deste trabalho e principalmente durante toda a minha jornada como estudante. Agradeço imensamente pela confiança depositada em mim, pelo apoio incondicional, por me ajudar a superar obstáculos que a vida colocou em nossos caminhos, por segurar na minha mão e não me deixar desistir, pelo amor imensurável e principalmente por ser meu maior exemplo de humanidade. Serei eternamente grato por tudo que você me fez e que continua fazendo, eu te amo.

À minha família, em especial os meus irmãos, Hedi Duarte e Edson Duarte, pelo apoio, confiança, companheirismo e união. À minha cunhada Degelane Córdova Duarte, pelo incentivo aos estudos e carreira acadêmica. Aos meus sobrinhos, Jorge Fernando Fagundes e Thais Córdova Duarte, pelos momentos de alegria.

A todos meus amigos que me trouxeram momentos de diversão e compreensão. Especialmente, aos meus amigos da faculdade que mudaram a minha vida e me tornaram uma pessoa melhor. Gostaria de fazer um agradecimento especial a Raquel Gomes Campos da Silva e Mariane Pansera, pelos maravilhosos anos vividos durante a faculdade, com certeza vocês serão levadas em meu coração pra sempre. Aos meus colegas do grupo de pesquisa em Imunologia Clínica (Ziliani Buss, Patrícia Pozzatti, Eduardo Dalmarco, Jucélia Benincá, Julia Salvan, Silvana Vigil, Silvana Zucolotto, Janaína Koelzer, Diana Pereira, Barbara Alves, Rafael de Liz, Gilliard Astolf, Geison Vicente, Bruno Facchin, Marina Nader, Andréia Thives, Daniel Nunes e Maria Anita Spindola), agradeço imensamente pelos momentos inesquecíveis de alegria, parcerias nos experimentos, conhecimentos compartilhados, companheirismo, pelos momentos de descontração vividos em congressos, um OBRIGADO imenso a todos vocês.

Ao professor Moacir Pizzolatti e sua aluna de Doutorado, Francieli Kanumfre de Carvalho, por fornecer o material vegetal e pela parceria neste trabalho.

À professora Tânia Silvia Fröde, por todos esses anos de trabalhos desenvolvidos juntos, pela orientação desde minha

iniciação científica até o mestrado. Serei eternamente grato pela confiança depositada. Eu jamais estaria concluindo esta etapa crucial da minha vida, sem sua ajuda. Agradeço por ser minha mentora e consolidar meus conhecimentos, além de contribuir de forma decisiva na minha formação acadêmica e profissional.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, agradeço pelos conhecimentos compartilhados e apoio concedido.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que de certa forma contribuíram para a construção deste trabalho e por terem acreditado em mim.

Muito Obrigado !!

Das Utopias

*“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”*

(Mário Quintana)

REIS, Gustavo Oliveira dos. **Estudo do efeito anti-inflamatório da *Croton antisyphiliticus* Mart. (Euphorbiaceae) no modelo de pleurisia induzida por carragenina, em camundongos.** 2013. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

Introdução: A *Croton antisyphiliticus* Mart., conhecida popularmente como canela-de-perdiz ou curradeira, é uma planta arbustiva do cerrado brasileiro, encontrada principalmente no estado de Minas Gerais. A medicina popular descreve o uso desta espécie no tratamento da sífilis, inflamação, lesões ulcerativas, eczemas e reumatismos. **Objetivo:** Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto, frações e compostos isolados obtidos da espécie *Croton antisyphiliticus* Mart. (Euphorbiaceae), no modelo da pleurisia induzida pela carragenina (Cg), em camundongos. **Metodologia:** Partes aéreas da *Croton antisyphiliticus* foram secas, maceradas e submetidas o processo de extração com etanol 96%, para obtenção do extrato bruto hidroalcoólico (EBH). Através de uma extração líquido-líquido, o EBH foi fracionado com o uso de diferentes solventes de polaridade crescente em: hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e aquosa (Aq). A fração Aq foi cromatografada em coluna de sílica gel, fornecendo 2 compostos: vitexina (VT) e ácido quínico (AcQ). Nesse estudo, foram utilizados camundongos albinos Swiss, fêmeas (18-22 g), os quais foram submetidos ao modelo experimental da pleurisia induzida pela Cg. No protocolo experimental, os animais receberam injeção endovenosa do corante Azul de Evans (25 mg/kg), para análise indireta da exsudação. Em seguida, diferentes grupos de animais foram tratados com o material vegetal (EBH, frações ou compostos isolados), 0,5 h antes da indução da pleurisia com uma injeção intrapleurial de Cg (1%). Após 4 h de pleurisia, avaliou-se o efeito do EBH, das suas frações: Hex, AcOEt e Aq, bem como dos compostos isolados: VT e AcQ, obtidos das partes aéreas da *Croton antisyphiliticus*, sobre a migração de leucócitos, exsudação, mieloperoxidase (MPO), adenosina-deaminase (ADA), metabólitos de óxido nítrico (NOx), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina-17 (IL-17). A análise

estatística utilizada foi o teste de variância ANOVA, complementado pelo teste de Newman-Keuls. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. **Resultados:** EBH, Hex, AcOEt, Aq, VT e AcQ inibiram: migração de leucócitos (neutrófilos), exsudação, atividade da MPO e ADA, e diminuíram as concentrações de NOx, TNF- α e IL-17 ($P < 0,05$). Entretanto, o AcQ não inibiu a secreção de TNF- α e IL-17 ($P > 0,05$).

Conclusão: Este estudo demonstrou que a *Croton antisiphiliticus* Mart. apresentou importante efeito anti-inflamatório, sendo a sua fração Aq, entre as frações avaliadas, a mais efetiva em diminuir a inflamação, o qual parece estar relacionado com a inibição da migração de leucócitos, principalmente os neutrófilos ativados, haja vista a capacidade da planta em reduzir a atividade das enzimas MPO e ADA. O material vegetal estudado também foi capaz de reduzir a concentração de mediadores pró-inflamatórios como: NOx, TNF- α e IL-17. Essa redução pode estar relacionada com a diminuição do recrutamento celular e extravazamento vascular para o sítio inflamatório, promovidos pelos compostos isolados, a VT e o AcQ.

Palavras-chave: *Croton antisiphiliticus* Mart.. Pleurisia. Inflamação. Vitexina. Ácido quínico.

REIS, Gustavo Oliveira dos. **Study of the anti-inflammatory effect of *Croton antisiphiliticus* Mart. (Euphorbiaceae) in the carrageenan-induced pleurisy in mice.** 2013. 94 p. Dissertation (Masters in Medical Sciences) – Graduate Program of Medical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

ABSTRACT

Introduction: *Croton antisiphiliticus* Mart. is popularly named as canela-de-perdiz or curraleira. It is a shrub plant found in the Brazilian savanna, mainly in the state of Minas Gerais. The folk medicine describes the use of this species in the treatment of syphilis, inflammation, ulcer, eczemas and rheumatisms.

Objective: To evaluate the anti-inflammatory effect of the crude extract, its fractions and isolated compounds obtained from the aerial parts of *Croton antisiphiliticus* Mart., in the carrageenan-induced pleurisy model. **Methodology:** Aerial parts of the plant were dried, macerated and extracted with ethanol 96% to obtain the crude hydroalcoholic extract (CHE), which was partitioned with solvents of increasing polarity to obtain 3 fractions: hexane (Hex), ethyl acetate (EA) and aqueous (Aq). The Aq fraction was chromatographed on silica gel column and resulted in 3 isolated compounds: vitexin (VT) and quinic acid (QA). Swiss mice, female (18-22 g), were used in the murine carrageenan-induced pleurisy model. In this experimental protocol, animals received a previous injection of Evans Blue Dye (25 mg/kg) intravenous, in order to evaluate the exudate concentration. Then, different groups of animals were pre-treated, by intraperitoneal route (i.p.), with the vegetable products obtained from *Croton antisiphiliticus* (CHE, its fractions and isolated compounds), 0.5 h before pleurisy induction with an intrapleural (i.pl.) injection of carrageenan (Cg: 1%). The anti-inflammatory effect of CHE, its fractions (Hex, EA and Aq) and isolated compounds (VT and QA) was investigated upon: leukocyte migration (neutrophils), exudation, myeloperoxidase (MPO), adenosine-deaminase (ADA), nitric oxide metabolites (NOx), tumoral necrosis factor- alpha (TNF- α) and interleukin-17 (IL-17). It was used to statistical analysis the variance test of ANOVA, which was complemented by Newman-Keuls test. Values of $P < 0.05$ were considered significant. **Results:** CHE, Hex, EA, Aq, VT and QA inhibited leukocyte

migration (neutrophils), exudation, and decreased MPO and ADA activities, as well as NO_x, TNF- α and IL-17 levels ($P < 0.05$). Although QA had inhibited those inflammatory parameters, it did not decrease the concentration of TNF- α and IL-17 ($P > 0.05$).

Conclusion: This study demonstrated the anti-inflammatory effect of *Croton antisiphiliticus* Mart. may be related to the inhibition of leukocyte migration, mainly activated neutrophils, since this plant is capable to reduce the activity of enzymes that is related to neutrophil activation (MPO and ADA). The extracted vegetable products obtained from this plant also decreased the levels of pro-inflammatory mediators, such as: NO_x, TNF- α and IL-17. Among the analyzed fractions, Aq fraction performed the best anti-inflammatory effect, which may be associated with its isolated compounds, VT and AcQ, in the inhibition of leukocyte recruitment and vascular fluid leakage in the inflammatory site.

Keywords: *Croton antisiphiliticus* Mart.. Pleurisy. Inflammation. Vitexin. Quinic Acid.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Partes aéreas (caules, folhas e inflorescências) da *C. antisyphiliticus* Mart. 30
- Figura 2** - Mecanismo de ação da mieloperoxidase (MPO) no processo inflamatório. 32
- Figura 3** - Mecanismo de ação da Adenosina deaminase (ADA) no processo inflamatório 34
- Figura 4** - Proposta de mecanismo de ação do óxido nítrico (NO) sintetizado por macrófagos via óxido nítrico sintase induzida (iNOS), durante a resposta inflamatória..... 36
- Figura 5** - Mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs)..... 39
- Figura 6** - Mecanismo de ação dos glicocorticoides (GCs)..... 40
- Figura 7** - Mecanismos de ação da carragenina 43
- Figura 8** - Fluxograma do processo de extração do extrato bruto e frações isoladas das partes aéreas da *Croton antisyphiliticus* Mart..... 47
- Figura 9** - Estruturas químicas dos compostos isolados da *C. antisyphiliticus*. 57
- Figura 10** - Eletroferogramas: A – extrato bruto hidroalcoólico; B – extrato bruto hidroalcoólico adicionado dos padrões de rutina, isoquercitrina, quercetrina e vitexina..... 58
- Figura 11** - Eletroferogramas: A – fração aquosa; B – fração aquosa adicionada dos padrões de rutina, isoquercitrina, quercetrina e vitexina. 59
- Figura 12** - Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (25 - 200 mg/kg) da *Croton antisyphiliticus* Mart, administrado por via intraperitoneal 0,5 h antes da carragenina, no modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos 62
- Figura 13** - Efeito da fração hexano (10 - 50 mg/kg) da *Croton antisyphiliticus* Mart, administrado por via intraperitoneal 0,5 h

antes da carragenina, no modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos 63

Figura 14 - Efeito da fração acetato de etila (10 - 50 mg/kg) da *Croton antisyphiliticus* Mart, administrado por via intraperitoneal 0,5 h antes da carragenina, no modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos 64

Figura 15 - Efeito da fração aquosa (10 - 50 mg/kg) da *Croton antisyphiliticus* Mart, administrado por via intraperitoneal 0,5 h antes da carragenina, no modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. 65

Figura 16 - Efeito da vitexina (5 - 25 mg/kg) da *Croton antisyphiliticus* Mart, administrado por via intraperitoneal 0,5 h antes da carragenina, no modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos 66

Figura 17 - Efeito do ácido quínico (5 - 25 mg/kg) da *Croton antisyphiliticus* Mart, administrado por via intraperitoneal 0,5 h antes da carragenina, no modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. 67

Figura 18 - Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (100 mg/kg), fração hexano (50 mg/kg), fração acetato de etila (50 mg/kg), fração aquosa (25 mg/kg), vitexina (10 mg/kg) e ácido quínico (25 mg/kg) obtidos das partes aéreas da *Croton antisyphiliticus*, administrados 0,5 h antes da indução da inflamação com carragenina sobre a atividade da enzima mieloperoxidase.. 68

Figura 19 -. Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (100 mg/kg), fração hexano (50 mg/kg), fração acetato de etila (50 mg/kg), fração aquosa (25 mg/kg), vitexina (10 mg/kg) e ácido quínico (25 mg/kg) obtidos das partes aéreas da *Croton antisyphiliticus*, administrados 0,5 h antes da indução da inflamação com carragenina sobre a atividade da enzima adenosina deaminase 69

Figura 20 - Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (100 mg/kg), fração hexano (50 mg/kg), fração acetato de etila (50 mg/kg), fração aquosa (25 mg/kg), vitexina (10 mg/kg) e ácido quínico (25 mg/kg) obtidos das partes aéreas da *Croton antisyphiliticus*, administrados 0,5 h antes da indução da inflamação com carragenina sobre a concentração de nitrito/nitrato 70

Figura 21 - Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (100 mg/kg), fração hexano (50 mg/kg), fração acetato de etila (50 mg/kg), fração aquosa (25 mg/kg), vitexina (10 mg/kg) e ácido quínico (25 mg/kg) obtidos das partes aéreas da *Croton antisiphiliticus*, administrados 0,5 h antes da indução da inflamação com carragenina sobre a concentração de fator de necrose tumoral-alfa. 71

Figura 22 - Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (100 mg/kg), fração hexano (50 mg/kg), fração acetato de etila (50 mg/kg), fração aquosa (25 mg/kg), vitexina (10 mg/kg) e ácido quínico (25 mg/kg) obtidos das partes aéreas da *Croton antisiphiliticus*, administrados 0,5 h antes da indução da inflamação com carragenina sobre a concentração da interleucina-17..... 72

Figura 23 - Proposta do efeito anti-inflamatório da *Croton antisiphiliticus* Mart. 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Correlações entre os parâmetros inflamatórios analisados no lavado pleural de animais inflamados e tratados previamente com o extrato bruto, frações e compostos isolados da <i>Croton antisiphiliticus</i> , no modelo de pleurisia, em camundongos.	73
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A1R – Receptor de adenosina 1
- A2_AR – Receptor de adenosina 2A
- A2_BR – Receptor de adenosina 2B
- A3R – Receptor de adenosina 3
- AcOEt – Fração acetato de etila da *Croton antispyhiliticus* Mart.
- AcQ – Ácido quínico
- ADA – Adenosina-deaminase
- AINEs – Anti-inflamatório não esteroideal
- ANOVA – Análise de variância
- AP -1 – Fator ativador proteico-1
- Aq – Fração aquosa da *Croton antispyhiliticus* Mart.
- Bcl 10 – *B cell leukemia/lymphoma10*
- Cg – Carragenina
- CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
- COX – Cicloxigenase
- CV – Coeficiente de variação
- Dexa – Dexametasona
- DMSO - dimetilsulfóxido
- DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crônica
- EBH – Extrato bruto hidroalcoólico da *Croton antispyhiliticus* Mart.
- e.p.m. – Erro padrão da média
- ELISA – Enzimaimunoensaio
- EROs – Espécies reativas de oxigênio
- GC – Glicocorticoide
- GR – Receptor de glicocorticoide
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HClO – Ácido hipocloroso
Hex – Fração hexano da *Croton antisiphiliticus* Mart.
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
Hsp-27 – *Heat shock protein-27*
I κ B – Proteína inibitória kappa B
IKK – Proteína inibitória kappa B quinase
IL-1 β – Interleucina-1 beta
IL-17 – Interleucina-17
Indo – Indometacina
i.p. – Intraperitoneal
i.pl. – Intrapleural
i.v. - Intravenoso
LOX – lipoxigenase
LPS – Lipopolissacarídeo
MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno
MPO – Mieloperoxidase
NEMO – NF- κ B *essential modulator*
NF- κ B – Fator de transcrição nuclear kappa B
NIK – Proteína quinase indutora do NF- κ B
NO – Óxido nítrico
NO₂⁻ – Nitrito
NO₃⁻ – Nitrato
NOS – Óxido nítrico sintase
eNOS/NOS3 – Óxido nítrico sintase endotelial
iNOS/NOS2 – Óxido nítrico sintase induzida
nNOS/NOS1 – Óxido nítrico sintase neuronal
NOx – Nitrito/nitrato
ONOO⁻ – Ânion peroxinitrito

OVA – Ovalbumina
PBS – solução tamponada de fosfato
PGD₂ – Prostaglandina D₂
PGE₂ – Prostaglandina E₂
PGF₂ – Prostaglandina F₂
PGG₂ – Prostaglandina G₂
PGH₂ – Prostaglandina H₂
PGI₂ – Prostaglandina I₂
PMN – Polimorfonuclear
RelA – Subunidade p65 do NF-κB
RelB – Subunidade do NF-κB
RMN – Ressonância magnética nuclear
STAT-1 – Ativador de transdução de sinal de transcrição – 1
TLR4 – Receptor *toll-like* 4
TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa
TXA₂ – Tromboxano A₂
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
VT – Vitexina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
1.1. PRODUTOS NATURAIS	27
1.2. GÊNERO <i>CROTON</i>	28
1.3. PROCESSO INFLAMATÓRIO	30
1.4. MODELOS DE INFLAMAÇÃO EM VIAS AÉREAS	41
2. OBJETIVOS	44
2.1. OBJETIVO GERAL	44
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
3. METODOLOGIA	45
3.1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	45
3.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS	45
3.3. ELETROFORESE CAPILAR DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÃO AQUOSA DA <i>CROTON ANTISYPHILITICUS</i> MART ..	48
3.4. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS DA <i>CROTON ANTISYPHILITICUS</i> MART.	48
3.5. ANIMAIS	49
3.6. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	50
3.7. TÉCNICAS UTILIZADAS.....	50
3.7.1. Contagem total e diferencial de leucócitos	50
3.7.2. Determinação da exsudação	51
3.7.3. Determinação da atividade da mieloperoxidase.....	51
3.7.4. Determinação da atividade da adenosina-deaminase.	52
3.7.5. Análise quantitativa do nitrito/nitrato.....	53
3.7.6. Determinação das concentrações do fator de necrose tumoral-alfa e da interleucina-17	53
3.7.7. Fármacos e reagentes.....	54

3.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
4.	RESULTADOS.....	56
4.1.	ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	56
4.2.	ELETROFORESE CAPILAR DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÃO AQUOSA DA <i>CROTON ANTISYPHILITICUS</i> MART. ..	56
4.3.	EFEITO DA <i>CROTON ANTISYPHILITICUS</i> MART. SOBRE A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS E EXSUDAÇÃO.....	60
4.4.	EFEITO DA <i>CROTON ANTISYPHILITICUS</i> MART. SOBRE A ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE	68
4.5.	EFEITO DA <i>CROTON ANTISYPHILITICUS</i> MART. SOBRE A ATIVIDADE DA ADENOSINA-DEAMINASE.....	69
4.6.	EFEITO DA <i>CROTON ANTISYPHILITICUS</i> MART. SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE NITRÍTO/NITRATO.....	70
4.7.	EFEITO DA <i>CROTON ANTISYPHILITICUS</i> MART. SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL- ALFA.....	71
4.8.	EFEITO DA <i>CROTON ANTISYPHILITICUS</i> MART. SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE INTERLEUCINA-17	72
5.	DISCUSSÃO	74
6.	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS.....	79
	ANEXO I.....	91
	ANEXO II.....	92
	ANEXO III.....	93

1. INTRODUÇÃO

1.1. PRODUTOS NATURAIS

Uma das mais importantes áreas de interesse para estudo no século XXI é a pesquisa sobre produtos naturais, cuja finalidade é buscar novas substâncias que sejam capazes de demonstrar potenciais atividades terapêuticas. Além disso, com o intuito de fornecer um embasamento científico aos conhecimentos oriundos da medicina popular, muitos estudos visam encontrar substâncias que possam ser futuras candidatas a fontes de obtenção de novas estruturas químicas que sejam de interesse à indústria farmacêutica, devido às suas atividades farmacológicas específicas, contribuindo para a produção de novos produtos farmacêuticos, voltados principalmente para o tratamento de doenças de caráter inflamatório (ISSA; VOLATE; WARGOWICH, 2006).

Entre os anos de 2001 a 2010, 16 novas substâncias oriundas de produtos naturais foram aprovadas nos EUA para uso clínico pelo *Food and Drug Administration*. A partir desse período, a medicina ocidental vem utilizando com frequência as substâncias terapêuticas obtidas de pequenas moléculas de origem natural. Esse fato, explica o motivo que leva os estudos atuais a explorarem a elucidação e purificação de compostos responsáveis pelos efeitos biológicos observados experimentalmente (KINGHORN et al., 2011).

A investigação do potencial terapêutico de produtos naturais tem demonstrado ser uma valiosa fonte de lucros para alguns países, como a China, cujos produtos relacionados a medicina alternativa, que inclui diferentes tipos de plantas medicinais, arrecadou um total de 14 bilhões de dólares (ROBINSON; ZHANG, 2011). Em 2007, o Brasil investiu um total de 160 milhões de dólares na fabricação de produtos obtidos de plantas medicinais e vem buscando a regularização da fabricação de tais produtos (ROBINSON; ZHANG, 2011).

