

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COORDENADORIA ESPECIAL DE FARMACOLOGIA

Avaliação da Atividade Antioxidante, Antinociceptiva e  
Antiinflamatória do Extrato Bruto, Frações, Sub-Frações e  
Compostos Isolados da *Croton celtidifolius*.

Dissertação apresentada ao Curso de  
Pós-graduação em Farmacologia da  
Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito parcial à obtenção do  
título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Rosa Maria  
Ribeiro-do-Valle Nicolau.

**GEISSON MARCOS NARDI**  
Florianópolis, Fevereiro de 2002

**“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE,  
ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA DO EXTRATO  
BRUTO, FRAÇÕES, SUB-FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS  
DA *Croton celtidifolius*”**

**POR**

**GEISSON MARCOS NARDI**

**Dissertação julgada e aprovada em sua  
forma final, pela Orientadora e membros  
da Banca Examinadora *ad hoc*, composta  
pelos Professores Doutores:**

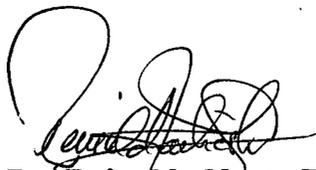
**Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau  
Orientadora – PGFMC – UFSC**

**Caden Souccar  
Depto. de Farmacologia - UFSP**

**Jamil Assreuy  
PGFMC - UFSC**

**Thereza C. M. de Lima Nogueira  
PGFMC - UFSC**

**Florianópolis, 27 de fevereiro de 2002.**



**Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi  
Coordenador do Programa**

NARDI, Geisson Marcos. **Avaliação da atividade antioxidante, antinociceptiva e antiinflamatória do extrato bruto, frações sub-frações e compostos isolados da *Croton celtidifolius***. Florianópolis, 2002. 150f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Rosa Maria Ribeiro-do-Valle

Defesa: 27/02/2002.

Foram testadas as atividades antioxidantes, analgésicas e antiinflamatórias do extrato bruto EB, das frações acetato de etila FAE, n-butanol FBuOH, aquosa FAq, das subfrações, 19SF, 26SF, 35SF, 51SF, 63SF, catequina e galocatequina da *Croton celtidifolius*. *In vitro*, reduziram a degradação da desoxiribose, inibiram a redução do NBT e a peroxidação lipídica do homogenato de fígado de rato. O EB por v.o. reduziu as contorções abdominais, do mesmo modo o EB por v.o., FBuOH por v.o. e via i.p. e FAq por via i.p. reduziram a segunda fase de nocicepção por formalina. A FAE por v.o. e por via i.p. e a 63SF por via i.p. reduziram as duas fases de nocicepção. O EB, FAE, FBuOH, FAq, 35SF, 63SF e a catequina reduziram, tanto por v.o. e via i.p. o edema de pata em camundongos. A FAE, e a 63SF, reduziram o extravasamento plasmático e a migração celular de polimorfonucleares no espaço pleural. Mecanismos envolvidos na atividade antiinflamatória é a redução da peroxidação lipídica, aumento na atividade da enzima superóxido dismutase SOD, redução da produção do  $O_2^{\bullet-}$ . No entanto não houve redução dos níveis de nitrito/nitrato, no exudato e não ocorreu redução de danos promovidos pelos EROs no DNA. Os resultados mostram que a *Croton celtidifolius*, apresenta substâncias com atividade antioxidante, antinociceptiva e parte da atividade antiinflamatória é devido a modulação do estresse oxidativo.

Palavras chave: Radicais Livres, Plantas medicinais, Antiinflamatório.

## **Agradecimentos**

Dedico este trabalho a minha esposa Viviane Koepp e meu filho Marcos Koepp Nardi, pela sua paciência e compreensão, que sempre estiveram presentes nos momentos mais difíceis e me ajudaram a realizar mais um sonho.

A minha mãe Selda Nardi e minha Adelina Nardi “in memorium” que sempre acreditaram em mim, e nunca me deixaram faltar nada nesta vida.

A minha outra mãe Rosa Maria Ribeiro-do-Valle, que nestes sete anos de convívio, sempre soube valorizar meu trabalho e manteve a elegância até nos momentos em que chamar minha atenção tornava-se necessário.

Aos professores do Departamento de Farmacologia especialmente ao Prof. Dr. Jamil Assreuy, sem a sua colaboração seria impossível a realização deste trabalho, e a Profa. Dr. Thereza Christina Monteiro de Lima Nogueira, pelos conselhos.