No elenco diversificado de produtos naturais, as plantas são as maiores fontes de novos compostos com ação biológica, cerca de 62% (KINGHORN et al., 2011). Diversos estudos têm demonstrado o efeito benéfico de plantas em diferentes doenças, como àquelas caracterizadas pela resposta inflamatória, em que a ação de compostos vegetais biologicamente ativos tem

demonstrado eficácia em estudos *in vivo* e *in vitro*. Dentre as doenças mais pesquisadas, destacam-se o câncer e as doenças inflamatórias crônicas (ISSA; VOLATE; WARGOWICH, 2006).

O conhecimento sobre o uso de plantas medicinais é milenar e passado de geração em geração, constituindo uma das principais ferramentas terapêuticas desenvolvida pelo homem. A forma mais comum de utilização do material vegetal é a infusão (chá). As infusões tornaram-se alvos de muitos estudos por possuírem metabólitos bioativos capazes de serem utilizados como futuras opções na cura de doenças de difícil tratamento (HAMER, 2007; CHEN et al., 2008; SUSUKI et al., 2009).

Entre as substâncias encontradas em nos chás, destacam-se os flavonoides, metabólitos polifenólicos encontrados amplamente no reino vegetal (HAMER, 2007; AMADO et al., 2011). Nos últimos anos, o estudo dessas substâncias tem aumentado graças à compreensão dos seus efeitos nas cascatas envolvidas em vias de sinalização celular, que por sua vez são fundamentais na patogênese de inúmeras doenças, como o câncer (AMADO et al., 2011). O cenário da inflamação é um dos mais estudados para a análise desses compostos, os quais já demonstraram possuir atividade anti-inflamatória em distintos modelos experimentais para doenças alérgicas e inflamatórias, como a asma e a artrite reumatoide (PARK et al., 2009; LEE et al., 2012).

Dessa forma, tendo em vista a aplicabilidade de produtos naturais, principalmente na fitoterapia, em várias doenças, bem como a sua aceitação crescente por parte dos usuários e profissionais (ROSA; CÂMARA; BÉRIA, 2011), torna-se fundamental o estudo de tais matérias-primas, com a finalidade de comprovar a eficácia desses produtos.

1.2. GÊNERO *Croton*

O gênero *Croton* é o mais amplo contido na família Euphorbiaceae, compreendendo cerca de 1.300 espécies, distribuídas principalmente nas áreas tropicais e subtropicais do planeta. (BERRY et al, 2005; SALANTINO; SALANTINO; NEGRI, 2007). O estudo de tais espécies tem sido realizado em diferentes linhas de pesquisa, tendo em vista as propriedades biológicas de seus metabólitos secundários, tais como: óleos voláteis, diterpenos, proantocianidinas e alcalóides

(MILANOWSKI et al., 2002; BLOCK et al., 2004; SALANTINO; SALANTINO; NEGRI, 2007; VUNDA et al., 2012).

No intuito de consolidar os conhecimentos da medicina popular, algumas linhas de pesquisa estudam a capacidade de espécies pertencentes ao gênero *Croton* em diminuir os sinais e sintomas de doenças inflamatórias de caráter crônico. Nesse sentido, Maciel e colaboradores (2000) demonstraram, em estudos *in vivo* e *in vitro*, os efeitos biológicos dos diterpenos provenientes da espécie *Croton cajucara*, destacando a ação anti-inflamatória e antinociceptiva, além das ações: hipoglicemiante, anti-ulcerativa, antiespasmódica, antitumoral e antiestrogênica. Estudos sobre a ação farmacológica da espécie *Croton celtidifolius* demonstraram a existência de efeitos antinociceptivo, anti-inflamatório e antioxidante dos seus extratos e frações (NARDI et al., 2003; NARDI et al., 2006), além da ação vasorelaxante e neuroprotetora promovida pelas suas frações ricas em proantocianidinas (DALBO et al., 2008; MOREIRA et al., 2010). Os efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo também foram observados por Rocha e colaboradores (2008) no estudo farmacológico do extrato metanólico obtido das folhas da espécie *Croton pullei*, que inibiu a inflamação e a dor, no modelo de peritonite induzida por carragenina (Cg) e no teste da formalina, respectivamente. Cabe ainda ressaltar os demais efeitos biológicos provenientes da ação de compostos obtidos das espécies do gênero *Croton*, tais como: ação antimicrobiana das espécies *Croton pallidulus*, *Croton ericoides*, *Croton isabelli* (VUNDA et al., 2012); efeito anti-hipertensivo da *Croton zambesicus* (BACCELLI et al., 2005), efeito antidiarreico da espécie *Croton lechleri* (COTTREAU et al., 2012) e aumento do tempo de trombina induzido pelo extrato metanólico da *Croton ruzianus*, no teste *in vitro* de agregação plaquetária (PIACENTE et al., 1998).

A *Croton antisiphiliticus* Mart. (**Fig.1**) é uma planta arbustiva, encontrada principalmente nos estados brasileiros que contêm vegetações típicas do cerrado, principalmente o estado de Minas Gerais, onde é conhecida popularmente como: canela – de – perdiz, curraleira, pé – de – perdiz ou alcanforeira (AMORIM; BATALHA, 2007; RODRIGUES; CARVALHO, 2007; BRANDÃO et al., 2012). A etnofarmacologia desta planta é descrita por populações rurais do cerrado brasileiro, sendo o seu principal uso na forma de chás no tratamento de sífilis,

inflamação, lesões ulcerativas, eczemas e reumatismos (HIRSCHMANN; ARIAS, 1990; RODRIGUES, CARVALHO, 2007; BRANDÃO et al., 2012).

Existem poucos estudos sobre a ação biológica da *Croton antisiphiliticus*. Estudos *in vitro* avaliaram o efeito anti-inflamatório do extrato da planta em inibir a atividade da 5-lipoxigenase, uma enzima envolvida na produção de mediadores pró-inflamatórios, como o leucotrieno B4 (BRAGA et al., 2000). Ademais, a fração clorofórmio da raiz da planta apresentou ação antimicrobiana frente à cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) (PEREIRA et al., 2012).

Tendo em vista seu uso na medicina popular em afecções inflamatórias, além da escassez de estudos que comprovem seus efeitos biológicos, o presente estudo se propôs a avaliar o possível efeito anti-inflamatório do extrato bruto, frações e compostos isolados obtidos da espécie *Croton antisiphiliticus* Mart., com o intuito de elucidar a ação biológica dessa planta e relacionar tal efeito à presença de estruturas químicas que possam ser de interesse à indústria farmacêutica na produção de fármacos com ação anti-inflamatória.



Figura 1 - Partes aéreas (caules, folhas e inflorescências) da *C.antisiphiliticus* Mart.
Fonte: <http://fm1.fieldmuseum.org/vrrc/?page=view&id=74928&PHPSESSID=b85>,
acesso em: 12/11/2012

1.3. PROCESSO INFLAMATÓRIO

O processo inflamatório consiste em um conjunto de reações celulares envolvendo o sistema imunológico e vascular, na tentativa de defender o hospedeiro contra possíveis agentes nocivos. Para tanto, essa resposta envolve múltiplos eventos caracterizados por vias de ativação e modulação celular que

dependem do tipo de agente lesivo e do estímulo gerado. A inflamação está associada a várias doenças de origem infecciosa ou relacionada diretamente ao sistema imunológico (NEWTON; DIXIT, 2012). Quando a resposta inflamatória não é solucionada com êxito, ocorre a progressão da lesão tecidual, em decorrência da ativação celular exacerbada e da produção massiva de mediadores inflamatórios, com posterior perda da atividade funcional do órgão afetado. Entretanto, a inflamação também pode ser considerada um mecanismo de reparo, haja vista a capacidade de substituição do tecido lesionado (DORWARD et al., 2012).

As características clínicas da resposta inflamatória, descritas por Celsus, há mais de 2000 anos, estão bem estabelecidas pelos sinais clássicos, como: calor, rubor, tumor e dor (DORWARD et al., 2012). A cascata de reações que inicia a inflamação promove o aumento da permeabilidade vascular, em capilares e vênulas, permitindo a infiltração de células inflamatórias tais como os leucócitos, polimorfonucleares (PMNs) e mononucleares, no tecido lesionado, os quais são atraídos pela ação de diferentes mediadores com a função de quimiotaxia (PHILLIPSON; KUBES, 2011; SHI, PAMER, 2011). Durante esse processo, em que a migração de leucócitos para o local da inflamação é facilitada pelo aumento da síntese de moléculas de adesão nos vasos sanguíneos, ocorre a passagem de proteínas plasmáticas para o local onde foi iniciada a resposta inflamatória, dando origem ao edema, que é resultante do acúmulo de exsudato composto por proteínas plasmáticas, leucócitos e mediadores inflamatórios (POBER; SESSA, 2007).

Na resposta inflamatória, os PMNs exercem a primeira linha de defesa do hospedeiro, sendo os neutrófilos as principais células envolvidas nesse processo, desempenhando a importante função de destruição do agente causal por meio da fagocitose e liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ARNHOLD; FLEMMIG, 2010). A ativação dessas células promove aumento expressivo da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), uma enzima estocada nos grânulos primários dos neutrófilos, cuja função primordial é a conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em ácido hipocloroso (HClO), um composto com ação antimicrobiana e importante durante a resposta imune inata (PROKOPOWICZ et al., 2012) (**Fig. 2**). Porém, a liberação do HClO e as demais espécies reativas, em

altas concentrações, exercem ações citotóxicas e conseqüentemente geram lesões teciduais (ARNHOLD; FLEMMIG, 2010). Ademais, o papel da MPO também tem sido associado a uma série de eventos celulares, como a quimiotaxia de PMNs, demonstrado, em estudos, pela diminuição do influxo dessas células, no tecido pulmonar de camundongos knockout para MPO, após a estimulação com lipopolissacarídeo (LPS) (LAU et al., 2005; HAEGENS et al., 2009).

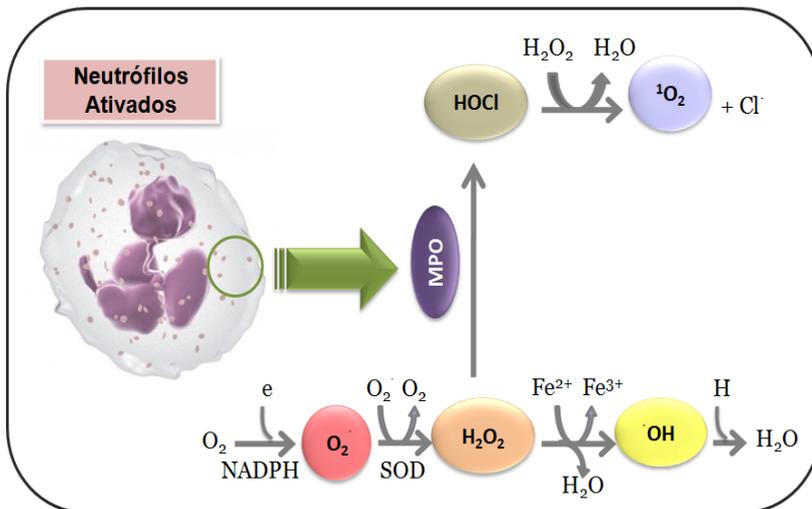


Figura 2 – Mecanismo de ação da mieloperoxidase (MPO) no processo inflamatório. A MPO é responsável pela conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em ácido hipocloroso (HClO), um composto com ação antimicrobiana e importante durante a resposta imune inata. Adaptado de Prokopowicz e colaboradores (2012).

A redução da migração celular é um requisito importante para a resolução da resposta inflamatória (SERHAN; SAVILL, 2005) ou pelo bloqueio de moléculas de adesão ou pela diminuição da síntese de quimiocinas (MACKAY, 2008). Dessa forma, a avaliação da atividade da MPO é uma ferramenta útil para avaliação indireta da presença de neutrófilos ativados no sítio inflamatório, sendo essas células encontradas em enfermidades respiratórias graves como a asma e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (MAK, 2008; MONTESEIRÍN, 2009).

Os leucócitos mononucleares também possuem grande importância na manutenção do processo inflamatório. Essas células, quando ativadas, apresentam aumento da atividade da adenosina-deaminase (ADA), uma enzima de ação catabólica de purinas, cujo substrato é o nucleosídeo adenosina, o qual é convertido em inosina, tanto dentro como fora da célula (HASKÓ; CRONSTEIN, 2004). A adenosina é um mediador endógeno com ação pleiotrópica e desempenha seus efeitos anti-inflamatórios (ação constitutiva) ou pró-inflamatórios, dependendo do tipo de receptor ativado e da sua concentração no sítio inflamatório (GIVERTZ, 2009). Para tanto, existem quatro tipos de receptores já descritos para adenosina, os quais são denominados: A_1R , $A_{2A}R$, $A_{2B}R$ e A_3R (FREDHOLM et al., 2001). Tais receptores apresentam diferentes graus de afinidade pela adenosina e estão localizados na superfície de diversas células, principalmente em leucócitos (HASKÓ; CRONSTEIN, 2004) (**Fig. 3**). Estudos com modelos experimentais utilizando animais com deleção gênica para ADA buscam elucidar o papel da adenosina na ativação celular durante a resposta inflamatória.

Este complexo mecanismo envolve a ação da ADA sobre a adenosina liberada durante o dano tecidual, reduzindo a concentração desse substrato para a ordem de picomolar, o que favorece a interação do nucleosídeo com os receptores envolvidos na resposta pró-inflamatória (A_1R e A_3R). Por outro lado, a concentração de adenosina está mais elevada em condições fisiológicas, na ordem de nanomolar, facilitando a sua ligação a receptores que controlam a resposta anti-inflamatória ($A_{2A}R$ e $A_{2B}R$). Dessa forma, a diminuição da adenosina propicia a ativação dos receptores pró-inflamatórios, sugerindo que a alta atividade da ADA atue de forma oposta ao efeito constitutivo da adenosina, devido à depleção deste nucleosídeo, logo contribuindo para a geração do processo inflamatório (KUMAR; SHARMA, 2009; KÁLVEGREN; FRIDFELDT; BENGTSSON, 2010).

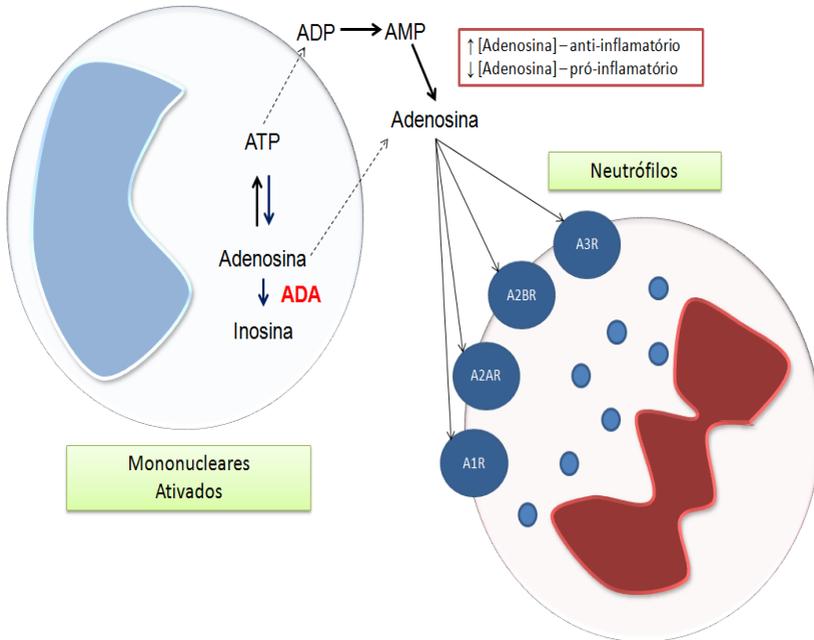


Figura 3 Mecanismo de ação da Adenosina deaminase (ADA) no processo inflamatório. A ADA é responsável pelo catabolismo do nucleosídeo adenosina, gerando como produto a inosina. A redução da concentração da adenosina promovida pela ADA possibilita a ativação de receptores envolvidos na resposta pró-inflamatória, as concentrações elevadas de adenosina ativam receptores de geram a resposta anti-inflamatória. Os receptores de adenosina são denominados em: A₁R, A_{2A}R, A_{2B}R e A₃R. Adaptado de Haskó e Cronstein (2004) e Kälvegren, Fridfeldt e Bengtsson (2010).

Na clínica, a avaliação da atividade da ADA é uma ferramenta útil na avaliação do grau da resposta inflamatória em doenças como a tuberculose (MORRISON; NEVES, 2008). Estudos já demonstraram o aumento significativo da atividade dessa enzima em outras doenças, tais como: artrite reumatoide (ZAKERI et al., 2012), lúpus eritematoso sistêmico (HITOGLOU et al., 2001), doença de Crohn (MAOR et al., 2011), leishmaniose (TRIPATHI et al., 2008) e nos cânceres de ovário (URUNSAK et al., 2012) e mama (AGHAEI et al., 2010).

A liberação de mediadores inflamatórios é um passo essencial na consolidação da inflamação. Uma das substâncias

que vem recebendo destaque é o óxido nítrico (NO), que é um gás solúvel sintetizado a partir da metabolização do aminoácido L-arginina, em uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (GHOSH; ERZURUM, 2011). Existem três isoformas conhecidas da enzima NOS, duas são produzidas de forma constitutiva: no endotélio (eNOS) e nos neurônios (nNOS). Uma terceira isoforma é sintetizada durante o processo inflamatório, correspondendo à forma induzida (iNOS) (POBER; SESSA, 2007).

A síntese de NO pela iNOS é mediada principalmente pelos macrófagos sob estimulação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina (IL) - 1 beta (IL-1 β), sendo esse um importante mecanismo responsável pelo aumento da permeabilidade vascular, o que conseqüentemente facilita a formação do edema e a infiltração de células inflamatórias no tecido lesionado (POBER; SESSA, 2007). Além disso, nesse contexto, há uma intensa produção de espécies reativas de nitrogênio, haja vista que a produção excessiva de NO também é responsável pela geração de compostos de alta reatividade, como o ânion peroxinitrito (ONOO⁻), cuja alta concentração contribui para a lesão tecidual, principalmente pelo processo de peroxidação lipídica, além da geração de danos estruturais a proteínas e ao material genético (HOU et al., 2011; KVIETYS; GRANGER, 2012) (**Fig. 4**).

Para avaliar a participação do NO na resposta inflamatória, utilizando modelos experimentais, os estudos buscam quantificar a concentração dos seus metabólitos, nitrito/nitrato (NOx), no sítio inflamatório, ou investigar a produção da iNOS nos tecidos lesionados. A síntese de iNOS está aumentada durante a lesão pulmonar aguda em camundongos, sendo esse fato comprovado por Cuzzocrea e colaboradores (2000), os quais também demonstraram que na resposta deflagrada pela Cg na cavidade pleural de animais knockout para iNOS havia diminuição da exsudação. A inibição farmacológica da iNOS, nos modelos experimentais murinos de pleurisia e edema de pata, também foi efetiva em reduzir a concentração do exsudato e a formação de edema, induzidos pela Cg, respectivamente (CUZZOCREA et al., 1998). Portanto, tais estudos comprovam a existência de uma correlação entre o aumento da permeabilidade vascular e a liberação de NO, pelo aumento da atividade da iNOS.

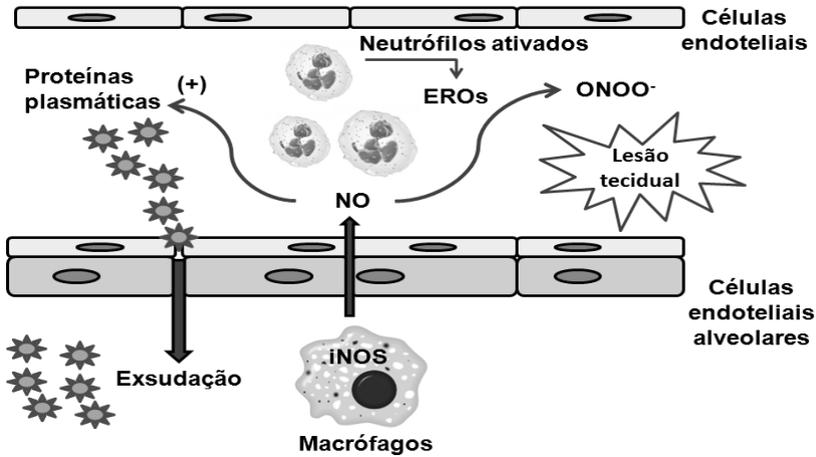


Figura 4 Proposta de mecanismo de ação do óxido nítrico (NO) sintetizado por macrófagos via óxido nítrico sintase induzida (iNOS), durante a resposta inflamatória. Efeito do NO sob a produção de espécies reativas, síntese do ânion peroxinitrito (ONOO⁻), e extravazamento vascular. Adaptado de Cuzzocrea e colaboradores (1998) e Kvietys e Granger (2012).

Além das citocinas serem importantes mediadores na manutenção da homeostase do organismo, seu papel na resposta inflamatória é vital para a coordenação e regulação da atividade da resposta imunológica. Uma vez que o estímulo inflamatório é desencadeado, a síntese e a liberação dessas proteínas são iniciadas por células, tais como: neutrófilos, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e células dendríticas (GILROY et al., 2004). As citocinas são produzidas como resultado da ativação celular pela ação de agentes de transcrição gênica, como o fator de transcrição nuclear kappa-B (NF-κB) e a ativador proteico-1 (AP-1) (MEDZHITOV; HORNG, 2009).

No elenco de citocinas que se destacam no processo inflamatório, o TNF-α apresenta um papel imunomodulador central, sendo essa condição evidenciada clinicamente em diversas doenças de caráter inflamatório crônico, como por exemplo: asma, psoríase, artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico (BERRY et al., 2007; TINCANI et al., 2007).

A síntese de TNF-α ocorre em macrófagos residentes do tecido lesionado, os quais sinalizam o dano tecidual pela secreção desta citocina, o que resulta em diferentes tipos de respostas celulares, tais como: recrutamento de leucócitos,

adesão e ativação celular, indução da síntese de proteínas de fase aguda, apoptose de leucócitos e proliferação de fibroblastos. Tais efeitos ocorrem pela ligação do TNF- α aos seus receptores tipo 1 e 2 (TNFR 1 e TNFR2), iniciando uma via de sinalização intracelular relacionada com a ativação do NF- κ B, um fator de transcrição responsável pela síntese de mediadores pró-inflamatórios, como: IL-6, IL-8 e o próprio TNF- α (BERRY et al., 2007; WONG; TERGAONKAR, 2009).

Uma nova citocina que vem se destacando é a IL-17, devido a sua ação regulatória sob a resposta imune inata, além de contribuir na patogênese de doenças infecciosas e autoimunes, como a psoríase e a artrite reumatoide (REYNOLDS; ANGKASEKWINAI; DONG, 2010). A IL-17 apresenta um grau de homologia de 63% na sequência de aminoácidos entre camundongos e humanos, o que permite a utilização de modelos experimentais murinos, para investigar o mecanismo de ação desta citocina na patogênese de doenças de caráter inflamatório, em que ocorre aumento do número de neutrófilos. Isso porque a função da IL-17 está relacionada ao recrutamento e a ativação dessas células no sítio inflamatório (ALCORN; CROWE; KOLLS, 2010). Além dos linfócitos T helper 17, já foi demonstrada que a secreção de IL-17 pode ocorrer em outros tipos celulares, tais como: neutrófilos, mastócitos e células natural killer (PAPPU; RAMIREZ-CARROZZI; SAMBANDAM, 2011). Nas doenças pulmonares em humanos, a IL-17 tem sido associada à infiltração de neutrófilos nas vias aéreas de indivíduos com asma e DPOC (ALCORN; CROWE; KOLLS, 2010; PARK; LEE, 2010).

Com base em sucessos obtidos com terapias que bloqueiam a ação do TNF- α , a atenção para moléculas capazes de impedir a interação dessa citocina com o seu receptor tornou-se foco de estudos em modelos animais, principalmente àqueles baseados em estudos que visam estabelecer uma relação entre o TNF- α com o sistema imunológico (CROFT, 2009). Para tanto, existem relatos na literatura que destacam a importância da ação sinérgica de citocinas em perpetuar a resposta inflamatória. O TNF- α e a IL-17 têm demonstrado atuar de forma conjunta na resposta inflamatória neutrofílica, principalmente através do aumento da síntese de CXCL5, um membro do grupo de quimiocinas da família CXC e que contribui para o recrutamento de neutrófilos durante a resposta inflamatória nos pulmões. Um

estudo *in vitro*, usando cultura de células alveolares, mostrou aumento na expressão dessa quimiocina, o que foi posteriormente confirmado no modelo *in vivo* de pneumonia induzida por *Escherichia coli* em camundongos (LIU et al., 2011).

Para o tratamento de doenças inflamatórias, existem duas classes de fármacos utilizados com mais frequência na prática médica: os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e os anti-inflamatórios esteroidais. Neste estudo, um representante de cada classe foi utilizado para o controle da resposta inflamatória. Os AINEs atuam inibindo a enzima ciclooxigenase, responsável por catalisar a reação que converte o ácido araquidônico em prostaglandina E_2 (PGE_2), um importante mediador da resposta inflamatória, associado a diversas doenças de caráter inflamatório como: artrite reumatoide, osteoartrite e doenças inflamatórias cutâneas (SU et al., 2010) (**Fig. 5**).

Os anti-inflamatórios esteroidais, ou glicocorticoides (GCs), são utilizados amplamente no tratamento de doenças de caráter inflamatório ou naquelas cujo mecanismo patogênico desenvolvido é autoimune. Além disso, esses fármacos também são utilizados no tratamento de indivíduos submetidos ao transplante de órgãos e alguns tipos de cânceres, uma vez que os GCs apresentam, além da atividade anti-inflamatória, propriedades imunossupressoras, dependendo da concentração utilizada (DE BOSSCHER; HAEGEMAN; ELEWAUT, 2010; OAKLEY; CIDLOWSKI, 2011). O efeito imunomodulatório ocorre pela ativação do receptor de glicocorticoides (GR), levando à inibição da transcrição gênica, via NF- κ B e AP-1, e de transdutores de sinal para a transcrição, como o ativador de transdução de sinal de transcrição - 1 (STAT-1) (KINO; SU; CHROUSOS, 2009; WHITEHOUSE, 2011) (**Fig. 6**).

Outro mecanismo envolvido na resposta celular aos GCs está relacionado ao efeito não-genômico, o qual ocorre após a estimulação de GR pelos GCs, levando a formação de mediadores anti-inflamatórios, como a anexina 1, que por sua vez inibe a atividade da enzima fosfolipase A_2 , responsável pela geração de ácido araquidônico, promovendo diminuição na produção de prostaglandinas (KAMAL; FLOWER; PERRETTI, 2005; LIM; PERVAIZ, 2007) (**Fig. 6**).

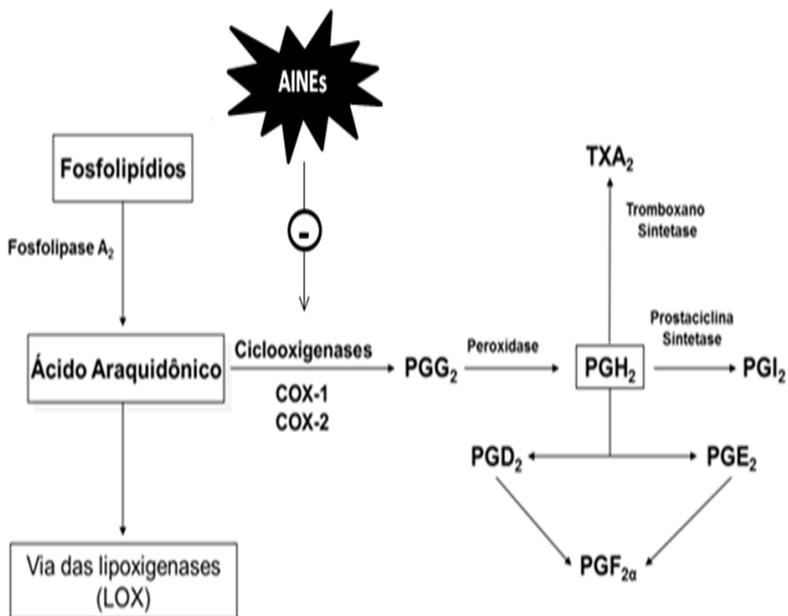


Figura 5 - Mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs). COX = ciclooxigenase; LOX = lipoxigenase; PGD₂ = protaglandina D₂; PGE₂ = protaglandina E₂; PGF₂ = protaglandina F₂; PGG₂ = protaglandina G₂; PGH₂ = protaglandina H₂; PGI₂ = protaglandina I₂; TXA₂ = tromboxano A₂; Fonte: Adaptado de Dannhardt e Kiefer (2001).

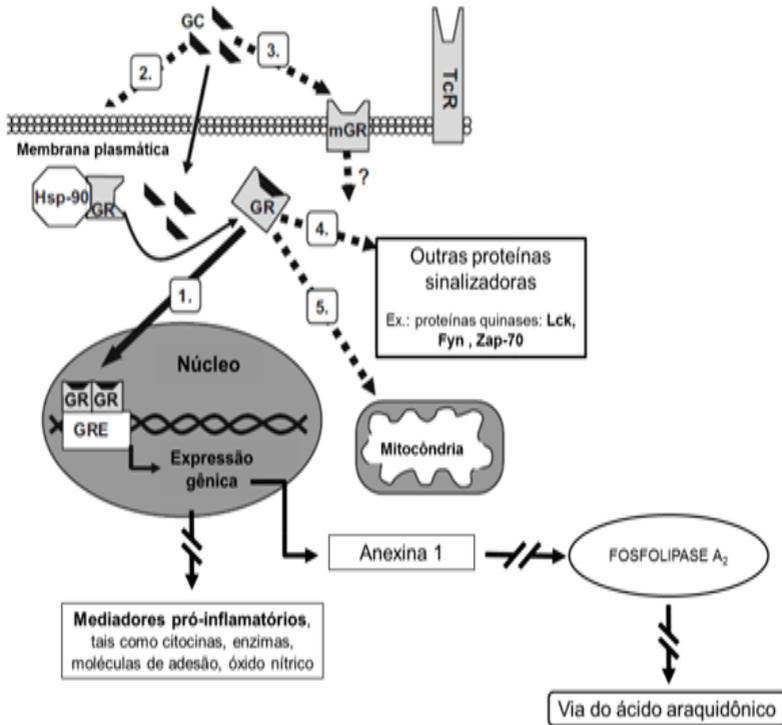


Figura 6 - Mecanismo de ação dos glicocorticoides (GCs). 1 = via genômica clássica; 2 = efeitos diretos na membrana; 3 = receptor de glicocorticoide (GR) de membrana; 4 = interação do GR com proteínas de sinalizadoras; 5 = via mitocondrial. Fonte: Adaptado de Boldizar e colaboradores (2010).

1.4. MODELOS DE INFLAMAÇÃO EM VIAS AÉREAS

Existem diferentes tipos de modelos experimentais com a finalidade de investigar a resposta inflamatória nas vias aéreas. Os estudos atuais, que usam camundongos em seus experimentos, utilizam o termo “asma murina” com a finalidade de fazer uma comparação com a doença no homem. Entretanto, tais modelos não descrevem com êxito as condições clínicas análogas à asma humana.

Apesar disso, os modelos experimentais são capazes de simular condições patológicas envolvidas no processo asmático, permitindo avaliar possíveis alvos terapêuticos de fármacos relacionados à patogênese da doença, bem como os complexos mecanismos de ação de citocinas e quimiocinas que promovem a resposta inflamatória.

O modelo experimental eosinofílico é o mais utilizado, visando avaliar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na patogenia da asma alérgica. Este modelo utiliza camundongos da linhagem BALB/c e consiste na sensibilização do animal com ovalbumina (OVA). Uma vez que a OVA é inalada pelo animal sensibilizado, inicia-se uma resposta alérgica imediata e uma tardia, com posterior migração leucocitária, à custas de eosinófilos (FUKUNAGA et al., 2007).

Outro modelo frequentemente empregado no estudo da inflamação em vias aéreas utiliza partículas virais. O intuito deste modelo é reproduzir os efeitos nocivos gerados por infecções no trato respiratório, principalmente em indivíduos com asma brônquica, os quais apresentam exacerbações da doença quando são acometidos por infecções virais. Para tanto, as partículas virais, como o vírus Sendai (em humanos, parainfluenza tipo 1) e pneumovírus (equivalente ao vírus sincicial respiratório em humanos), são administradas por via intranasal e os parâmetros inflamatórios são avaliados localmente, como: a análise do remodelamento tecidual, liberação de mediadores inflamatórios e celularidade (GRAHAM et al., 1988; TOURDOT et al., 2008).

Para o estudo da asma neutrofílica, que é uma modalidade da doença que apresenta difícil controle e refratariedade ao tratamento usual com corticosteroides, tem-se utilizado o modelo de pleurisia. Para a indução da inflamação

neste modelo experimental, diferentes agentes flogísticos podem ser empregados, como o LPS e a Cg.

O estímulo gerado pela Cg gera uma resposta inflamatória bifásica semelhante à asma, ou seja, a primeira fase ou fase recente (4 horas após receber o agente flogístico) é caracterizada pela resposta inflamatória aguda, seguida por uma resposta tardia, ou seja, segunda fase ou fase tardia (48 horas), onde ocorre o início do remodelamento tecidual (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996).

A Cg é um agente usado com frequência no modelo experimental de pleurisia, sendo essa substância um polissacarídeo sulfatado obtido de algas vermelhas (*Rhodophyceae*) e capaz de ativar a resposta imune inata por 3 diferentes mecanismos de ação. Primeiramente, a ligação da Cg ao receptor *Toll-like 4* (TLR4), gera duas cascatas de sinalização mediadas pela proteína *B-cell leukemia/lymphoma 10* (Bcl 10). Na via canônica, a ativação da Bcl10 inativa a proteína inibitória chamada de *NF-κB essential modulator* (NEMO) cuja função é impedir a ação da proteína inibitória kappa B quinase (IKK), pois uma vez ativada, essa enzima é responsável pela fosforilação da proteína inibitória kappa B (IκB). Após ser fosforilada no citoplasma da célula, a IκB é posteriormente destruída e deixa de exercer a sua ação inibitória sobre os dímeros do NF-κB, permitindo a translocação das subunidades p50 e RelA (p65) para o núcleo da célula, onde ocorre a transcrição de genes responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias (**Fig. 7**). A via não canônica caracteriza-se pela interação de Bcl10 com a proteína quinase indutora do NF-κB (NIK), que ativa a IKKα e promove a translocação do dímero p52 e RelB para o núcleo da célula onde irá também transcrever genes envolvidos na produção de citocinas pró-inflamatórias (**Fig. 7**). O outro mecanismo de ação deflagrado pela Cg está vinculado à produção de EROs, os quais reduzem a concentração da *heat shock protein – 27* (Hsp-27) fosforilada que parece estar envolvida no controle da ativação das enzimas quinases. Logo, a diminuição de Hsp-27 fosforilada induz uma maior ativação do NF-κB (**Fig. 7**) (BHATTACHARYYA et al., 2010; BORTHAKUR et al., 2012).

Na pleurisia, a resposta inflamatória gerada pela Cg promove o aumento da migração de leucócitos principalmente de neutrófilos, e o extravasamento de proteínas vasculares no sítio

inflamatório. O lavado pleural dos animais submetidos a essa inflamação apresenta um aumento na concentração de mediadores pró-inflamatórios, o que permite a investigação de diferentes tipos de substâncias, como: fármacos, drogas e produtos naturais.

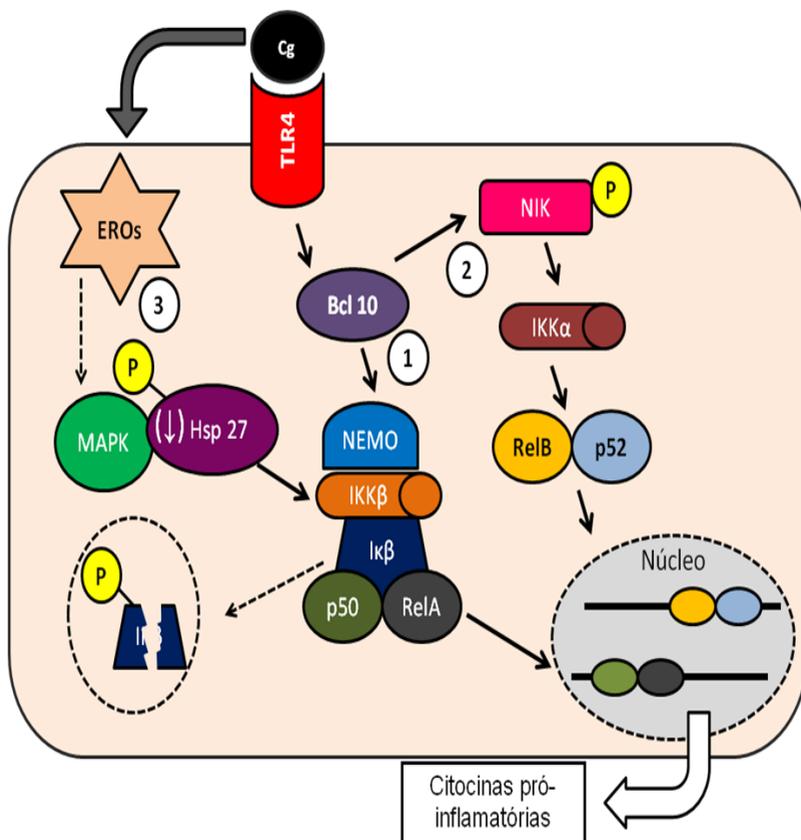


Figura 7 - Mecanismos de ação da carragenina. 1 = Via canônica; 2 = via não canônica e 3 = via dependente de espécies reativas de oxigênio. Adaptado de Bhattacharyya e colaboradores (2010) e Borthakur e colaboradores (2012).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto, frações e compostos isolados obtidos da espécie *Croton antisyphiliticus* Mart. (Euphorbiaceae), administrados por via intraperitoneal (i.p.), no modelo da pleurisia induzida pela Cg, em camundongos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito anti-inflamatório do material vegetal sobre a migração dos leucócitos e a exsudação;
- Investigar o efeito do material vegetal sobre: a atividade das enzimas MPO e ADA, e da concentração de NOx;
- Estudar o efeito da planta sobre a concentração de TNF- α e IL-17.

3. METODOLOGIA

3.1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal (partes aéreas) da *Croton antisiphiliticus* Mart. foi coletado nos encraves de vegetação típica de cerrado (RITTER; MORO, 2007) na Usina de São Jorge, região de Campos Gerais, município de Ponta Grossa, Paraná, em abril e junho de 2010, em parceria com o projeto "Identificação de espécies para restauração de ecossistemas impactados pela silvicultura no entorno do manancial de Alagados". Esse projeto foi coordenado pela Profa. Rosemeri Segecin Moro, da Universidade Estadual de Ponta Grossa. A espécie foi identificada pelo Prof. Dr. Daniel de Barcellos Falkenberg e a sua exsicata depositada no herbário FLOR da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Departamento de Botânica, com código FLOR 37688.

3.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS

As partes aéreas de *Croton antisiphiliticus* (421,0 g) foram secas em estufa com circulação de ar a 50 °C. Em seguida, as partes aéreas secas e maceradas foram submetidas à extração com etanol 96%, com volume suficiente para cobrir o material vegetal, a temperatura ambiente. Após 7 dias, o extrato obtido foi filtrado e o etanol removido, usando um evaporador rotativo sob pressão reduzida a 55 °C. Esse procedimento foi repetido por 3 vezes durante o período total de 21 dias, a fim de se obter o rendimento máximo do extrato bruto hidroalcolóico (EBH) que foi de 44,21 g (10,50%). O EBH obtido foi submetido a um fracionamento líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, resultando nas seguintes frações: hexano (Hex) (11,16 g) (25,25%), acetato de etila (AcOEt) (2,33 g) (5,28%) e aquosa (Aq) (3,39 g) (7,66%) (**Fig. 8**).

A fração Aq foi submetida ao fracionamento cromatográfico em uma coluna de sílica gel 60 (Vetec – 0.063–0.2 mesh) desativada com 15% de água e eluída com acetato de etila e quantidades crescentes de etanol (0-100%) e metanol (0-100%), resultando em 46 frações (125 mL cada). As frações 12-24 (85:15 acetato de etila-etanol) foram combinadas e purificadas

em acetato de etila e forneceram 162,0 mg (4,78%) do composto **1**, na forma de um pó amarelo. As frações 45-46 (100% metanol) foram combinadas e purificadas em etanol, fornecendo 307,0 mg (9,06%) do composto **2**, na forma de um pó marrom claro (**Fig. 8**).

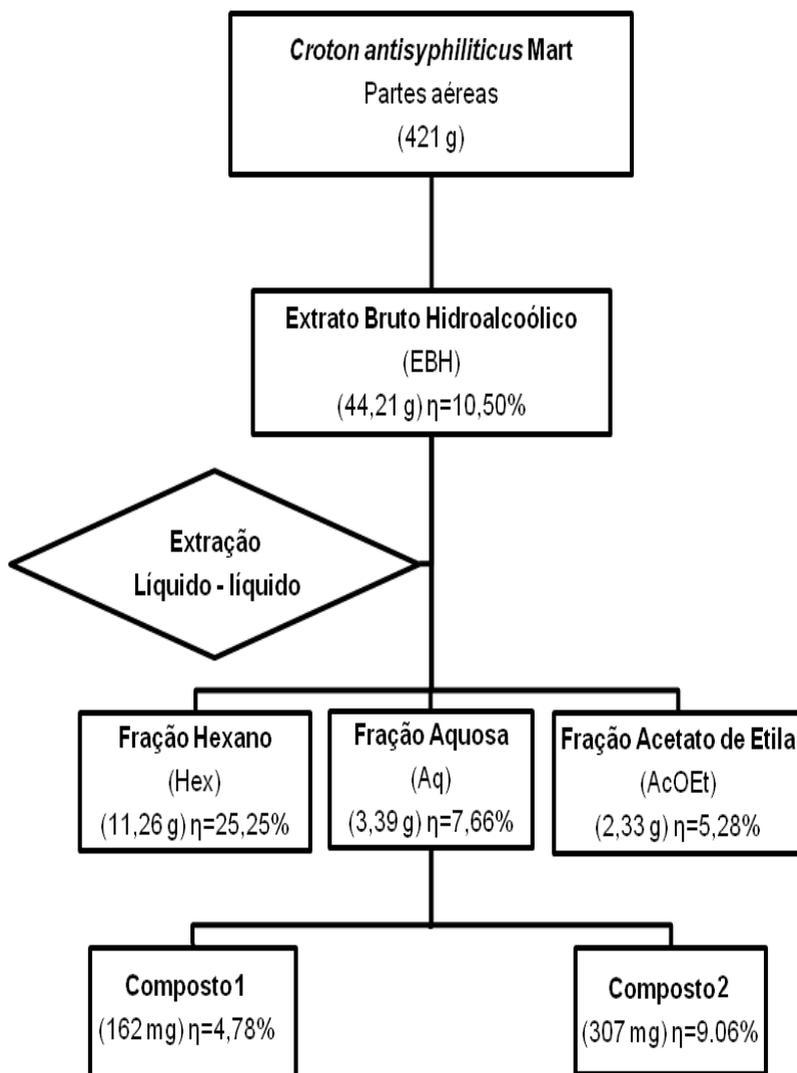


Figura 8 - Fluxograma do processo de extração do extrato bruto e frações isoladas das partes aéreas da *Croton antisiphiliticus* Mart. EBH = Extrato bruto hidroalcoólico; Hex = Fração hexano; AcOEt = Fração acetato de etila; Aq = Fração aquosa. η = percentual de rendimento.