Aos amigos do laboratório, Elke, Ricardo, Denise, Maike, Rodrigo, Paulinho, Mariana, especialmente Jarbas, Regina, Sílvia e Karina Ckless, pelos momentos de descontração e pelas valorosa ajuda e discussão dos resultados.

Ao professor Moacir Pizzolatti e a Karina Timbola por terem me apresentado a *Croton celtidifolius*.

Aos amigos da turma de pós-graduação pela ajuda mútua nas disciplinas deste curso.

A Raimundo, Nilva, Marcelo, Janaína, Janice, Birinha, Fábio,  
Cristiane, minha mais nova família.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

A virgem Maria,

E a todos, que de alguma forma ajudaram-me nesta caminhada,

Os meus mais sinceros agradecimentos.

Geisson Marcos Nardi

## RESUMO

*Croton celtidifolius*, uma planta pertencente a família Euphorbiaceae, tem seu uso popular preconizado para o tratamento de doenças inflamatórias e ulcerativas. A análise fitoquímica prévia demonstrou a presença de flavonóides e proantocianidinas. Foram testadas as atividades antioxidantes, analgésicas e antiinflamatórias do extrato bruto (EB), das frações acetato de etila (FAE), n-butanol (FBuOH), aquosa (FAq) e éter dietílico, das subfrações derivadas da FAE, 19SF, 26SF, 35SF, 51SF e 63SF e dois flavonóides isolados da subfração 11SF, catequina e galocatequina em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Todos os compostos testados apresentaram atividade antioxidante *in vitro*, uma vez que foram capazes de reduzir a degradação da desoxiribose, inibiram a redução do NBT e a peroxidação lipídica do homogenato de fígado de rato. Somente a catequina não inibiu a redução do NBT e a FAq e a 63SF não inibiram a peroxidação lipídica. O EB demonstrou atividade analgésica: o tratamento oral reduziu as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. O EB por v.o., FBuOH (v.o. e i.p.) e FAq (i.p.) reduziram a reatividade dos animais na segunda fase da dor induzida por formalina de maneira dose-dependente. A FAE, tanto por v.o. como por via i.p., reduziu de maneira dose-dependente as duas fases da nocicepção induzida por formalina. Este efeito é devido à presença de proantocianidinas na sub-fração 63SF, a única que demonstrou reduzir as duas fases de nocicepção. O EB, a FAE, a FBuOH, a FAq, as proantocianidinas (35SF e 63SF) e a catequina apresentaram atividade antiedematogênica, reduzindo de maneira dose-dependente, tanto por v.o. e via i.p., o edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Este efeito não é relacionado à presença de substâncias vasoconstritoras na FAE. A FAE de

maneira dose-dependente, e a 63SF, apresentaram atividade antiinflamatória uma vez que reduziram a migração celular e o extravasamento plasmático, caracterizado principalmente pela migração de polimorfonucleares no espaço pleural. Um dos mecanismos envolvidos na atividade antiinflamatória é a redução da peroxidação lipídica promovida pela FAE e pela catequina e um aumento na atividade da enzima superóxido dismutase SOD, promovido pela FAE e 63SF. A FAE, demonstrou reduzir ainda a produção do radical ânion superóxido pelas células isoladas da cavidade pleural, e não reduziu os níveis de nitrito/nitrato, no exudato. A FAE, não demonstrou reduzir danos promovidos pelos EROs nas células da cavidade pleural. Os resultados demonstram que a *Croton celtidifolius*, apresenta substâncias com atividade antioxidante, antinociceptiva e antiinflamatória e que parte da atividade antiinflamatória é devido à modulação do estresse oxidativo pelos compostos fenólicos da planta.