3.3. ELETROFORESE CAPILAR DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÃO AQUOSA DA *Croton antisiphiliticus* Mart

Os experimentos envolvendo a separação eletroforética dos compostos presentes no EBH e na fração Aq foram realizados em um equipamento de eletroforese capilar modelo HP^{3D}CE, da marca Agilent Technologies (Palo Alto, CA, EUA) equipado com um detector de arranjo de diodos (DAD). As análises foram realizadas pela doutoranda Melina Heller, sob a orientação do professor Dr. Gustavo Micke. As condições instrumentais incluíram detector ajustado no comprimento de onda de 390 nm e temperatura do capilar de 25 °C. A aquisição e tratamento dos dados foram feitas com o software HP ChemStation, versão B.04.02. Em todos os experimentos, foi utilizado um capilar de sílica fundida de 48,5 cm (40 cm de comprimento efetivo) x 50 µm ID x 375 µm OD (Polymicro, Phoenix, AZ, EUA). Primeiro condicionamento do capilar: 30 min com hidróxido de sódio 1,0 mol L⁻¹, seguidos de 30 min de água desionizada. Condicionamento diário: 5 min com hidróxido de sódio 1,0 mol L⁻¹, seguidos de 5 min de água desionizada e 5 min com o eletrólito de corrida. O eletrólito de corrida foi composto por tetraborato de sódio 20 mmol L⁻¹ e 10% de metanol, pH 9,3. Tanto as amostras quanto os padrões foram injetados hidrodinamicamente (50 mBar durante 5 segundos) pela extremidade do capilar mais afastada do detector. A voltagem de separação foi de 30 kV com polaridade positiva no lado da injeção. As amostras foram preparadas pela dissolução de 9,5 mg de EBH e 10,5 mg da fração Aq, respectivamente, em 5 mL de metanol, sonicadas por 10 min, e injetadas diretamente no equipamento de eletroforese capilar sem nenhuma diluição.

3.4. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS DA *Croton antisiphiliticus* Mart.

As estruturas químicas dos compostos isolados foram determinadas pelas propriedades físicas e dados espectrais obtidos pelas análises de infravermelho (Perkin Elmer FTIR 16 PC, Beaconsfield, Bucks, England) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN ¹H e ¹³C) registradas em um espectrômetro Varian AS-400 (Varian Inc., Palo Alto, CA,

EUA), operando a 400 e 100 MHz, respectivamente. Os pontos de fusão foram determinados em aparelho de ponto de fusão Microquímica APF-302 (Microquímica Equipamentos Ltda, Palhoça, SC, Brasil). Finalmente, as estruturas dos compostos isolados foram confirmadas pela comparação com dados previamente publicados na literatura (MIYAZAWA et al., 2003; TANAKA et al., 2005) bem como por meio da técnica de eletroforese capilar com amostras padrão. A comparação dos eletroferogramas do EBH e fração Aq, com amostras padrão e as substâncias isoladas confirmaram a estrutura do composto **1** como a vitexina (VT). O composto **3** foi identificado no perfil cromatográfico por comparação com o composto isolado, bem como sua estrutura foi elucidada comparando-se dados da literatura com os dados obtidos para a amostra em espectrometria de massas com ionização por eletrospray e tempo de voo de massa (ESI-Q-TOF MS), os quais confirmaram a estrutura do ácido quínico. As medidas ESI-Q-TOF MS foram realizadas em espectrômetro de massa micrOTOF Q-II (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, EUA) equipado com fonte de *electrospray* padrão e bomba automática (KD Scientific) para injeção das amostras. As análises foram feitas no modo de íons positivos, com injeção em fluxo constante de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ e voltagem de 4,5 kV para uma temperatura de dessolvatação de 180 °C. O solvente utilizado foi a mistura de acetonitrila/metanol. O equipamento foi calibrado na faixa de 50-3000 m/z utilizando-se um padrão de calibração interno (Agilent Technologies, CA, USA). Os dados foram processados pelo software Bruker Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, EUA).

3.5. ANIMAIS

Neste protocolo experimental foram utilizados camundongos albinos Swiss com 2 meses de idade, fêmeas, pesando entre 18-22 g, fornecidos pelo Biotério Central da UFSC. Os animais receberam a devida alimentação, com água disponível durante todo o experimento, acomodação à luz natural em gaiolas de plástico (40 x 32 cm), com temperatura controlada de $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC) em 2011, sob o protocolo: PP00617 (ANEXO I).

3.6. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Neste protocolo experimental, diferentes grupos de animais (n= 6 animais/ grupo) receberam tratamento prévio com diferentes doses do EBH (25 – 200 mg/kg, i.p.) suas frações: Hex (10 – 50 mg/kg, i.p.), AcOEt (10 – 50 mg/kg, i.p.), Aq (10 – 50 mg/kg, i.p.) e os compostos isolados: VT (5 – 25 mg/kg) e AcQ (5 – 25 mg/kg) da *Croton antisiphiliticus* Mart. Após um intervalo de 0,5 h da administração do material vegetal, a pleurisia foi induzida com uma injeção de 0,1 mL de Cg (1%) na cavidade pleural (i.pl.) (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). Decorrido 4 h da indução da pleurisia, os animais foram submetidos ao procedimento de morte indolor assistida, com overdose de pentobarbital (180 mg/kg, i.p.). Em seguida, a cavidade pleural foi aberta e lavada, com 1,0 mL de solução salina tamponada (PBS, pH 7,6, composição mM: NaCl 130, Na₂HPO₄ 5, KH₂PO₄ 1, em água destilada) e heparinizada (20 UI/mL) para a determinação da migração leucocitária, exsudação, atividade das enzimas: MPO e ADA, e concentração dos mediadores inflamatórios: NOx, TNF- α e IL-17.

Em relação aos solventes utilizados nos produtos vegetais, a fração Aq foi solubilizada apenas em solução salina (NaCl, 0,9%), o EBH, as demais frações e os compostos isolados foram solubilizados em uma mistura de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) em solução salina (NaCl, 0,9%).

Todos os experimentos foram acompanhados por controles positivo (animais tratados somente com o agente flogístico, i.pl.) e negativo (animais tratados somente com solução salina estéril, i.pl.).

Em paralelo, diferentes grupos de animais foram tratados previamente com fármacos de referência com atividade anti-inflamatória: dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) e indometaciana (5 mg/kg, i.p.).

3.7. TÉCNICAS UTILIZADAS

3.7.1. Contagem total e diferencial de leucócitos

Para a contagem de leucócitos totais, foram utilizados 20 μ L do lavado da cavidade pleural, diluídos em líquido de Türk

(1:20) e contados em câmara de Neubauer, com o auxílio de um microscópio óptico comum (aumento de 400 vezes). Os resultados foram expressos em número total de leucócitos $\times 10^6/\text{mL}$.

Para a contagem diferencial, 50 μL das alíquotas dos lavados da cavidade pleural foram centrifugados em citocentrífuga (Wescor - Cytopro® cytocentrifuge, Logan, Utah, EUA) e corados pelo método de MayGrünwald-Giemsa. A contagem celular diferencial (neutrófilos e mononucleares) foi realizada em microscópio óptico comum (aumento de 1000 vezes), contando-se 100 células por lâmina. Os resultados foram expressos em números total de células $\times 10^6/\text{mL}$.

3.7.2. Determinação da exsudação

Para a avaliação indireta da exsudação, os animais foram tratados com uma solução do corante Azul de Evans (25 mg/kg, 0,2 mL/animal, i.v.), 10 minutos antes da indução da pleurisia (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). Este corante se liga a proteínas plasmáticas, principalmente a albumina, permitindo avaliar o grau de extravasamento vascular. Após 4 h, os animais foram mortos com overdose de pentobarbital e o lavado obtido da cavidade pleural foi distribuído em alíquotas de 200 μL para a determinação da concentração do corante Azul de Evans com o auxílio de uma leitora de microplacas de enzimmunoensaio (ELISA) (Organon – Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA). A leitura óptica foi realizada no comprimento de onda de 620 nm.

Para quantificar as concentrações de Azul de Evans nas amostras, uma curva padrão, com diferentes concentrações do corante (0,1 – 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), foi previamente realizada e lida no comprimento de onda de 620 nm, gerando uma equação da reta que permitiu a quantificação do corante nas amostras desconhecidas. Os valores das concentrações de Azul de Evans foram expressos em $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.7.3. Determinação da atividade da mieloperoxidase

Imediatamente após a morte dos animais, a amostra de lavado pleural foi utilizada para avaliar a atividade da enzima MPO. Para tanto, 20 μL de cada amostra do lavado da cavidade

pleural foi transferida para uma microplaca de ELISA e foi adicionado 180 μL de solução reagente (composição: 0,167 mg/mL de *o*-dianisidina.2HCl e 0,0005% de H_2O_2). Após 15 minutos de incubação, em temperatura ambiente, foi adicionado 30 μL de solução de azida sódica (1%) para interromper a reação enzimática (RAO et al., 1993). Em seguida, foi mensurada a densidade ótica de cada amostra, com auxílio de um leitor de microplacas de ELISA (Organon – Technica, Roseland, New Jersey, EUA), utilizando o comprimento de onda de 450 nm. A determinação da atividade da MPO foi realizada com o auxílio de uma curva-padrão, com concentrações conhecidas da enzima MPO (0,7 – 140 mU/mL) que tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos em mU/mL, com o auxílio de uma equação da reta.

3.7.4. Determinação da atividade da adenosina-deaminase

Para quantificação da atividade da enzima ADA, utilizou-se uma solução padrão de sulfato de amônio com concentração conhecida, cuja composição foi: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (15 mM) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (15 mM). As amostras do lavado pleural (10 μL) contendo a enzima ADA, foram transferidas para cubetas, onde a reação foi iniciada com a adição de: Tampão fosfato (pH 6,5, 250 μL , composição: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (15 mM) e adenosina (0,5 mM)). Após o período de incubação de 60 minutos a 37 °C, foi adicionado ao meio 500 μL solução de fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$, 1 mM) e nitroprussiato de sódio ($\text{C}_5\text{FeN}_5\text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,17 mM), seguida pela adição de 500 μL de solução alcalina de hipoclorito de sódio (NaOCl, 11 mM) (GIUSTI; GALANTI, 1984). A avaliação da atividade enzimática da ADA, presente no lavado pleural, foi avaliada pela geração de amônia promovida pela quebra da adenosina que foi adicionada ao meio. O produto da reação, a amônia, reage com o fenol e o hipoclorito, reação dependente de pH alcalino e catalisada pelo nitroprussiato de sódio, para a formação de um indofenol de coloração azul. A concentração de amônia é proporcional à concentração de indofenol gerado. A densidade ótica foi mensurada com auxílio de um leitor de microplacas de ELISA (Organon – Technica, Roseland, New

Jersey, EUA), utilizando o comprimento de onda de 620 nm. Os valores da atividade de ADA foram expressos em U/L.

3.7.5. Análise quantitativa do nitrito/nitrato

A produção de NO foi avaliada pela formação de seus metabólitos: nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-), pela reação de Griess (GREEN et al., 1982). As amostras de lavado pleural (300 μL) foram desproteinizadas com 30 μL de solução de sulfato de zinco (ZnSO_4 , 20%). Após incubação em banho de gelo por 60 minutos, foram adicionadas às amostras 6 μL de solução de hidróxido de sódio (NaOH , 2,5 N) centrifugadas (2.500 rpm por 15 minutos), obtendo-se um sobrenadante límpido. Em seguida, 100 μL do sobrenadante foram transferidos para uma cubeta e diluídos em uma solução contendo 100 μL de solução de cloreto de vanádio (VCl_3 , 0,8%) e ácido clorídrico (HCl , 3%) e 100 μL de solução de Griess (composição: sulfonamida ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, 1%), ácido fosfórico (H_3PO_4 , 5%) e N-(1-naftil etilenodiamina ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2$, 0,1%)) e a mistura foi incubada por 40 minutos, a 37 °C (MIRANDA; ESPEY; WINK, 2001). Na amostra de lavado pleural, o NO_3^- é convertido em NO_2^- pela oxidação com VCl_3 , o NO_2^- reage com a solução de Griess, alterando a coloração do meio para uma tonalidade rósea. A quantificação de NO_x foi realizada pela leitura da densidade ótica, com auxílio de um leitor de microplacas de ELISA (Organon – Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA), utilizando o comprimento de onda de 540 nm. Os valores das concentrações de NO_x foram expressos em μM . A determinação da concentração de NO_x foi obtida utilizando-se uma equação da reta que foi elaborada por meio de uma curva-padrão que utilizou concentrações conhecidas de NO_2^- (0 - 150 μM).

3.7.6. Determinação das concentrações do fator de necrose tumoral-alfa e da interleucina-17

Imediatamente após a morte dos animais com overdose de pentobarbital, obteve-se o lavado da cavidade pleural, o qual foi devidamente preparado para a reação de ELISA fase sólida, método sanduíche. Nesse protocolo, foram utilizados anticorpos específicos para as citocinas $\text{TNF-}\alpha$ e IL-17. Padrões com

concentrações conhecidas foram usados conforme instruções fornecidas pelo fabricante dos kits de TNF- α (BD- Biosciences Pharmingen, São Diego, Califórnia, EUA) e IL-17 (eBioscience, São Diego, Califórnia, EUA). As sensibilidades identificadas nos kits foram: TNF- α = 5 – 2000 pg/mL e IL-17 = 4 – 500 pg/mL. Os coeficientes de variação (CV) intra e interensaios observados foram: CV intra: TNF- α = $7.8 \pm 0.9\%$ e IL-17 = $7.5 \pm 1.7\%$; CV inter: TNF- α = $9.6 \pm 2.1\%$ e IL-17 = $6.2 \pm 0.9\%$. As curvas-padrão com concentrações conhecidas de TNF- α (5,00 – 2.300,00 pg/mL) e IL-17 (4,00 – 500,00 pg/mL) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos pela elaboração de uma equação da reta. A leitura das densidades óticas das citocinas TNF- α e IL-17 e as suas respectivas curvas-padrão foram realizadas em leitora de microplacas de ELISA (Organon – Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA) em 450 nm. Os valores foram expressos em pg/mL.

3.7.7. Fármacos e reagentes

Neste estudo, foram utilizados os seguintes reagentes e fármacos: dexametasona (Prodome Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, SP, Brasil), carragenina- λ (grau IV), hidróxido de sódio (NaOH), MPO de neutrófilos humanos, Indo, o-dianisidina 2HCl (3,3'-dimetoxibenzidina), azida sódica, Cloreto de Vanádio (VCl₃), sulfanilamida (C₆H₈N₂O₂S) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 30 %) (Biotech, São Paulo, SP, Brasil), adenosina (C₁₀H₁₃N₅O₄) (Fluka, Ronkonkoma, Nova York, EUA), heparina (Liquemine®, Roche, São Paulo, SP, Brasil), fosfato de sódio (NaH₂PO₄·H₂O), ZnSO₄ (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil), fenol (C₆H₅OH), fosfato de hidrogênio dissódico dodecahidratado (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), nitroprussiato (C₅FeN₅Na₂O·2H₂O) (Nuclear, São Paulo, SP, Brasil), acetonitrila (C₂H₃N), etanol (C₂H₆O), metanol (CH₄O), sulfato de amônio ((NH₃)₂SO₄) (Labsynth, São Paulo, SP, Brasil), ácido clorídrico (HCl), acetato de etila (C₄H₈O₂), hexano (C₆H₁₄) (Synth, Diadema, SP, Brasil), líquido de Türk, May-Grünwald (Newprov, Pinhais, PR, Brasil), Giemsa (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil), Azul de Evans (C₃₄H₂₄N₆O₁₄S₄Na₄) (Acros-Organics, Geel, Antwerp, Bélgica); Dihidrocloro de N-(1-naftil)-etilenodiamina (C₁₂H₁₆Cl₂N₂)

(Merck, Frankfurter, Darmstadt, Alemanha). Neste protocolo foram utilizados ainda, anticorpos específicos e padrões com concentrações conhecidas de citocinas de acordo com as instruções dos fabricantes, TNF- α (Cat. Nº 559732) (BD-Biosciences Pharmingen, São Diego, Califórnia, EUA) e IL-17 (Cat. Nº 88797129) (eBioscience, São Diego, Califórnia, EUA). Reagentes em grau de pureza analítica (PA): álcool de cereal (Quimidrol, Joinville, SC, Brasil); hidróxido de amônio (NH₄OH), anidrido acético (C₄H₆O₃), cloreto de acila (CH₃COCl) (Nuclear, Diadema, SP, Brasil). Também foram utilizados outros sais e reagentes, de grau de pureza analítica que foram obtidos de diferentes fontes comerciais.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos parâmetros inflamatórios estudados (leucócitos, exsudação, atividade das enzimas MPO e ADA, bem como a concentração de NOx, TNF- α e IL-17) foram expressos pela média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Diferenças estatísticas dos parâmetros analisados entre os grupos controle e tratados com material vegetal foram realizados por meio do teste de variância (ANOVA) (teste paramétrico), complementado pelo teste de Newman-Keuls. A correlação entre os parâmetros foi realizada por meio do teste de correlação de Pearson. Para todas as análises estatísticas, valores de *P* menores que 0,05 foram considerados significativos. O coeficiente de Pearson (r^2) maior que 0,0 ($r^2 > 0,0$) foi considerado correlação positiva. Para a análise dos resultados foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism[®] versão 3.0 (San Diego, Califórnia, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE FITOQUÍMICA

As partes aéreas, maceradas e submetidas ao processo de extração com etanol 96% resultou no EBH, o qual foi fracionado com solventes de polaridade crescente resultando nas seguintes frações: Hex, AcOEt e Aq. O fracionamento cromatográfico da fração aquosa da *Croton antisiphiliticus* resultou no isolamento de dois compostos conhecidos: um flavonoide, a VT (**Fig. 9A**) e um ácido fenólico, o AcQ (**Fig. 9B**). Todos os compostos foram analisados por métodos espectroscópicos e por comparação com os dados previamente publicados na literatura (MIYAZAWA; HISAMA, 2003; NG; LAFONTAINE; VANIER, 2004; TANAKA et al., 2005).

4.2. ELETROFORESE CAPILAR DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÃO AQUOSA DA *Croton antisiphiliticus* Mart

A determinação qualitativa de flavonoides nas amostras do EBH e da fração Aq obtidas da *Croton antisiphiliticus* Mart. dissolvidas em metanol foi realizada pela comparação dos eletroferogramas gerados pelas amostras com os respectivos eletroferogramas de uma mistura de padrões analíticos (rutina, isoquercitrina, quercetrina e vitexina). Os parâmetros utilizados para confirmar a identificação dos compostos foram o tempo de migração e os espectros de UV. Para aumentar a confiabilidade da análise foram realizados testes de adição dos padrões nas amostras. As Figuras 10 e 11 mostram os eletroferogramas do EBH e da fração Aq, respectivamente, sendo que as figuras 10a e 11a (linha azul) são os eletroferogramas sem a adição dos padrões e os eletroferogramas 10b e 11b (linha vermelha) são das amostras adicionadas dos padrões. Como pode ser observado, após a adição dos compostos padrões dos flavonoides, os picos referentes a estes analitos aumentaram em altura sem a formação de ombros confirmando a sua presença nas amostras, porém alguns picos continuam desconhecidos.

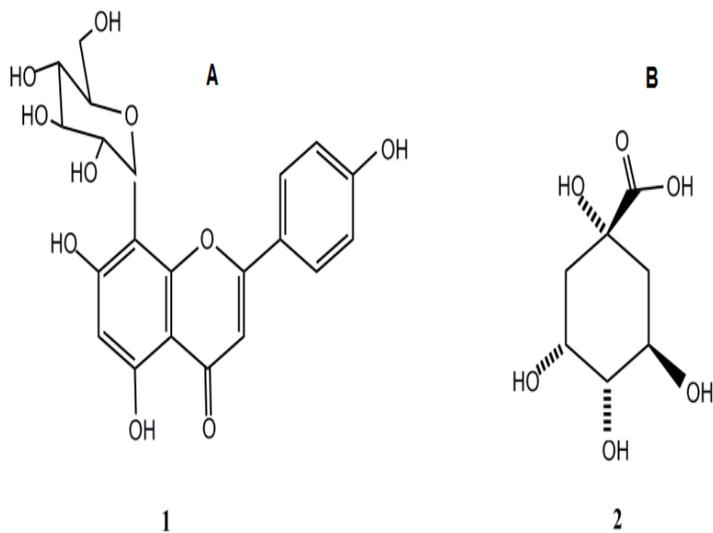


Figura 9 - Estruturas químicas dos compostos isolados da *C. antisiphiliticus*. A: Vitexina (Composto 1) ; B: Ácido quínico (Composto 2).

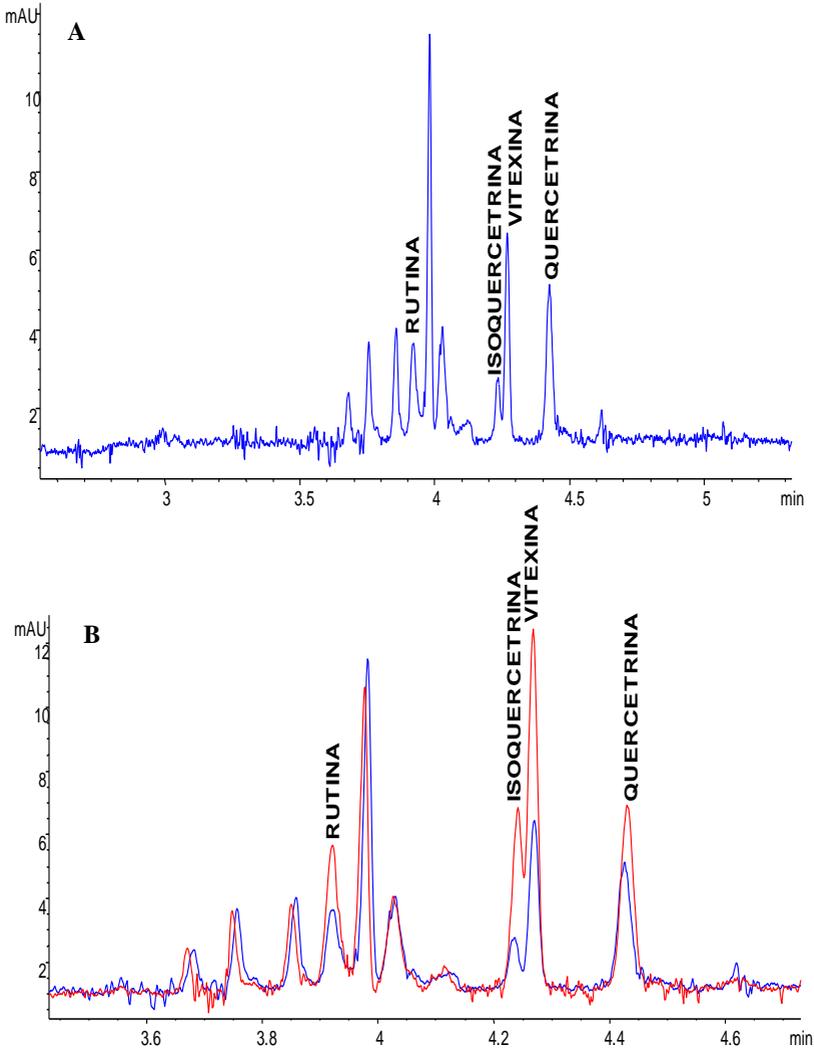


Figura 10 - Eletroferogramas: A – extrato EBH; B – EBH adicionado dos padrões de rutina, isoquercitrina, quercetrina e vitexina na concentração de 20 mg L^{-1} aproximadamente. Condições analíticas: Eletrólito de corrida constituído de tetraborato de sódio 20 mmol L^{-1} e metanol 10%, pH 9,3. Capilar de sílica fundida com revestimento externo de poliimida, dimensões: $40 \text{ cm L}_{\text{det}}$, $48,5 \text{ cm L}_{\text{tot}}$; $50 \text{ } \mu\text{m D}$. I. Tensão aplicada 30 kV. Injeção por pressão 50 mbar durante 5 s. Temperatura do capilar 25°C . Detecção direta em 390 nm.

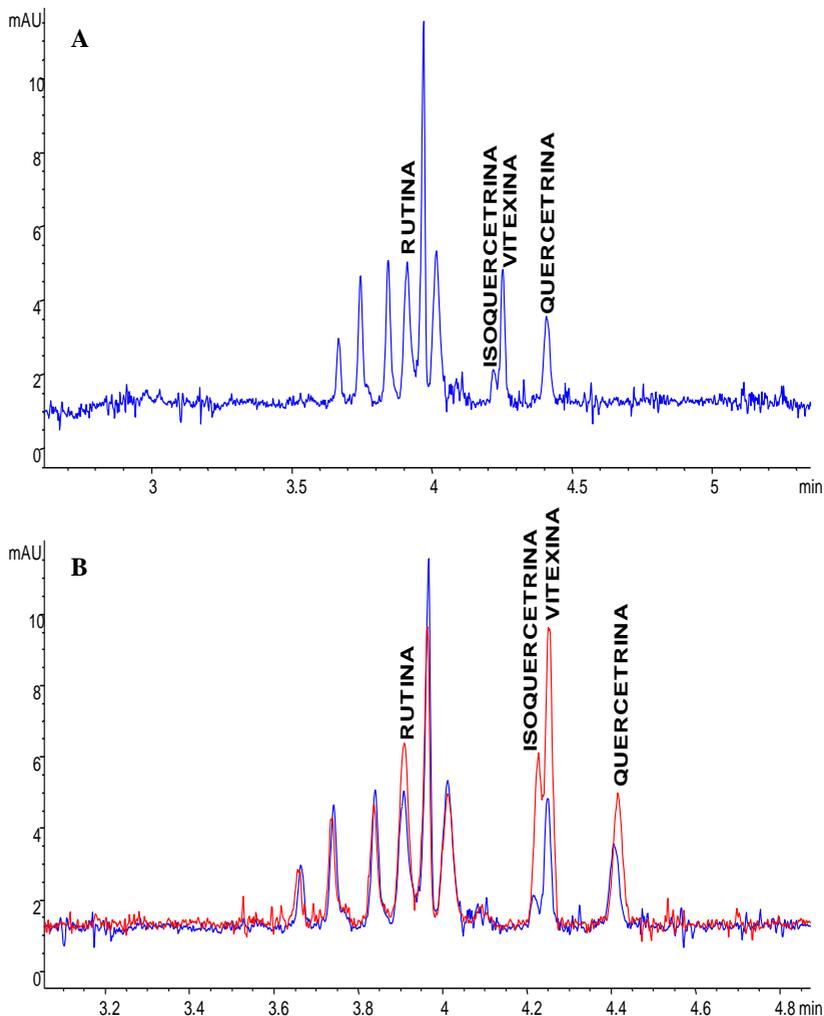


Figura 11 - Eletroferogramas: A – fração Aq; B – fração Aq adicionada dos padrões de rutina, isoquercitrina, quercetrina e vitexina na concentração de 20 mg L^{-1} aproximadamente. Condições analíticas: Eletrólito de corrida constituído de tetraborato de sódio 20 mmol L^{-1} e metanol 10%, pH 9,3. Capilar de sílica fundida com revestimento externo de poliimida, dimensões: $40 \text{ cm L}_{\text{det}}$, $48,5 \text{ cm L}_{\text{tot}}$; $50 \text{ } \mu\text{m D}$. I. Tensão aplicada 30 kV. Injeção por pressão 50 mbar durante 5 s. Temperatura do capilar 25°C . Detecção direta em 390 nm.

4.3. EFEITO DA *Croton antispyhiliticus* Mart. SOBRE A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS E EXSUDAÇÃO.

Na inflamação induzida pela Cg, o EBH (100 e 200 mg/kg) extraído das partes aéreas da *Croton antispyhiliticus* Mart. reduziu significativamente a migração dos leucócitos (100 mg/kg: $57,6 \pm 2,8\%$ e 200 mg/kg: $49,6 \pm 3,8\%$) ($P < 0,01$) (**Fig. 12A**), sendo esta diminuição principalmente as custas de neutrófilos (100 mg/kg: $61,4 \pm 3,4\%$ e 200 mg/kg: $55,6 \pm 2,7\%$) ($P < 0,01$) (**Fig. 12B**). A concentração do exsudato pleural foi reduzida significativamente em doses que variam entre 50 – 200 mg/kg (50 mg/kg: $42,3 \pm 6,6\%$; 100 mg/kg: $37,8 \pm 3,5\%$ e 200 mg/kg: $40,4 \pm 2,4\%$) ($P < 0,01$) (**Fig. 12C**).

A fração Hex, somente na dose de 50 mg/kg, foi capaz de inibir o influxo de leucócitos para o sítio inflamatório ($28,5 \pm 6,8\%$) ($P < 0,01$) (**Fig. 13A**), sendo essa inibição as custas de neutrófilos ($27,3 \pm 7,5\%$) ($P < 0,01$) (**Fig. 13B**). A exsudação foi reduzida na mesma dose estudada ($26,4 \pm 5,0\%$) ($P < 0,01$) (**Fig. 13C**).

Do mesmo modo, a fração AcOEt, somente na dose de 50 mg/kg, reduziu a migração de leucócitos ($33,2 \pm 6,3\%$) ($P < 0,01$) (**Fig. 14A**) e de neutrófilos ($38,1 \pm 7,2\%$) ($P < 0,01$) (**Fig. 14B**). A exsudação foi inibida nas mesmas condições experimentais ($22,8 \pm 5,7\%$) ($P < 0,05$) (**Fig. 14C**).

A fração Aq (25 e 50 mg/kg) inibiu de forma significativa a migração de leucócitos (25 mg/kg: $55,7 \pm 3,8\%$ e 50 mg/kg: $58,6 \pm 3,8\%$) ($P < 0,01$) (**Fig. 15A**) e de neutrófilos (25 mg/kg: $60,0 \pm 3,1\%$ e 50 mg/kg: $63,3 \pm 3,0\%$) ($P < 0,01$) (**Fig. 15B**). A exsudação foi diminuída significativamente em todas as doses testadas (10 – 50 mg/kg) (10 mg/kg: $19,5 \pm 5,0\%$; 25 mg/kg: $44,1 \pm 6,4\%$ e 50 mg/kg: $54,6 \pm 4,5\%$) ($P < 0,01$) (**Fig. 15C**).

A VT (10 e 25 mg/kg) inibiu a migração de leucócitos (10 mg/kg: $35,8 \pm 7,2\%$ e 25 mg/kg: $29,8 \pm 5,4\%$) ($P < 0,01$) (**Fig. 16A**) e de neutrófilos (10 mg/kg: $34,5 \pm 7,9\%$ e 25 mg/kg: $29,3 \pm 5,0\%$) ($P < 0,01$) (**Fig. 16B**) bem como a concentração de exsudato (10 mg/kg: $22,9 \pm 8,5\%$ e 25 mg/kg: $22,0 \pm 8,4\%$) ($P < 0,05$) (**Fig. 16C**).

Por fim, o AcQ, somente na dose de 25 mg/kg, foi capaz de reduzir a migração de leucócitos ($41,7 \pm 11,5\%$) ($P < 0,01$) (**Fig. 17A**) e de neutrófilos ($42,6 \pm 11,7\%$) ($P < 0,01$) (**Fig. 17B**).

Entretanto, a exsudação foi inibida em todas as doses estudadas (5 – 25 mg/kg) (5 mg/kg: $59,5 \pm 3,1\%$; 10 mg/kg: $65,2 \pm 3,2\%$ e 25 mg/kg: $61,3 \pm 6,5\%$) ($P < 0,01$) (**Fig. 17C**).

Os fármacos anti-inflamatórios de referência, dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) e indometacina (5 mg/kg, i.p.), inibiram todos os parâmetros inflamatórios analisados ($P < 0,01$) (**Fig. 12 – 17**).

Com base nos resultados obtidos na construção das curvas dose-resposta, foram selecionadas as melhores doses, ou seja a menor dose do material vegetal que inibiu os leucócitos e a exsudação para análise de outros parâmetros inflamatórios (MPO, ADA, NOx e citocinas). Logo, foram selecionadas as doses de: EBH (100 mg/kg), Hex (50 mg/kg), AcOEt (50 mg/kg), Aq (25 mg/kg), VT (10 mg/kg) e AcQ (25 mg/kg).

O tempo de tratamento prévio utilizado foi de 0,5 h com base em experimentos prévios e na literatura (KOELZER et al., 2009; POZZATTI et al., 2011).

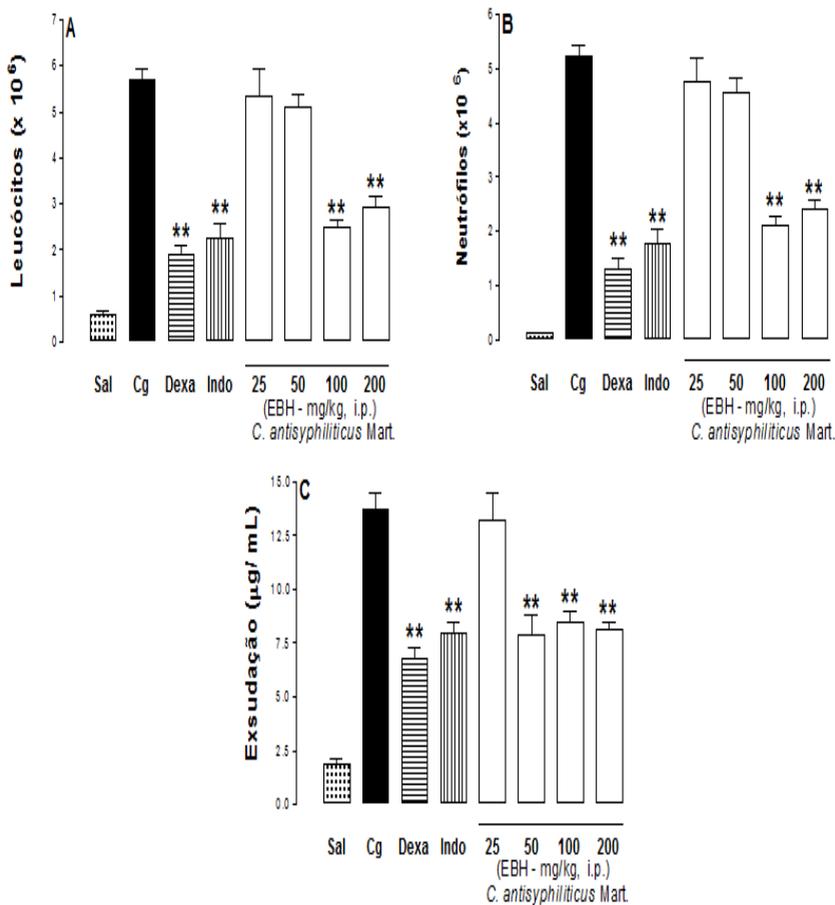


Figura 12 - Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH: 25 - 200 mg/kg) da *Croton antispyhiliticus* Mart (*C. antispyhiliticus* Mart), administrado por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%), no modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Efeito do EBH sobre a concentração de: A) Leucócitos, B) Neutrófilos, C) Exsudação. Sal = animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%), Cg = animais tratados somente com carragenina (Cg 1%), Dexa = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da Cg, Indo = animais tratados com Indometacina (5 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da Cg. As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas, teste ANOVA, $n = 6$ animais. ** $P < 0,01$.

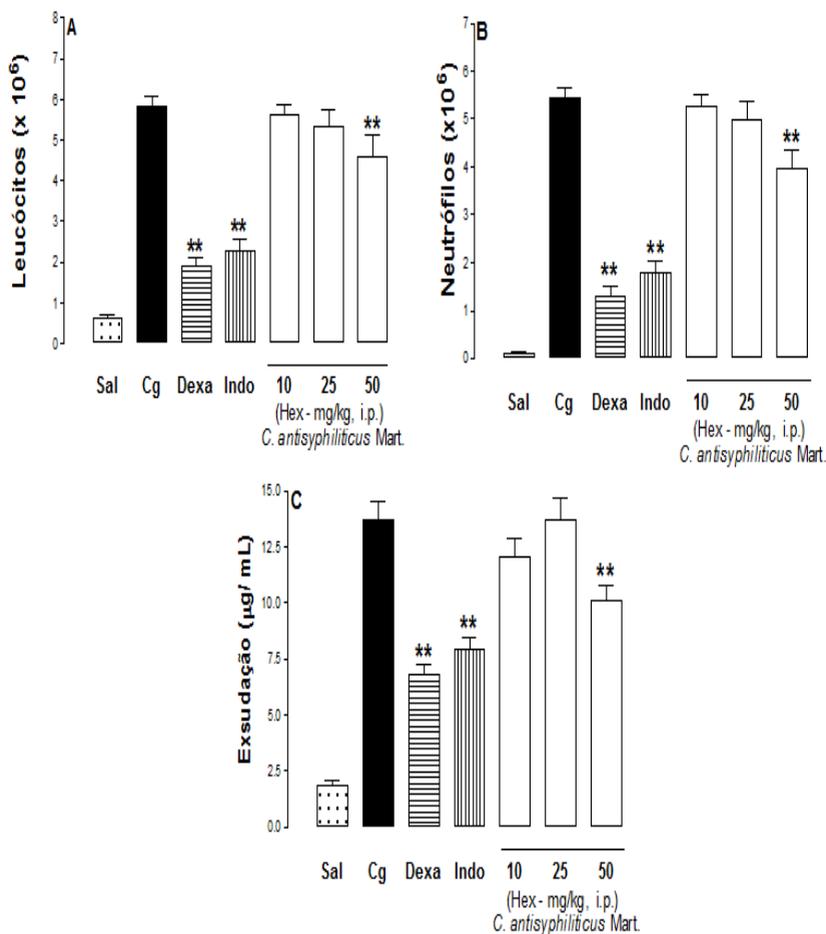


Figura 13 - Efeito da fração hexano (Hex: 10 - 50 mg/kg) da *Croton antisyphiliticus* (*C. antisyphiliticus* Mart), administrada por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%), no modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Efeito da fração Hex sobre a concentração de: A) Leuc3citos, B) Neutr3filos, C) Exsudação. Sal = animais tratados somente com solu3c3o salina est3ril (NaCl, 0,9%), Cg = animais tratados somente com carragenina (Cg 1%), Dexa = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da Cg, Indo = animais tratados com Indometacina (5 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da Cg. As colunas verticais representam a m3dia \pm d.p e os asteriscos as diferen3as estat3sticas, teste ANOVA, n = 6 animais. ** $P < 0,01$.

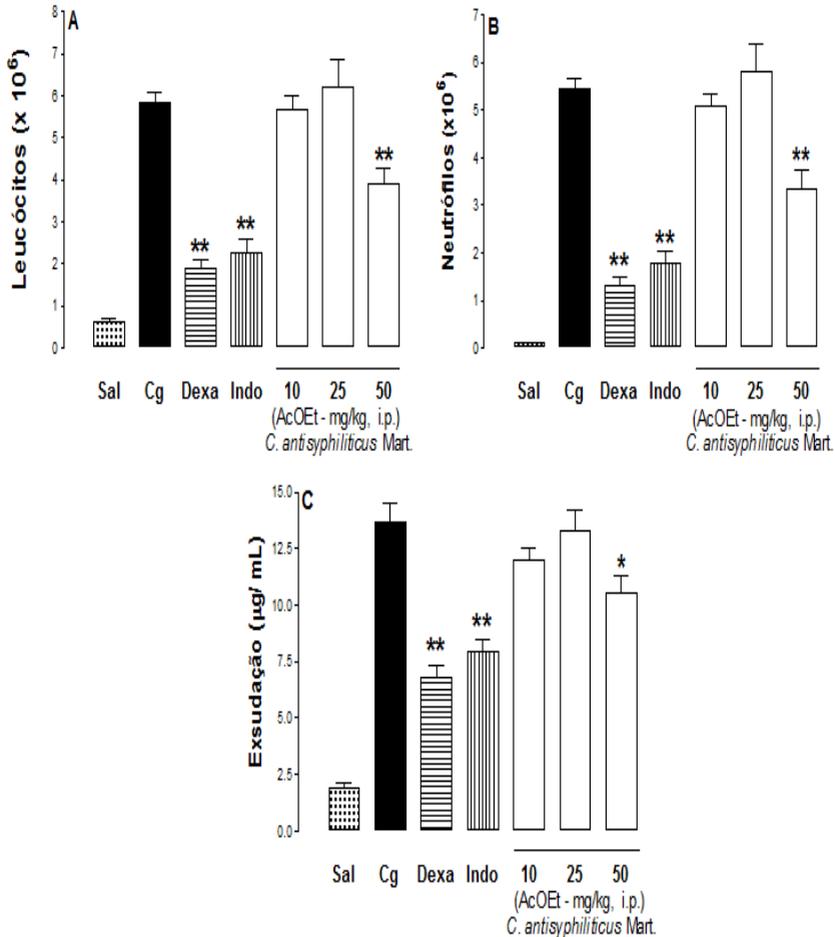


Figura 14 - Efeito da fração acetato de etila (AcOEt: 10 - 50 mg/kg) da *Croton antispyhiliticus* (*C. antispyhiliticus* Mart), administrado por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%), no modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Efeito da fração AcOEt sobre a concentração de: A) Leucócitos, B) Neutrófilos, C) Exsudação. Sal = animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%), Cg = animais tratados somente com carragenina (Cg 1%), Dexa = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da Cg, Indo = animais tratados com Indometacina (5 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da Cg. As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas, teste ANOVA, $n = 6$ animais. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

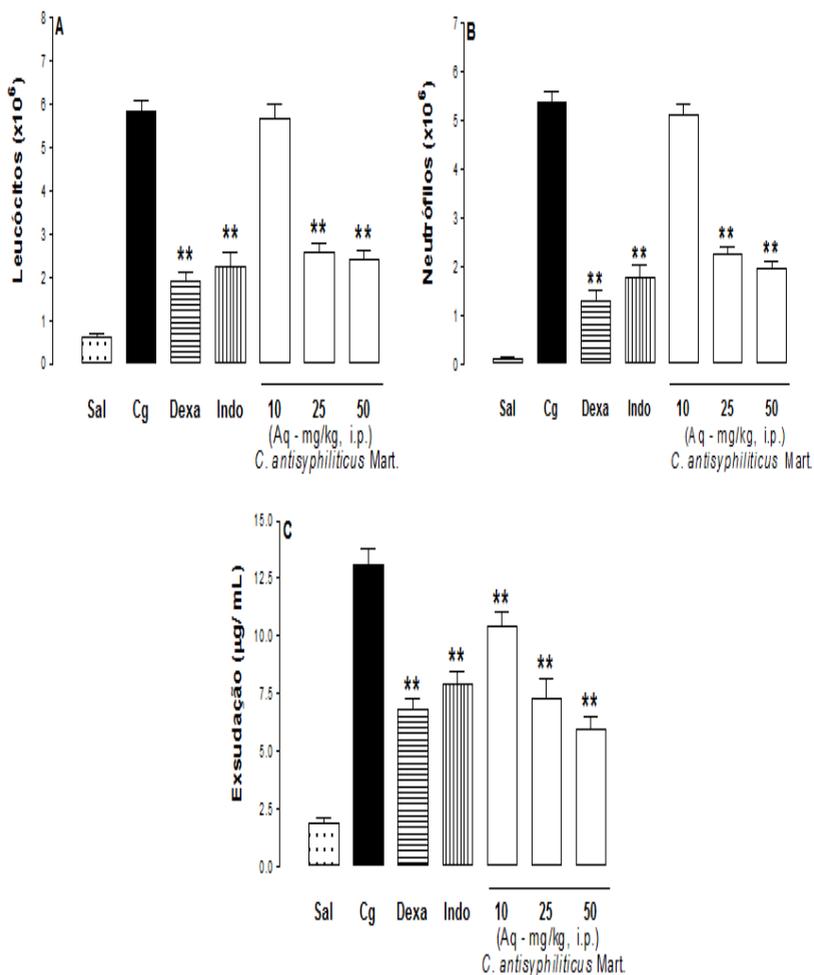


Figura 15 - Efeito da fração aquosa (Aq: 10 - 50 mg/kg) da *Croton antisiphiliticus* (*C. antisiphiliticus* Mart), administrado por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%), no modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Efeito da fração Aq sobre a concentração de: A) Leucócitos, B) Neutrófilos, C) Exsudação. Sal = animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%), Cg = animais tratados somente com carragenina (Cg 1%), Dexa = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da Cg, Indo = animais tratados com Indometacina (5 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da Cg. As colunas verticais representam a média \pm d.p e os asteriscos as diferenças estatísticas, teste ANOVA, n = 6 animais. ** $P < 0,01$.