## ABSTRACT

*Croton celtidifolius* is a plant belonging to the family Euphorbiaceae, whose use is widespread for the treatment of inflammatory and ulcerative disorders. Previous phytochemical analysis demonstrated the presence of flavonoids and proanthocyanidins. This study examined the antioxidant, analgesic and anti-inflammatory activity, in *in vitro* and *in vivo* experimental models, of the following products of *Croton celtidifolius*: crude extract (CE), ethyl acetate (FEA), n-butanol (FBuOH), aqueous (FAq) and diethyl ether fractions, the sub-fractions, derived from FEA, 19SF, 26SF, 35SF, 51SF and 63SF and two flavonoids, isolated from sub-fraction 11SF, catechin and galocatechin. All of the substances tested presented antioxidant activity *in vitro*, since they reduced deoxyribose degradation and inhibited the reduction of NBT and lipid peroxidation in rat liver homogenate; catechin alone did not inhibit the reduction of NBT, whilst FAq and 63SF did not inhibit lipid peroxidation. Dose-dependent analgesic activity was exhibited by the CE, given v.o., which decreased the writhing induced by acetic acid, and by the CE (v.o.), FBuOH (v.o. and i.p.) and FAq (i.p.), all of which reduced the reactivity of animals in the second phase of formalin-induced nociception. The FEA, administered both by v.o. and i.p. routes, caused dose-dependent inhibition in both phases of formalin-induced nociception, this effect resulted from the presence of proanthocyanidins that were also present in sub-fraction 63SF, the only sub-fraction to exhibit activity in both phases of nociception. The CE, FEA, FBuOH, FAq, the proanthocyanidines in 35SF and 63SF, and catechin presented antioedematogenic activity, since both v.o. and i.p. treatments caused a dose-dependent reduction in the paw oedema induced by carrageenan in mice, this effect was not related to the presence of vasoconstrictor

substances in the FEA. The FEA, in a dose-dependent manner, and the 63SF presented anti-inflammatory activity, as shown by a reduction in plasma extravasation and in the migration of cells, mainly polymorphonuclear leukocytes, to the pleural space. The mechanisms involved in this anti-inflammatory activity included a reduction in lipid peroxidation, caused by the FEA and by catechin, and an increase in the activity of the superoxide dismutase enzyme (SOD), in the case of FEA and 63SF. Furthermore, the FEA decreased the production of superoxide radical anion by cells isolated from the pleural cavity, whilst it did not affect the levels of nitrite/nitrate in the exudate. The FEA did not prevent the damage caused by ROS in cells of the pleural cavity. The results show that *Croton celtidifolius* contains substances with antioxidant, antinociceptive and anti-inflammatory activity, and that the latter is due, in part, to a modulation of oxidative stress by phenolic compounds.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Representa a *Croton celtidifolius* em seu habita natural, suas folhas, e a retirada da casca.....05
- Figura 2** – Geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), e mecanismo de defesa enzimático.....17
- Figura 3** – Representação do esquema de fracionamento e isolamento.....33
- Figura 4** – Representação das classes de dano no.....49
- Figura 5** – Representação esquemática dos procedimentos necessários para a realização das dosagens bioquímicas no exudato pleural.....51
- Figura 6** - Efeito das frações, sub-frações e compostos isolados, sobre a degradação da desoxirribose.....57
- Figura 7** - Efeito das frações, sub-frações e compostos isolados na inibição da redução do NBT.....60
- Figura 8** - Efeito das frações, sub-frações e compostos isolados, sobre a oxidação do homogenato de fígado de rato.....62
- Figura 9** - Efeito do EB, sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos.....64
- Figura 10** – Efeito antinociceptivo do EB, FAE, FBUOH e FAq, por via oral, sobre a reatividade da primeira fase (A) e segunda fase (B) e edema (C), induzidos pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.....67
- Figura 11** – Efeito antinociceptivo da FAE, FBUOH e FAq por via i.p, sobre a reatividade da primeira fase (A) e segunda fase (B) e edema (C), induzidos pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.....68
- Figura 12** – Efeito das sub-frações e compostos isolados sobre a reatividade da primeira fase (A) e segunda fase (B) e edema (C), induzidos pela injeção intraplantar de formalina.....69