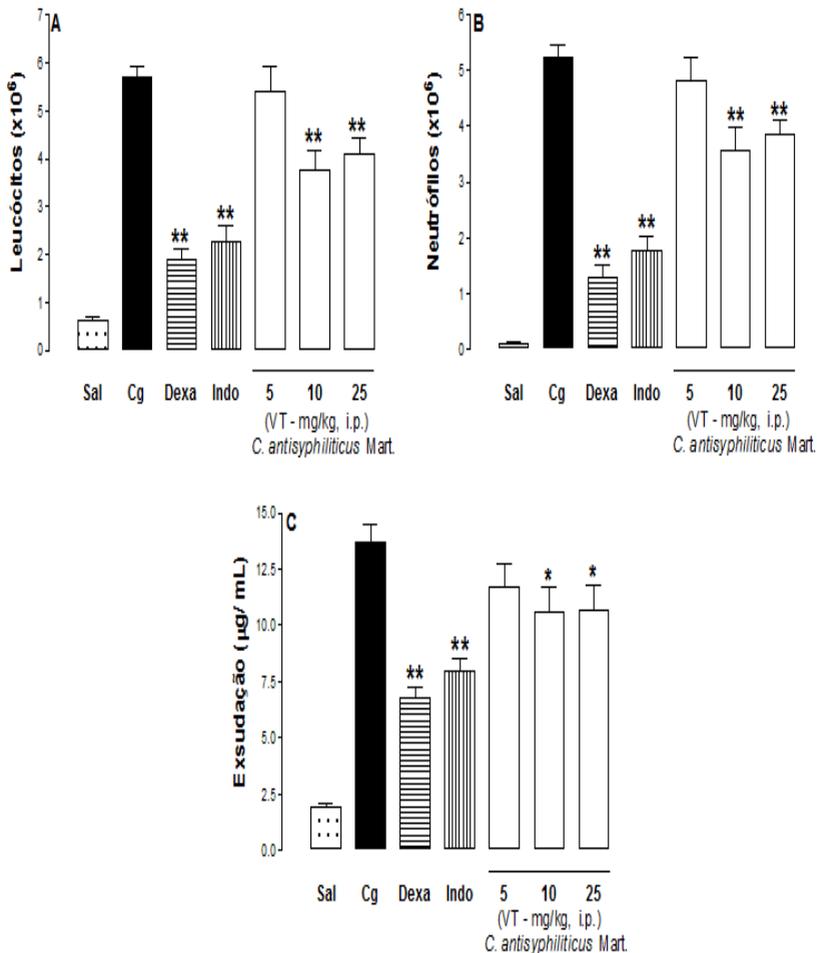


Figura 16 - Efeito da vitexina (VT: 5 - 25 mg/kg) da *Croton antisyphiliticus* (*C. antisyphiliticus* Mart), administrado por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%), no modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Efeito da VT sobre a concentração de: A) Leucócitos, B) Neutrófilos, C) Exsudação. Sal = animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%), Cg = animais tratados somente com carragenina (Cg 1%), Dexa = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da Cg, Indo = animais tratados com Indometacina (5 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da Cg. As colunas verticais representam a média \pm d.p e os asteriscos as diferenças estatísticas, teste ANOVA, n = 6 animais. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

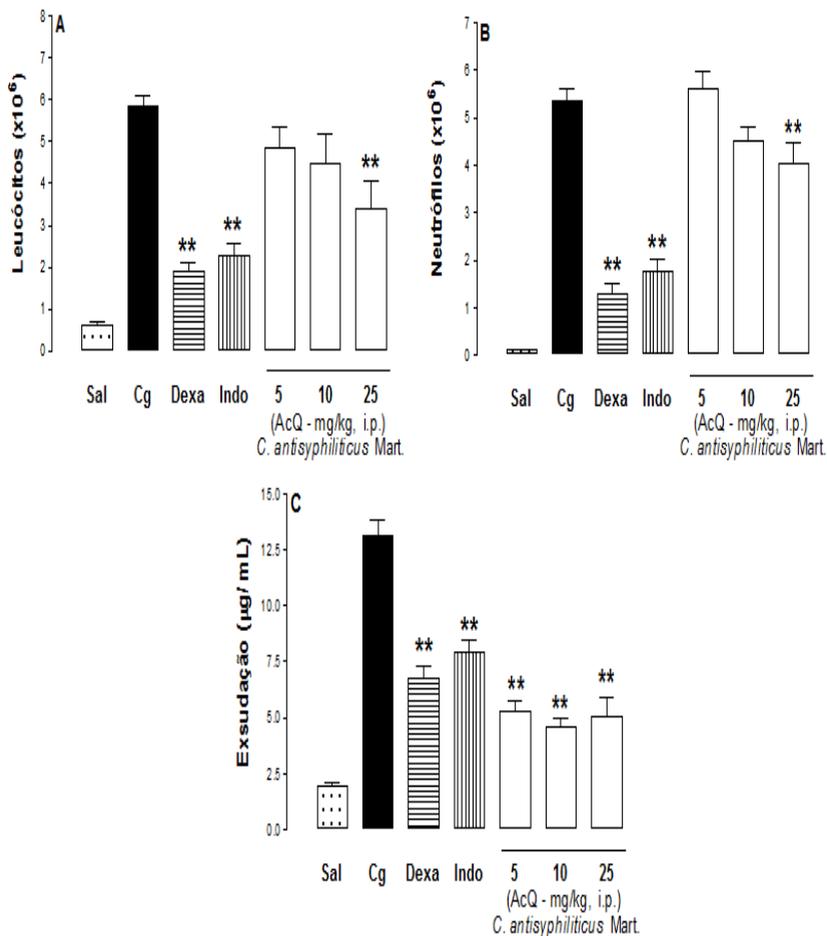


Figura 17 - Efeito do ácido quínico (AcQ: 5 - 25 mg/kg) da *Croton antisyphiliticus* (*C. antisyphiliticus* Mart), administrado por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%), no modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Efeito do AcQ sobre a concentração de: A) Leucócitos, B) Neutrófilos, C) Exsudação. Sal = animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%), Cg = animais tratados somente com carragenina (Cg 1%), Dexa = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da Cg, Indo = animais tratados com Indometacina (5 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da Cg. As colunas verticais representam a média \pm d.p e os asteriscos as diferenças estatísticas, teste ANOVA, n = 6 animais. ** $P < 0,01$.

4.4. EFEITO DA *Croton antispyhiliticus* Mart. SOBRE A ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE

O tratamento prévio dos animais com EBH (100 mg/kg) e suas frações: Hex (50 mg/kg), AcOEt (50 g/kg) e Aq (25 mg/kg), bem como os compostos isolados: VT (10 mg/kg) e AcQ (25 mg/kg) reduziram a atividade da MPO (% de inibição: EBH: $57,6 \pm 5,1\%$; Hex: $39,2 \pm 10,0\%$; AcOEt: $56,3 \pm 4,0\%$; Aq: $45,8 \pm 6,5\%$; VT: $66,8 \pm 3,0\%$ e AcQ: $26,9 \pm 6,6\%$) ($P < 0,05$) (Fig. 18). Os fármacos de referência, dexametasona e indometacina, também reduziram a atividade da MPO ($P < 0,01$) (Fig. 18).

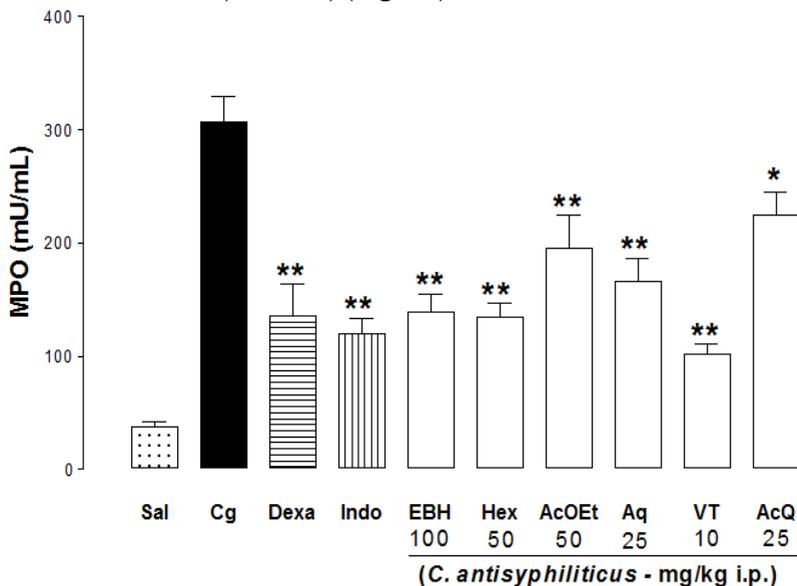


Figura 18 - Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH: 100 mg/kg), fração hexano (Hex: 50 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 25 mg/kg), vitexina (VT:10 mg/kg) e ácido quínico (AcQ: 25 mg/kg) obtidos das partes aéreas da *Croton antispyhiliticus* (C. antispyhiliticus Mart), administrados 0,5 h antes da indução da inflamação com carragenina (Cg, 1%) sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Sal = animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%), Cg = animais tratados somente com carragenina (Cg 1%), Dexa = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da Cg, Indo = animais tratados com Indometacina (5 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da Cg. As colunas verticais representam a média \pm d.p e os asteriscos as diferenças estatísticas, teste ANOVA, n = 6 animais. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

4.5. EFEITO DA *Croton antispyhiliticus* Mart. SOBRE A ATIVIDADE DA ADENOSINA-DEAMINASE

A administração de EBH (100 mg/kg), bem como as suas frações: Hex (50 mg/kg), AcOEt (50 g/kg) e Aq (25 mg/kg), além dos compostos isolados: VT (10 mg/kg) e AcQ (25 mg/kg) reduziu a atividade da ADA (% de inibição: EBH: $50,7 \pm 8,7\%$; Hex: $35,8 \pm 11,4\%$; AcOEt: $47,9 \pm 11,5\%$; Aq: $40,1 \pm 11,5\%$; VT: $67,2 \pm 10,0\%$ e AcQ: $77,8 \pm 6,6\%$) ($P < 0,01$) (Fig. 19). Do mesmo modo, os fármacos de referência, dexametasona e indometacina, reduziram a concentração desse parâmetro inflamatório ($P < 0,01$) (Fig. 19).

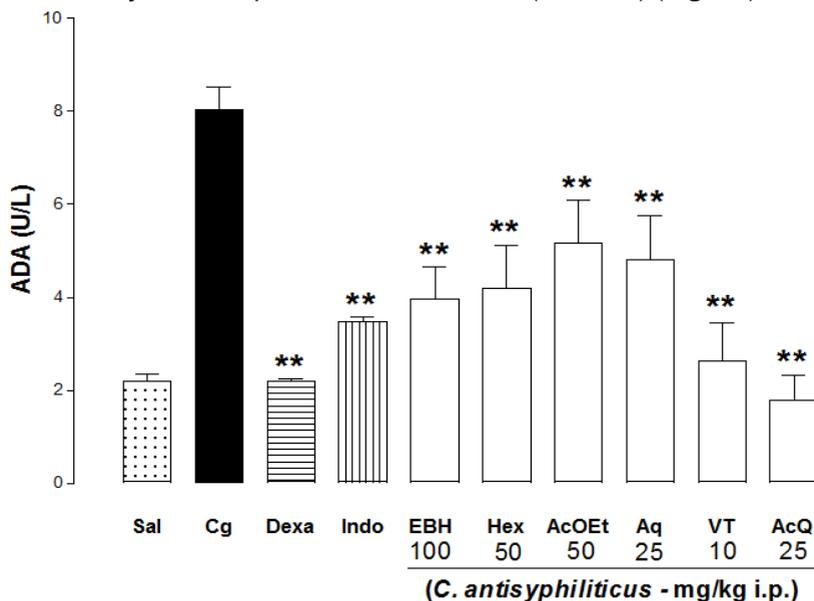


Figura 19 - Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH: 100 mg/kg), fração hexano (Hex: 50 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 25 mg/kg), vitexina (VT: 10 mg/kg) e ácido quínico (AcQ: 25 mg/kg) obtidos das partes aéreas da *Croton antispyhiliticus* (*C. antispyhiliticus* Mart), administrados 0,5 h antes da indução da inflamação com carragenina (Cg, 1%) sobre a atividade da enzima adenosina-deaminase (ADA). Sal = animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0.9%), Cg = animais tratados somente com carragenina (Cg 1%), Dexa = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da Cg, Indo = animais tratados com Indometacina (5 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da Cg . As colunas verticais representam a média \pm d.p e os asteriscos as diferenças estatísticas, teste ANOVA, n = 6 animais. ** $P < 0,01$.

4.6. EFEITO DA *Croton antispyhiliticus* Mart. SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE NITRITO/NITRATO

O tratamento dos animais com EBH (100 mg/kg), as suas frações: Hex (50 mg/kg), AcOEt (50 g/kg) e Aq (25 mg/kg), e os compostos isolados: VT (10 mg/kg) e AcQ (25 mg/kg) diminuíram a concentração de NOx (% de inibição: EBH: $59,4 \pm 5,5\%$; Hex: $67,5 \pm 8,0\%$; AcOEt: $65,8 \pm 7,4\%$; Aq: $52,4 \pm 4,5\%$; VT: $50,7 \pm 7,7\%$ e AcQ: $44,8 \pm 13,3\%$) ($P < 0,01$) (Fig. 20). Os fármacos de referência, dexametasona e indometacina, diminuíram de forma significativa a concentração de NOx ($P < 0,01$) (Fig. 20).

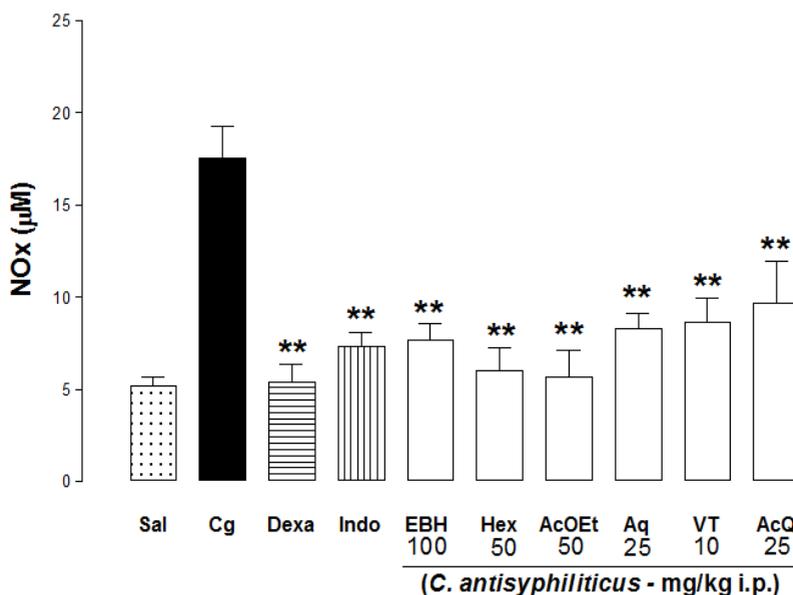


Figura 20 - Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH: 100 mg/kg), fração hexano (Hex: 50 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 25 mg/kg), vitexina (VT: 10 mg/kg) e ácido quínico (AcQ: 25 mg/kg) obtidos das partes aéreas da *Croton antispyhiliticus* (*C. antispyhiliticus* Mart), administrados 0,5 h antes da indução da inflamação com carragenina (Cg, 1%) sobre a concentração dos metabólitos de óxido nítrico (NOx). Sal = animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%), Cg = animais tratados somente com carragenina (Cg 1%), Dexa = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da Cg, Indo = animais tratados com Indometacina (5 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da Cg. As colunas verticais representam a média \pm d.p e os asteriscos as diferenças estatísticas, teste ANOVA, n = 6 animais. ** $P < 0,01$.

4.7. EFEITO DA *Croton antisiphiliticus* Mart. SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL-ALFA

O animais inflamados com Cg e tratados com o EBH (100 mg/kg), suas frações: Hex (50 mg/kg), AcOEt (50 g/kg) e Aq (25 mg/kg), e o flavonoide: a VT (10 mg/kg) diminuíram a concentração de TNF- α (% de inibição: EBH: 75,4 \pm 5,4%; Hex: 39,2 \pm 21,2%; AcOEt: 72,8 \pm 12,8%; Aq: 55,6 \pm 14,8%; VT: 67,0 \pm 13,9%) ($P < 0,05$) (**Fig. 21**). Entretanto, o AcQ não foi capaz de reduzir a concentração dessa citocina ($P > 0,05$) (**Fig. 21**). Dexametasona e indometacina, utilizadas como fármacos anti-inflamatórios de referência, reduziram a concentração de TNF- α de forma significativa ($P < 0,01$) (**Fig. 21**).

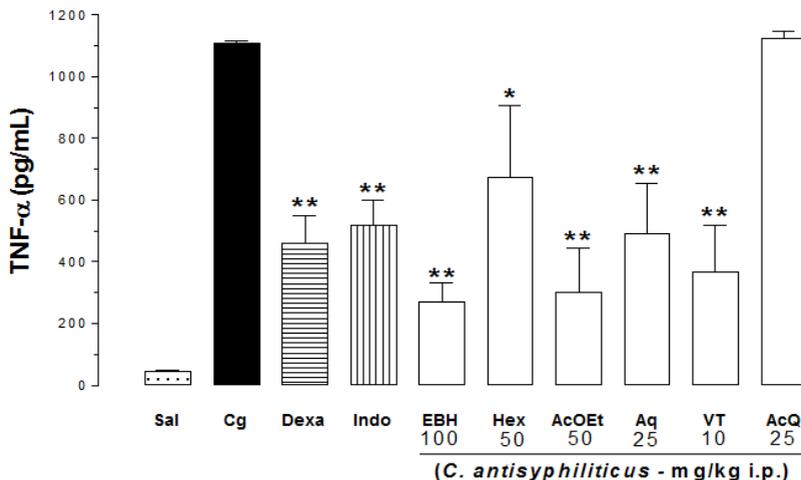


Figura 21 - Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH: 100 mg/kg), fração hexano (Hex: 50 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 25 mg/kg), vitexina (VT: 10 mg/kg) e ácido quínico (AcQ: 25 mg/kg) obtidos das partes aéreas da *Croton antisiphiliticus* (*C. antisiphiliticus* Mart), administrados 0,5 h antes da indução da inflamação com carragenina (Cg, 1%) sobre a concentração do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). Sal = animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%), Cg = animais tratados somente com carragenina (Cg 1%), Dexa = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da Cg, Indo = animais tratados com Indometacina (5 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da Cg. As colunas verticais representam a média \pm d.p e os asteriscos as diferenças estatísticas, teste ANOVA, n = 6 animais. ** $P < 0,01$.

4.8. EFEITO DA *Croton antispyhiliticus* Mart. SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE INTERLEUCINA-17

Os animais tratados previamente com o EBH (100 mg/kg), suas frações: Hex (50 mg/kg), AcOEt (50 g/kg) e Aq (25 mg/kg), bem como os compostos isolados: VT (10 mg/kg) diminuíram a concentração da IL-17 (% de inibição: EBH: 86,4 ± 4,3%; Hex: 63,3 ± 2,5%; AcOEt: 80,7 ± 6,2%; Aq: 80,26 ± 7,0% e VT: 62,1 ± 10,2%) ($P < 0,01$) (Fig. 22). O AcQ não foi reduziu a concentração de IL-17 ($P > 0,05$) (Fig. 22). Os fármacos de referência, dexametasona e indometacina, reduziram significativamente a concentração de IL-17 no lavado pleural ($P < 0,01$) (Fig. 22).

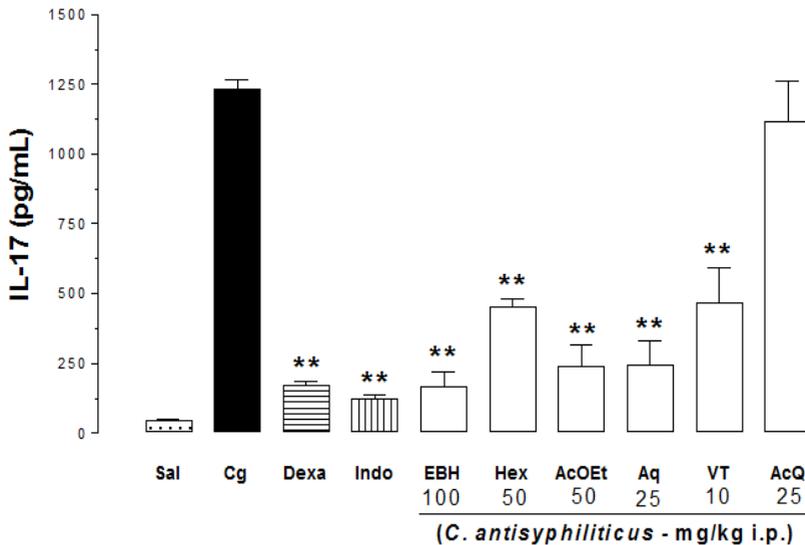


Figura 22 - Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH: 100 mg/kg), fração hexano (Hex: 50 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 25 mg/kg), vitexina (VT: 10 mg/kg) e ácido quínico (AcQ: 25 mg/kg) obtidos das partes aéreas da *Croton antispyhiliticus* (*C. antispyhiliticus* Mart), administrados 0,5 h antes da indução da inflamação com carragenina (Cg, 1%) sobre a concentração da interleucina-17 (IL-17). Sal = animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0.9%), Cg = animais tratados somente com carragenina (Cg 1%), Dexa = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da Cg, Indo = animais tratados com Indometacina (5 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da Cg. As colunas verticais representam a média ± d.p e os asteriscos as diferenças estatísticas, teste ANOVA, n = 6 animais. ** $P < 0,01$.

Tabela 1 - Correlações entre os parâmetros inflamatórios analisados no lavado pleural de animais inflamados e tratados previamente com o extrato bruto, frações e compostos isolados da *Croton antispyhiliticus*, no modelo de pleurisia, em camundongos.

Parâmetros inflamatórios	“R ² ”	“r ² ”	Valor de P
	Regressão Linear	Correlação de Pearson	
Leucócitos x Exsudação	0,6842	0,8272	P < 0.01
Leucócitos x MPO	0,9077	0,9527	P < 0.01
Leucócitos x ADA	0,8972	0,9472	P < 0.01
Leucócitos x NOx	0,8932	0,9451	P < 0.01
Leucócitos x TNF- α	0,9291	0,9639	P < 0.01
Leucócitos x IL-17	0,8677	0,9315	P < 0.01
Exsudação x MPO	0,8800	0,9381	P < 0.01
Exsudação x ADA	0,8349	0,9137	P < 0.01
Exsudação x NOx	0,8399	0,9165	P < 0.01
Exsudação x TNF- α	0,7828	0,8848	P < 0.01
Exsudação x IL-17	0,8339	0,9132	P < 0.01
MPO x ADA	0,9702	0,9850	P < 0.01
MPO x NOx	0,9724	0,9861	P < 0.01
MPO x TNF- α	0,9383	0,9687	P < 0.01
MPO x IL-17	0,9379	0,9684	P < 0.01
ADA x NOx	0,9841	0,9920	P < 0.01
ADA x TNF- α	0,8871	0,9418	P < 0.01
ADA x IL-17	0,9698	0,9848	P < 0.01
NOx x TNF- α	0,8522	0,9231	P < 0.01
NOx x IL-17	0,9420	0,9706	P < 0.01
IL-17 x TNF- α	0,8535	0,9238	P < 0.01

Os resultados representam os valores estatísticos obtidos por meio da análise de regressão linear (R) e correlação paramétrica de Pearson (r). **P < 0,01 representam a diferença estatística entre os parâmetros.

5. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou, pela primeira vez, o efeito anti-inflamatório do EBH, suas frações e os compostos isolados das partes aéreas da *Croton antisiphiliticus* Mart., utilizando experimentos *in vivo*. O modelo experimental utilizado, a pleurisia, é caracterizado pelo influxo de neutrófilos na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória deflagrada pelo agente flogístico, a Cg (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). No protocolo experimental utilizado, avaliou-se apenas a primeira fase da resposta inflamatória para o estudo da ação da planta, uma vez que nesta fase ocorre o recrutamento de neutrófilos na cavidade pleural de camundongos e este efeito mimetiza a resposta inflamatória desenvolvida na asma humana do tipo neutrofílica.

O EBH, frações e os compostos isolados, obtidos das partes aéreas da *Croton antisiphiliticus* Mart., inibiram de forma efetiva a migração leucocitária na cavidade pleural inflamada pela Cg. Entre todas as frações estudadas, a fração Aq demonstrou o melhor resultado em inibir esse parâmetro, haja vista que a dose efetiva desta fração (25 mg/kg) corresponde a metade das doses das demais frações estudadas, Hex (50 mg/kg) e AcOEt (50 mg/kg), e a um quarto da dose efetiva do EBH (100 mg/kg). O flavonóide obtido dessa fração. A VT, demonstrou resultados similares, em doses ainda menores (10 mg/kg) que esta fração. Além disso, é importante destacar que o material vegetal demonstrou ser tão eficaz na inibição do influxo de células inflamatórias quanto os fármacos de referência utilizados, a indometacina e a dexametasona.

A VT é um flavonoide conhecido por suas propriedades biológicas especialmente como compostos que apresenta ação antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptiva (DONG et al., 2011; GORZALCZANY et al., 2011). Os resultados apresentados nesse estudo demonstraram que a VT inibiu o influxo de neutrófilos para o sítio inflamatório, em uma dose 10 vezes menor que o EBH (100 mg/kg). Esse achado corrobora com investigações prévias a respeito do comportamento farmacológico da VT, os quais relataram efeitos como: capacidade de sequestro de EROs, ação anti-inflamatória e antinociceptiva (TANUS-RANGEL et al., 2010). Entretanto, há escassez de relatos na literatura relativos ao efeito da VT na inibição de leucócitos em modelos experimentais. Os resultados aqui demonstrados comprovam que este flavonoide também foi efetivo em inibir a migração de neutrófilos para a cavidade pleural de animais inflamada pela Cg.

A respeito da exsudação, tanto o EBH como as frações estudadas foram capazes em reduzir a concentração de exsudato na cavidade pleural inflamada pela Cg. Os resultados alcançados com o material vegetal foram similares aos resultados obtidos com o tratamento com os fármacos de referência, a dexametasona e indometacina. Mais uma vez, a fração Aq demonstrou ser mais efetiva que as demais frações em diminuir o extravasamento vascular, uma vez que ela foi efetiva em doses inferiores (10 e 25 mg/kg) quando comparada com as demais frações estudadas, Hex (50 mg/kg) e AcOEt (50 mg/kg), bem como em relação ao EBH (50 mg/kg). O efeito antiedematogênico promovido pela fração Aq pode estar relacionado com a ação dos compostos isolados. O AcQ, dentre os compostos isolados estudados, apresentou o melhor resultado em inibir esse parâmetro, tendo em vista que uma dose baixa (5 mg/kg) diminuiu a exsudação, se comparado com as doses da VT (10 e 25 mg/kg).

Para correlacionar a migração leucocitária com a atividade celular e exsudação, foram analisadas as atividades das enzimas MPO e ADA, as quais estão associadas à ativação de neutrófilos e mononucleares, respectivamente (FRÖDE; MEDEIROS, 2001), e a concentração de NOx, uma vez que o NO é um importante mediador inflamatório envolvido no aumento da permeabilidade vascular e formação de edema (CUZZOCREA et al., 2000; POBER; SESSA, 2007).

Este estudo demonstrou que o EBH, suas frações e os compostos isolados foram capazes de reduzir a atividade das enzimas MPO e ADA, apresentando uma correlação positiva ($r^2 \approx 1,0$) (Tabela 1) para ambos os parâmetros, o que demonstra haver uma redução na presença de células ativadas na cavidade pleural inflamada, em função da diminuição da atividade dessas enzimas.

A MPO é uma enzima estocada nos grânulos primários de neutrófilos ativados (ARNHOLD; FLEMMIG, 2010) a análise da sua atividade é uma forma indireta de demonstrar a presença ou não dessas células na cavidade pleural.

A ADA é um marcador de leucócitos mononucleares ativados (FRÖDE; MEDEIROS, 2001). Entretanto, nenhum dos produtos vegetais obtidos da *Croton antisiphiliticus* Mart. foi capaz de inibir o influxo dessas células na cavidade pleural inflamada pela Cg. Por outro lado, Kalvegren e colaboradores (2010) demonstraram haver uma relação entre o aumento da atividade da ADA e a ativação de neutrófilos no processo inflamatório, haja vista que essa enzima causa a depleção do seu substrato, a adenosina, cuja baixa concentração propicia a sua ligação com receptores pró-

inflamatórios (A₁R e A₃R) expressos na superfície dos neutrófilos, possibilitando a migração dessas células do compartimento vascular para o sítio inflamatório. Esses achados suportam os resultados obtidos nesse estudo, o qual demonstrou que a planta estudada foi efetiva em inibir a atividade da ADA, juntamente com diminuição do influxo de neutrófilos para a cavidade pleural inflamada pela Cg.

Ademais, foi observada a diminuição na concentração de NO_x, no lavado pleural nos diferentes grupos de animais tratados com o material vegetal e este resultado pode estar relacionado com a diminuição do extravasamento vascular na cavidade pleural. O EBH, as frações e os compostos isolados diminuíram a concentração de NO_x, o que indica indiretamente uma menor síntese de NO. Neste experimento observou-se uma correlação positiva entre a diminuição da exsudação e da concentração de NO_x ($r^2 \approx 1,0$) (Tabela 1), nos animais tratados com os produtos obtidos da *Croton antispyhiliticus*. Essa evidência é corroborada com estudos anteriores que demonstram que neste modelo experimental utilizado existe uma expressão de iNOS importante, no tecido pulmonar dos animais inflamados, e que a deleção gênica que impede a síntese dessa enzima, e conseqüentemente reduz a produção NO promove uma redução na exsudação na cavidade inflamada pela Cg (CUZZOCREA et al., 1998; CUZZOCREA et al., 2000).

Na inflamação, uma variedade de células é responsável pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-17 (YAMAGATA; ICHINOSE, 2006). O TNF- α representa uma das mais importantes citocinas envolvidas na patogênese de doenças de caráter inflamatório, como a asma, psoríase e a artrite reumatoide (BERRY et al., 2007; MEDZHITOV; HORNG, 2009). O mecanismo de ação desta citocina está relacionado principalmente com a ativação do NF- κ B, sendo este fator de transcrição uma peça chave na expressão de genes responsáveis pela síntese de mediadores pró-inflamatórios que controlam a inflamação (MEDZHITOV; HORNG, 2009). Ademais, os macrófagos ativados no tecido inflamado são fontes importantes de TNF- α , o que por sua vez promove o aumento do recrutamento de neutrófilos no sítio inflamatório e aumenta a sobrevivência dessas células, amplificando e perpetuando a resposta inflamatória (SHI; PAMER, 2011).

Nos resultados descritos neste trabalho, foi possível evidenciar que o tratamento com o EBH, as frações e a VT, foram efetivos em inibir a liberação de TNF- α de forma similar aos fármacos utilizados como referência. Sugere-se que essa redução na concentração de TNF- α , obtida principalmente pelo tratamento

com o composto polifenólico, seja de vital importância na progressão da resposta inflamatória desencadeada pela Cg, visto que esse agente flogístico também possui a capacidade de ativar a via do NF- κ B (BHATTACHARYYA et al., 2010; BORTHAKUR et al., 2012). Os resultados aqui apresentados estão de acordo com relatos da literatura que confirmam o efeito da VT em inibir a liberação de TNF- α , na resposta inflamatória aguda, no modelo experimental de isquemia/reperfusão (DONG et al., 2011).

A IL-17 é a citocina mais investigada entre os membros da família IL-17. As principais funções dessa citocina estão vinculadas à ativação celular, especialmente de neutrófilos, que produz grandes quantidades de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (PARK; LEE, 2010; REYNOLDS; ANGKASEKWINAI; DONG, 2010). Na pleurisia induzida pela Cg, as células do pulmão expressam o gene da IL-17, e existe uma alta concentração dessa citocina no lavado pleural dos animais inflamados por esse agente flogístico (DALMARCO; CÓRDOVA; FRÖDE, 2011). Nos resultados aqui demonstrados, o EBH, suas frações e a VT foram capazes de reduzir a concentração de IL-17 no sítio inflamatório.

Além disso, estudos têm demonstrado a interação sinérgica entre TNF- α e IL-17 na promoção da inflamação, principalmente no que diz respeito ao recrutamento de neutrófilos e a ativação de células endoteliais (ONISHI; GAFFEN, 2010; LIU et al., 2011; GRIFFIN et al., 2012). Os produtos vegetais obtidos da *Croton antispyhiliticus* (EBH, frações e o flavonoide), demonstram ser efetivos em inibir ambas citocinas, da mesma forma que os anti-inflamatórios de referência, a dexametasona e indometacina.

6. CONCLUSÃO

Este estudo é pioneiro na análise do efeito anti-inflamatório *in vivo* da espécie *Croton antisiphiliticus* Mart. Os resultados apresentados aqui demonstram que os distintos compostos presentes no EBH e nas frações da *Croton antisiphiliticus* Mart. possuem atividade anti-inflamatória. O efeito anti-inflamatório da planta parece estar relacionado principalmente com a inibição do influxo de neutrófilos ativados para o sítio inflamatório, o que foi evidenciado experimentalmente pela redução da atividade de enzimas relacionadas à atividade neutrofílica (MPO e ADA). Também foi observado que a planta possui a capacidade de reduzir o extravasamento de proteínas plasmáticas para o local da inflamação, sendo esse efeito associado a uma menor liberação de substâncias vasoativas como NO. Ainda é importante destacar que a planta foi efetiva em inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-17, envolvidas sinergicamente na ativação e na quimiotaxia de células inflamatórias.

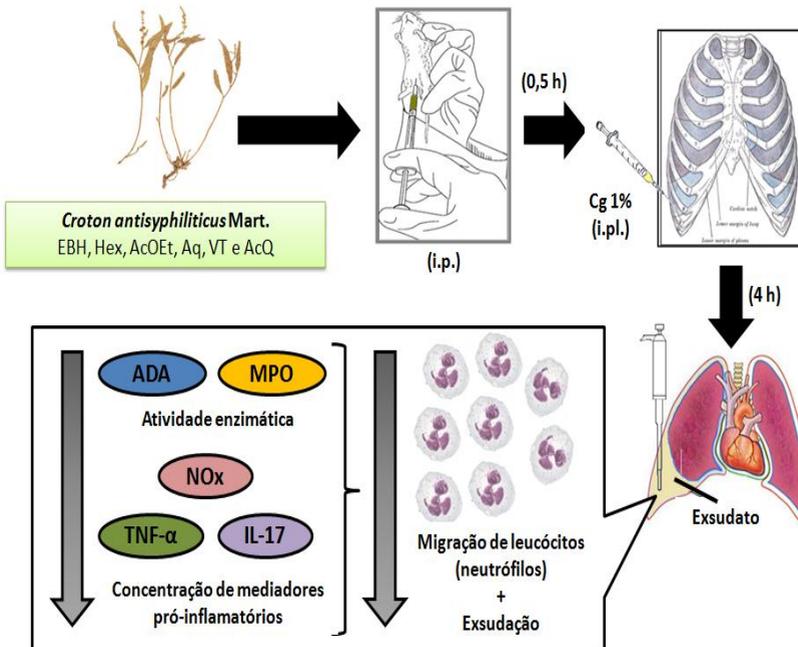


Figura 23. Proposta do efeito anti-inflamatório da *Croton antisiphiliticus* Mart.

REFERÊNCIAS

- AGHAEI, M.; KARAMI-TEHRANI, F.; SALAMI, S.; ATRI, M. Diagnostic value of adenosine deaminase activity in benign and malignant breast tumors. *Archives of Medical Research*, v. 41, p. 14 – 18, 2010.
- ALCORN, J. F.; CROWE, C. R.; KOLLS, J. K. Th17 cells in asthma and COPD. *Annual Review of Physiology*, v. 72, p. 495 – 516, 2010.
- AMADO, N. G.; FONSECA, B. F.; CERQUEIRA, D. M.; NETO, V. M.; ABREU, J. G. Flavonoids: Potencial Wnt/beta-catenin signaling modulators in cancer. *Life Sciences*, v. 89, p. 545-554, 2011.
- AMORIM, P. K.; BATALHA, M. A. Soil-vegetation relationships in hyperseasonal cerrado, seasonal cerrado, and wet grassland in Emas National Park (central Brazil). *Acta oecologica*, v.32, p.319–327, 2007.
- ARNHOLD, J.; FLEMMIG, J. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 500, p. 92-106, 2010.
- BACCELLI, C.; BLOCKS, S.; VAN HOLLE, B.; SCHANCK, A.; CHAPON, D.; TINANT, B.; MEERVELT, L.V.; MOREL, L.V.; MOREL, N.; QUENTIN – LECLERCQ, J. Diterpenes isolated from *Croton zambesicus* inhibit KCL-induced contraction. *Planta Medica*, v. 71, p. 1036 – 1039, 2005.
- BERRY, M.; BRIGHTLING, C.; PAVORD, I.; WARDLAW, A. J. TNF- α in asthma. *Current Opinion in Pharmacology*, v.7, p. 279 – 282, 2007.
- BERRY, P.E.; HIOO, A. L.; WUEDACK, K. J.; EE, B. V.; RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and *Crotoneae* (Euphorbiaceae sensu strict) using ITS and *trnL-trnF* DNA sequence data. *American Journal of Botany*, v. 92, p. 1520 – 1534, 2005.
- BHATTACHARYYA, S.; LIU, H.; ZHANG, Z.; JAM, M.; DUDEJA, P. K.; MICHEL, G.; LINHARDT, R. J.; TOBACMAN, J. K. Carrageenan-induced innate immune response is modified by enzymes that hydrolyze distinct galactosidic bonds. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 10, p. 906 – 913, 2010.

BLOCK, S.; BACCELLI, C.; TINANT, B.; VAN MEERVELT, L.; ROZENBERG, R.; JIWAN, J. L. H.; LLABRÉS, G.; DE PAUW-GILLET, M. C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. *Phytochemistry*, v. 65, p. 1165 – 1171, 2004.

BOLDIZSAR, F.; TALABER, G.; SZABO, M.; BARTIS, D.; PALINSKAS, L.; NEMETH, P.; BERKI, T. Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signaling in T cells. *Immunobiology*, v. 215, p. 521 – 527, 2010.

BORTHAKUR, A.; BHATTACHARYYA, S.; ANBAZHAGAN, A. N.; KUMAR, A.; DUDEJA, P.K.; TOBACMAN, J.K. Prolongation of carrageenan-induced inflammation in human colonic epithelial cells by activation of an NF- κ B-BCL10 loop. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1822, p. 1300 – 1307, 2012.

BRAGA, F. C.; WAGNER, H.; LOMBARDI, J. A.; OLIVEIRA, A. B. Screening Brazilian plant species for in vitro inhibition of 5-lipoxygenase. *Phytomedicine*, v. 6, p. 447-452, 2000.

BRANDÃO, M. G. L.; PIGNAL, M.; ROMANIUC, S.; GRAEL, C. F. F.; FAGG, G. W. Useful Brazilian plants listed in the Field books of the French naturalist Auguste de Saint-Hilaire (1779 – 1853). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 143, p. 488 – 500, 2012.

CHEN, D.; MILACIC, V.; CHEN, M. S.; WAN, S. B.; LAM, W. H.; HUO, C.; LANDIS-PIWOWAR, K. R.; CUI, Q. C.; WALI, A.; CHAN, T. H.; DOU, Q. P. Tea polyphenols, their biological effects and potential molecular targets. *Histology and histopathology*, v. 23, p. 487 – 496, 2008.

COTTREAU, J.; TUCKER, A.; CRUTCHLEY, R.; GAREY, K. W. Crofelemer for the treatment of secretory diarrhea. *Expert Review of Gastroenterology & hepatology*, v. 6, p. 17 – 23, 2012.

CROFT, M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nature Reviews Immunology*, v. 9, p. 271 – 285, 2009.

CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; CALABRO, G.; DUGO, L.; SARRO, A.; VAN DE LOO, F. A. J.; CAPUTI, A. P. Inducible nitric oxide synthase – knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung

injury caused by carrageenan. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 162, p. 1859 – 1866, 2000.

CUZZOCREA, S.; ZINGARELLI, B.; HAKE, P.; SALZMAN, A. L.; SZABÓ, C. Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 24, p. 450 – 459, 1998.

DALBO, S.; MOREIRA, E. G.; BRANDÃO, F. C.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M. G.; MICKE, G. A.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Mechanisms underlying the vasorelaxant effect induced by proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* in rat small resistance arteries. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 106, p. 234 – 241, 2008.

DALMARCO, E. M.; CÓRDOVA, C. M. M.; FRÖDE, T. S. Evidence of an anti-inflammatory effect of mycophenolate mofetil in a murine model of pleurisy. *Experimental Lung Research*, v.00, p. 1 – 9, 2011.

DE BOSSCHER, K.; HAEGEMAN, G.; ELEWAUT, D. Targeting inflammation using selective glucocorticoid receptor modulators. *Current Opinion in Pharmacology*, v.10, p. 497 – 504, 2010.