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 13</b> - Efeito antiedematogênico induzido pelo EB.....  | 72  |
| <b>Figura 14</b> - Efeito antiedematogênico induzido pela FAE .....  | 74  |
| <b>Figura 15</b> - Efeito antiedematogênico induzido pela FBUOH.....   | 76  |
| <b>Figura 16</b> - Efeito antiedematogênico induzido pela FAq.....   | 78  |
| <b>Figura 17</b> - Efeito antiedematogênico induzido pela catequina, 35SF e 63SF.....  | 80  |
| <b>Figura 18</b> - Efeito da FAE, sobre a pressão arterial média de ratos anestesiados.....  | 83  |
| <b>Figura 19</b> - Efeito da FAE na pleurisia induzida pela carragenina em ratos.....  | 85  |
| <b>Figura 20</b> - Efeito da catequina, 35SF e 63SF na pleurisia induzida pela carragenina em ratos.....   | 86  |
| <b>Figura 21</b> - Efeito da FAE, catequina, 35SF e 63SF sobre a formação do ânion superóxido, pela células isoladas da cavidade pleural de ratos.....         | 89  |
| <b>Figura 22</b> – Nível de peroxidação lipídica nas células isoladas da cavidade pleural de ratos tratados com FAE, catequina, 35SF e 63SF.....               | 91  |
| <b>Figura 23</b> – Efeito da FAE, catequina, 35SF e 63SF sobre a atividade da enzima SOD de células isoladas da cavidade pleural de ratos.....                 | 93  |
| <b>Figura 24</b> – Efeito da FAE, sobre danos no DNA e sobre a quantidade de nucleóides em cada classe de dano no DNA.....                                     | 95  |
| <b>Figura 25</b> – Efeito da FAE catequina, 35SF e 63SF sobre os níveis de nitrito/nitrato no exudato da cavidade pleural de ratos submetidos a pleurisia..... | 97  |
| <b>Figura 26</b> - Exemplo da estrutura da catequina e de uma proantocianidina.....  | 100 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> - Comparação dos valores de $CI_{50}$ e seus respectivos intervalos de confiança, da inibição da degradação da desoxirribose..... | 58 |
| <b>Tabela 2</b> - Efeito antiedematogênico do EB.....   | 73 |
| <b>Tabela 3</b> - Efeito antiedematogênico da FAE.....  | 75 |
| <b>Tabela 4</b> - Efeito antiedematogênico da FBUOH.....  | 77 |
| <b>Tabela 5</b> - Efeito antiedematogênico da FAq.....  | 79 |
| <b>Tabela 6</b> - Efeito antiedematogênico das sub-frações e compostos isolados.....  | 81 |
| <b>Tabela 7</b> - Efeito da FAE, 35 SF e 63 SF, na pleurisia induzida por carragenina em ratos.....   | 87 |
| <b>Tabela 8</b> - Efeito da FAE, catequina, 35SF e 63 SF sobre a produção de nitrito/nitrato no exudato da cavidade pleural de ratos.....         | 99 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| 5-HETE                             | 5-hidroperóxido-eicosatetraenóico.  |
| 11SF, 19SF, 26SF, 35SF, 51SF, 63SF | – Sub-frações.  |
| AA                                 | Ácido araquidônico.   |
| AP-1                               | Proteína ativadora tipo 1.  |
| ATP                                | Adenosina 5'-trifosfato.  |
| Ca <sup>2+</sup>                   | Íon cálcio.   |
| CAT                                | Catalase.   |
| Cat                                | Catequina.  |
| CGRP                               | Peptídeo relacionado com o gene da calcitonina.                           |
| CI <sub>50</sub>                   | Concentração inibitória 50 %.   |
| Cu <sup>2+</sup>                   | Íon Cobre.  |
| DI <sub>50</sub>                   | Dose inibitória 50 %.   |
| DNA                                | Ácido desoxirribonucleico.  |
| EB                                 | Extrato bruto.  |
| EC-SOD                             | Superóxido dismutase extracelular.  |
| E.P.M                              | Erro padrão da média.   |
| EROs                               | Espécies reativas de oxigênio.  |
| ERNs                               | Espécies reativas de nitrogênio.  |
| EtOH                               | Etanol.   |
| FAE                                | Fração acetato de etila.  |
| FAq                                | Fração Aquosa.  |
| FBuOH                              | Fração butanólica.  |
| Fe <sup>2+</sup>                   | Íon ferroso.  |
| Fe <sup>3+</sup>                   | Íon férrico.  |
| GMPc                               | Monofosfato cíclico de 3', 5'-guanosina.                                  |
| GSH                                | Glutationa peroxidase   |
| H                                  | Hidrogênio.   |
| HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>       | Radical superóxido protonado.   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>      | Peróxido de hidrogênio.   |
| ICAM-1                             | Molécula de adesão intercelular( <i>Intercelular adhesion molecule1</i> ) |
| IFN                                | Interferon.   |