DONG, L.; FAN, Y.; SHAO, X.; CHEN, Z. Vitexin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts by attenuating inflammatory response and apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*, v. 49, p. 3211 – 3216, 2011.

DORWARD, D.A.; LUCAS, C.D.; ROSSI, A.G.; HASLETT, C.; DHALIWAL, K. Imaging inflammation: Molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 135, p. 182 – 199, 2012.

FREDHOLM, B. B.; IJZERMAN, A. P.; JACOBSON, K. A.; KLOTZ, K.; LINDEN, J. International Union of Pharmacology XXV Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacological Reviews*, v. 53, p. 527-552, 2001.

FRÖDE, T. S.; MEDEIROS, Y. S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by

carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators of Inflammation*, v. 10, p. 223 – 227, 2001.

FUKUNAGA, J.; ABE, M.; MURAI, A.; AKITAKE, Y.; HOSOKAWA, M.; TAKAHASHI, M. Comparative study to elucidate the mechanism underlying the difference in airway hyperresponsiveness between two mouse strains. *International Immunopharmacology*, v. 7, p. 1852 – 1861, 2007.

GHOSH, S.; ERZURUM, S. C. Nitric oxide metabolism in asthma pathophysiology. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1810, p. 1008 – 1016, 2011.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: New opportunities for drug discovery. *Nature Review Drug Discovery*, v. 3, p. 401 – 416, 2004.

GIUSTI, G.; GALANTI, B. Adenosine deaminase: colorimetric method. In: BERGMAYER, H. U. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Verlag Chemie, 315-323, 1984.

GIVERTZ, M. M. Adenosine A1 receptor antagonists at a fork in the road. *Circulation Heart Failure*, v. 2, p. 519-522, 2009.

GORZALCZANY, S.; MARRASSINI, C.; MIÑO, J.; ACEVEDO, C.; FERRARO, G. Antinociceptive activity of ethanolic extract and isolated compounds of *Urtica circularis*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 134, p. 733 – 738, 2011.

GRAHAM, B. S.; PERKINS, M. D.; WRIGHT, P. F.; KARZON, D. T. Primary respiratory syncytial virus infection in mice. *Journal of Medical Virology*, v.26, p. 153 – 162, 1988.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v. 126, p. 131 – 138, 1982.

GRIFFIN, G. K.; NEWTON, G.; TARRIO, M. L.; BU, D. X.; MAGANTO-GARCIA, E.; AZCUTIA, V.; ALCAIDE, P.; GRABIE, N.; LUSCINSKAS, F. W.; CROCE, K. J.; LICHTMAN, A. H. IL-17 and TNF- α sustain neutrophil recruitment during inflammation through

synergistic effects on endothelial activation. *Journal of Immunology*, v. 188, p. 6287 – 6299, 2012.

HAEGENS, A.; HEERINGA, P.; VAN SUYLEN, R. J.; STEELE, C.; ARATANI, Y.; O'DONOGHUE, R. J. J.; MUTSAERS, S. E.; MOSSMAN, B. T.; WOUTERS, E. F. M.; VERNOOY, J. H. J. Myeloperoxidase deficiency attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation and subsequent cytokine and chemokine production. *Journal of Immunology*, v. 182, p. 7990 – 7996, 2009.

HAMER, M. The beneficial effects of tea on immune function and inflammation: a review of evidence from in vitro, animal, and human research. *Nutrition Research*, v. 27, p. 373-379, 2007.

HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B. N.; Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in Immunology*, v. 25, p. 33-39, 2004.

HIRSCHMANN, G. S.; ARIAS, A. R. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 29, p. 159-172, 1990.

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. *Clinical Rheumatology*, v. 20, p. 411 – 416, 2001.

HOU, C.; LIN, H.; CHANG, C.; HUANG, W.; LIN, M. Oxidative stress and pyrogenic fever pathogenesis. *European Journal of Pharmacology*, v. 667, p. 6 – 12, 2011.

ISSA, A. Y.; VOLTATE, S. R.; WARGOVICH, M. J. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, p. 405-419, 2006.

KÄLVEGREN, H.; FRIDFELDT, J.; BENGTSSON, T. The role of plasma adenosine deaminase in chemoattractant-stimulated oxygen radical production in neutrophils. *European Journal of Cell Biology*, v.89, p. 462-467, 2010.

KAMAL, A.M.; FLOWER, R.J.; PERRETI, M. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 39 – 47, 2005.

KINGHORN, A. D.; PAN, L. FLETCHER, J. N.; CHAI, H. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. *Journal of Natural Products*, v. 74, p. 1539 – 1555, 2011.

KINO, T.; SU, Y.A.; CHROUSOS, G.P.; Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 66, p. 3435 – 3448, 2009.

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

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

KVIETYS, P.; GRANGER, D.N. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 52, p. 556 – 592, 2012.

LAU, D.; MOLLNAU, H.; EISERICH, J. P.; FREEMAN, B. A.; DAIBER, A.; GEHLING, U. M.; BRÜMER, J.; RUDOLPH, V.; MÜNDEL, T.; HEITZER, T.; MEINRTZ, T.; BALDUS, S. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD 11b/CD18 integrins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, p. 431 – 436, 2005

LEE, Y.; HWANG, J.; KOH, H.; JANG, K. Y.; LEE, J. H.; PARK, J.; PARK, B. Sulfuretin, a major flavonoid isolated from *Rhus vernuciflua*, ameliorates experimental arthritis in mice. *Life Sciences*, v. 90, p. 799 – 807, 2012.

LIM, L.H.; PERVAIZ, S. Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB Journal*, v.21, p. 968 – 975, 2007.

LIU, Y.; MEI, J.; GONZALES, L.; YANG, G.; NING, D.; WANG, P.; ZHANG, P.; FAVARA, M. MALCOLM, K. C.; GUTTENTAG, S.; WORTHEN, G. S. IL-17A and TNF- α exert synergistic effects on

expression of CXCL5 by alveolar type II cells in vivo and in vitro. *The Journal of Immunology*, v. 186, p. 3197 – 3205, 2011.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; ARRUDA, A. C.; PAMPLONA, S. G.S.R.; VANDERLINDE, F. A.; LAPA, A. J.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N. F.; CÔLUS, I. M. S.; FARIAS, R. A. F.; COSTA, A. M. L.; RAO, V. S.N. Ethopharmacology, phytochemistry and phamacology: a successful combination in the study on *Croton cajucara*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 70, p. 41 – 55, 2000.

MACKAY, C. R. Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. *Nature Immunology*, v.9, p. 988 – 998, 2008.

MAK, J. C. W. Pathogenesis of COPD. Part II. Oxidative-antioxidative imbalance. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 12, p. 368 – 374, 2008.

MAOR, I.; RAINIS, T.; LANIR, A.; LAVY, A. Adenosine deaminase activity in patients with Crohn's disease: distinction between active and nonactive disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, v. 23, 598 – 602, 2011.

MEDZHITOV, R.; HORNG, T. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nature Review Immunology*, v.9, p. 692 – 703, 2009.

MEHTA, S. The effects of nitric oxide in acute lung injury. *Vascular Pharmacology*, v. 43, p. 390 – 403, 2005.

MILANOWSKI, D. J.; WINTER, R. E.; ELVIN-LEWIS, M .P.; LEWIS, W. H. Geographic distribution of three alkaloid chemotypes of *Croton lechleri*. *Journal of Natural Products*, v. 65, p. 814 – 819, 2002.

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

MIYAZAWA, M.; HISAMA, M. Antimutagenic activity of flavonoids from *Chrysanthemum morifolium*. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, v. 67, p. 2091-2099, 2003.

MONTESEIRÍN, J. Neutrophils and asthma. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, v. 19, p. 340 – 354, 2009.

MOREIRA, E. L.; RIAL, D.; AGUIAR, A.S.; FIGUEREDO, C. P.; SIQUEIRA, J. M.; SALBO, S.; HORST, H.; OLIVEIRA, J.; MANCINI, G.; SANTOS, T. S.; VILLARINHO, J. G.; PINHEIRO, F.V.; MARINONETO, J.; FERREIRA, J.; DE BEM, A. F.; LATINI, A.; PIZZOLATTI, M. G.; RIBEIRO-DO-VALE, R. M. PREDIGER, R.D. Proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* Bail confers neuroprotection in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine rat model of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, in press, 2010.

MORIKAWA, K.; NONAKA, M.; NARAHARA, M.; TORII, I.; KAWAGUCHI, K.; YOSHIKAWA, T.; KUMAZAWA, Y.; MORIKAWA, S. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life sciences*, v. 74, p. 709 – 721, 2003.

MORRISON, P.; NEVES, D. D. Evaluation of adenosine deaminase in the diagnosis of pleural tuberculosis: a Brazilian meta-analysis. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 34, p.217 – 224, 2008.

NARDI, G. M.; DALBO, S.; MONACHE, F. D.; PIZZOLATTI, M.G.; RIBEIRO-DO- VALLE, R.M. Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Bail (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 107, p. 73 – 78, 2006.

NARDI, G. M.; FELIPPI, R.; DALBO, S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. M.; ARRUDA, D. C.; DELLE MONACHE, F.; TIMBOLA, A. K.; PIZZOLATTI, M. G.; CKLESS, K.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. *Phytomedicine*, v. 10, p. 176 – 184, 2003.

NEWTON, K.; DIXIT, V.M. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 4, pii. a006049, 2012.

NG, L.; LAFONTAINE, P.; VANIER, M. Characterization of cigarette tobacco by direct electrospray ionization-ion trap mass spectrometry (ESI-ITMS) analysis of the aqueous extracts a novel and simple approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, p. 7251 – 7257, 2004.

OAKLEY, R.H.; CIDLOWSKI, J.A. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 286, p. 3177 – 3184, 2011.

ONISHI, R. M.; GAFFEN, S. L. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function and disease. *Immunology*, v. 129, p. 311 – 321, 2010.

PAPPU, R.; RAMIREZ-CARROZZI, V.; SAMBANDAM, A. The interleukin-17 cytokine family: critical players in host defence and inflammatory diseases. *Immunology*, v. 134, p. 8 – 16, 2011.

PARK, H.; LEE, C.; JUNG, I. D.; LEE, J. S.; JEONG, Y.; CHANG, J. H.; CHUN, S.; KIM, M.; CHOI, I.; AHN, S.; SHIN, Y. K.; YEOM, S. PARK, Y. Quercetin regulates Th1/Th2 balance in a murine model of asthma. *International Immunopharmacology*, v. 9, p. 261 – 267, 2009.

PARK, S. J.; LEE, Y. C. Interleukin-1 regulation: an attractive therapeutic approach for asthma. *Respiratory Research*, v. 11, p. 1 – 11, 2010.

PEREIRA, S.; CONTINI-TALEB, S.; COPPEDE, J.; PEREIRA, P.; BERTONI, B.; FRANÇA, S.; PEREIRA, A. M. An *ent*-Kaurane- Type diterpene in *Croton antisiphiliticus* Mart. *Molecules*, v. 17, p. 8851 – 8858, 2012.

PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nature Medicine*, v. 17, p. 1381 – 1390, 2011.

PIACENTE, S.; BELISARIO, M. A.; DEL CASTILLO, H.; PIZZA, C.; DE FEO, V. *Croton ruizianus*: platelet proaggregating activity of two new pregnane glycosides. *Journal of Natural Products*, v. 61, p. 318 – 322, 1998.

POBER, J.S.; SESSA, W.C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 7, p. 803 – 815, 2007.

POZZATTI, P.; REIS, G.O.; PEREIRA, D.F.; HELLER, M.; MICKE, G.A.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M.G.; FRÖDE, T.S. *Esenbeckia*

leiocarpa Engl. Inhibits inflammation in a carrageenan-induced murine model of pleurisy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 63, p. 1091 – 1102, 2011.

PROKOPOWICZ, Z.; MARCINKIEWICZ, J.; KATZ, D. R.; CHAIN, B. M. Neutrophil Myeloperoxidase: Soldier and statesman. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*, v. v.60, p. 43 – 54, 2012.

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*, 17: 723-741, 1993.

REYNOLDS, J. M.; ANGKASEKWINAI, P.; DONG, C. IL-17 family member cytokines: Regulation and function in innate immunity. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 21, p. 413 – 423, 2010.

RITTER, L. M. O.; MORO, R. S. Similaridade florística entre disjunções de cerrado na bacia do alto Tibagi, Paraná. *Terr@ Plural*, v. 1, p. 85 – 98, 2007.

ROBINSON, M. M.; ZHANG, X. **The world medicines situation 2011 – Traditional medicines: global situation, issues and challenges**. 3. Ed., Genova: World Health Organization, 2011. 14 p.

ROCHA, F. F.; NEVES, E. M. N.; COSTA, E. A.; MATOS, L. G.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P.; CORTES, W. S.; VANDERLINDE, F. A. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj.(Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, p. 344 – 349, 2008.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio dos cerrados na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais de Botucatu*, v. 9, p. 17 – 35, 2007.

ROSA, C.; CÂMARA, S. G.; BÉRIA, J.U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica de saúde. *Ciência & Saúde Coletiva*, v.16, p. 311 – 318, 2011.

SALANTINO, A.; SALANTINO, M.L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, p. 11 – 33, 2007.

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

SERHAN, C.N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology*, v.6, p. 1191 – 1197, 2005.

SHI, C.; PAMER, E.G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature Reviews of Immunology*, v. 11, p. p. 762 – 774, 2011.

SU, W. H.; CHENG, M.H.; LEE, W.L.; TSOU, T.S.; CHANG, W.H.; CHEN, C.S.; WANG, P.H. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for wounds: pain relief of exerssive scar formation? *Mediators of Inflammation*. 413238, 2010.

SUSUKI, J.; ISOBE, M.; MORISHITA, R.; NAGAI, R. Tea polyphenols regulate key mediators on inflammation cardiovascular diseases. *Mediators of Inflammation*, v. 2009, p. 1 – 5, 2009.

TANAKA, J.C.A.; SILVA, C.C.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V.; CARVALHO, J.E.; FOGLIO, M.A. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). *Quimica Nova*, v. 28, p. 834-837, 2005.

TANUS-RANGEL,E.; SANTOS,S.R.; LIMA,J.C.S.; LOPES,L.; NOLDIN,V.; MONACHE,F.D.; CECHINEL-FILHO,V.; MARTINS,D.T.O. Topical and systemic anti-inflammatory effects of *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (Alismataceae). *Journal of Medicinal Food*, v.13, p. 1161 – 1166, 2010.

TINCANI, A.; ANDREOLI, L.; BAZZANI, C.; BOSISO, D.; SOZZANI, S. Inflammatory molecules: A target for treatment of systemic autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, v. 7, p. 1- 7, 2007.

TOURDOT, S.; MATHIE, S.; HUSSEL, T.; EDWARDS, L.; WANG, H.; OPENSHAW, P. J.; SCHWARZE, J.; LLOYD, C. M. Respiratory

syncytial virus infection provokes airway remodeling in allergen-exposed mice in absence of prior allergen sensitization. *Clinical & Experimental Allergy*, v. 38, p. 1016 – 1024, 2008.

TRIPATHI, K.; KUMAR, R.; BHARTI, K.; KUMAR, P.; SHRIVASTAV, R.; SUNDAR, S.; PAI, K. Adenosine deaminase activity in sera of patients with visceral leishmaniasis in India. *Clinica Chimica Acta*, v. 388, p. 135 – 168, 2008.

URUNSAK, I. F.; GULEC, U. K.; PAYDAS, S.; SEYDAOGLU, G.; GUZEL, A. B.; VARDAR, M. A. Adenosine deaminase activity in patients with ovarian neoplasms. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, v. 286, p. 155 – 159, 2012.

VUNDA, S. L. L.; SAUTER, I. P.; CIBULSKI, S. P.; ROEHE, P. M.; BORDIGNON, S. A. L.; ROTT, M. B.; APEL, M. A.; VON POSER, G. L. Chemical composition and amoebicidal activity of *Croton pallidulus*, *Croton ericoides*, and *croton isabelli* (Euphorbiaceae) essential oils. *Parasitology Research*, v. 111, p. 961 – 966, 2012.

WHITEHOUSE, M.W. Anti-inflammatory glucocorticoid drugs: reflections after 60 years. *Inflammopharmacology*, v.19, p. 1 – 19, 2011.

WINK, D. A.; HINES, H. B.; CHENG, R. Y. S.; SWITZER, C. H.; SANTANA-FLORES, W.; VITEK, M. P.; RIDNOUR, L. A.; COLTON, C. A. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 89, p. 873 – 891, 2011.

WONG, E. T.; TERGAONKAR, V. Roles of NF- κ B in health and disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clinical Science*, v. 116, p. 451 – 465, 2009.

YAMAGATA, T.; ICHINOSE, M. Agents against cytokine synthesis or receptors. *European Journal of Pharmacology*, v. 533, p. 289 – 301, 2006.

ZAKERI, Z.; IZADI, S.; NIAZI, A.; BARI, Z.; ZENDEBOODI, S.; SHAKIBA, M.; MASHHADI, M.; NAROUIE, B.; GHASEMI-RAD, M. Comparison of adenosine deaminase levels in serum and synovial fluid between patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Int J Clin Exp Med*, v. 5, p. 195 – 200, 2012.

ANEXO I**Protocolo de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC) (PP 00617/2011)****Resultado de Solicitação de Protocolo****Protocolo**

PP00617

Título

ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA Croton antispyphillicus Mart. NO MODELO DA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS.

Data de Entrada

30/03/2011

Resultado:

Aprovado

Data/ Prazo

06/05/2011

Considerações

Ofício nº 57/CEUA/PRPE/2011

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

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Tânia Sílvia Fröde, Departamento de Análises Clínicas - CCS

Prezado(a) Professor(a),

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

- APROVADO, por dois ano(s), para a utilização de um mil e cinquenta e seis camundongos (*Mus musculus*).

- Procedência do animal: Biotério Central da UFSC.

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

Atenciosamente,

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

Data 10/08/2013

Data 10/05/2011

Parecer(es):



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

ANEXO II

Submissão do artigo para periódico indexado

▼ **Fwd: Acknowledgement of Receipt** Qui, 31 Jan 2013 às 14:21 

De: taniafrode@zipmail.com.br 

Para: gustavodos.reis@yahoo.com.br

Mensagem original

De: Inflammation <mariaarhea.perilla@springer.com>

Para: Tânia Sílvia Fröde <taniafrode@zipmail.com.br>

Assunto: Acknowledgement of Receipt

Enviada: 30/01/2013 17:29

Dear Tania:

Thank you for submitting your manuscript, IFLA-D-13-00037 "Croton antispyphillicus Mart. attenuates the inflammatory response to carrageenan-induced pleurisy in mice", to Inflammation.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

<http://flia.edmgr.com/>

ANEXO III

Artigos publicados em colaboração

1. LIZ, R.; ZANATTA, L; **REIS, G.O.**; HORST, H.; PIZZOLATTI, M.G.; SILVA, F.R.M.B.; FRODE, T.S. Acute effect of β -sitosterol on calcium uptake mediates anti-inflammatory effect in murine activated neutrophils. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.65, p. 115-122, 2013.
2. POZZATTI, P.; **REIS, G.O.**; PEREIRA, D.F.; HELLER, M.; MICKE, G.A.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M.G.; FRÖDE, T.S. *Esenbeckia leiocarpa* Engl. Inhibits inflammation in a carrageenan-induced murine model of pleurisy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 63, p. 1091 – 1102, 2011.

Resumos apresentados em anais de congresso

1. FRODE, T.S.; LIZ, R.; ZANATTA, L.; **REIS, G.O.**; HORST, H.; PIZZOLATTI, M.G.; SILVA, F.R.M.B. Beta-sitosterol promotes anti-inflammatory effect in murine activated neutrophils in a calcium uptake-dependent manner. In: AACC 2012 Annual Meeting & Clinical Lab Expo, 2012, Los Angeles. Annual Meeting & Clinical Lab Expo 2012 Abstracts titles guide, 2012.
2. VICENTE, G.; **REIS, G.O.**; KANUMFRE, F.; PIZZOLATTI, M.G.; FRODE, T.S. Estudo do efeito anti-inflamatório da *Croton antisiphiliticus* Mart. no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. In: 22º Seminário de Iniciação Científica da UFSC, 2012, Florianópolis. Anais do 22º Seminário de Iniciação Científica da UFSC, Website, 2012.
3. **REIS, G.O.**; VICENTE, G.; KANUMFRE, F.; PIZZOLATTI, M.G.; FRODE, T.S. Evaluation of anti-inflammatory properties of aqueous fraction and isolated flavonoids from *Croton antisiphiliticus* Mart. in *in vivo* experiments. In: XXXVII Congress of the Brazilian Immunology Society, 2012, Campos de Jordão. Anais da IMMUNO 2012 XXXVII Congress of the Brazilian Immunology Society, CD ROM, 2012.
4. **REIS, G.O.**; VICENTE, G.; KANUMFRE, F.; PIZZOLATTI, M.G.; FRODE, T.S. Evidence of anti-inflammatory effects from the

crude extract and fractions obtained from *Croton antisiphiliticus* Mart. in a murine carrageenan-induced model. In: IMMUNOFOZ - XXXVI Brazilian Congress of Immunology, 2011, Foz do Iguaçu. Anais do XXXVI Brazilian Congress of Immunology, CD-ROM, 2011.

5. **REIS, G.O.**; POZZATTI, P.; PEREIRA, D.F.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M.G.; FRODE, T.S. Structure-activity study of dihydrocorynantheol alkaloid and its anti-inflammatory efficacy in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan. In: IMMUNOFOZ - XXXVI Brazilian Congress of Immunology, 2011, Foz do Iguaçu. Anais do XXXVI Brazilian Congress of Immunology, CD-ROM, 2011.

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