|                              |  |
|------------------------------|--|
| IL                           | Interleucinas  |
| indo                         | Indometacina.  |
| i.p.                         | Via i.p.   |
| IV                           | Infravermelho  |
| I $\kappa$ B                 | Proteína inibitória do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B.                                      |
| L                            | Ácido graxo poliinsaturado.  |
| LDL                          | Lipoproteína de baixa densidade ( <i>Low Density lipoprotein</i> ).                                      |
| LFA-1                        | Molécula de adesão da superfamília das imunoglobulinas ( <i>Leukocyte function associated antigen</i> ). |
| LMA                          | Agarose de baixo ponto de fusão ( <i>Low melting agarose</i> ).  |
| LO <sub>2</sub> <sup>•</sup> | Radical peroxila.  |
| LT                           | Leucotrienos.  |
| LTB <sub>4</sub>             | Leucotrieno B <sub>4</sub> .   |
| Mac-1                        | Molécula de adesão da família das integrinas ( <i>Macrophage-1 antigen</i> ).                            |
| mM                           | Milimolar.   |
| NAC                          | N-acetilcisteína.  |
| NADH                         | Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida.   |
| NADPH                        | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato   |
| NF- $\kappa$ B               | Fator de transcrição nuclear $\kappa$ B.   |
| NMA                          | Agarose de ponto de fusão normal ( <i>Normal melting agarose</i> ).                                      |
| NO ou NO <sup>•</sup>        | Óxido nítrico.   |
| NOS                          | Óxido nítrico sintase.   |
| NOS <sub>e</sub>             | Óxido nítrico sintase endotelial.  |
| NOS <sub>i</sub>             | Óxido nítrico sintase induzível.   |
| NOS <sub>n</sub>             | Óxido nítrico sintase neuronal.  |
| O <sub>2</sub>               | Oxigênio molecular.  |
| O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> | Radical ânion superóxido.  |
| OH <sup>•</sup>              | Radical Hidroxila.   |
| OH <sup>-</sup>              | Íon Hidroxila.   |
| OMS                          | Organização Mundial da Saúde.  |
| ONOO <sup>-</sup>            | Ânion peroxinitrito.   |
| p/v                          | Peso por volume.   |

|                            |  |
|----------------------------|--|
| PAF                        | Fator de agregação plaquetária.                                  |
| PAM                        | Pressão arterial média   |
| PDCT                       | Pirrolidina ditiocarbamato.                                      |
| PG                         | Prostaglandinas.   |
| PGD <sub>2</sub>           | Prostaglandina D <sub>2</sub> .                                  |
| PGE <sub>2</sub>           | Prostaglandinas E <sub>2</sub> .                                 |
| PGF <sub>2α</sub>          | Prostaglandina F <sub>2α</sub> .                                 |
| PGI <sub>2</sub>           | Prostaglandina I <sub>2</sub> .                                  |
| PKC                        | Proteína Quinase C.  |
| PLC, PLD, PLA <sub>2</sub> | Fosfolipases C, D, A <sub>2</sub> .                              |
| RMN                        | Ressonância magnética nuclear.                                   |
| SOD                        | Superóxido dismutase.  |
| SOD-Cu/Zn                  | Superóxido dismutase citossólica                                 |
| SOD-Mg                     | Superóxido dismutase mitocondrial.                               |
| TNF                        | Fator de necrose tumoral.  |
| v.o.                       | Via oral   |
| VC                         | Vitamina C, Ácido ascórbico.                                     |
| VE                         | Vitamina E, α-Tocoferol.   |
| VLA-4                      | Molécula de adesão ( <i>Vascular cell adhesion molecule-1</i> ). |
| UI                         | Unidades internacionais.   |

# SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

INTRODUÇÃO 01

OBJETIVOS 29

MATERIAIS E MÉTODOS 31

3.1 ANIMAIS 31

3.2 MATERIAL BOTÂNICO 31

3.2.1 *EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO* 32

3.3 DROGAS E REAGENTES 36

3.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS 37

3.4.1 *ENSAIOS BIOQUÍMICOS "IN VITRO"* 37

3.4.1.1 *DETERMINAÇÃO DE DANOS OXIDATIVOS SOBRE A DESOXIRIBOSE.* 37

3.4.1.2 *DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE SEQUESTRADORA DO RADICAL  
ÂNION SUPERÓXIDO.* 38

3.4.1.3 *PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA* 39

3.4.2 *ENSAIOS FARMACOLÓGICOS.* 40

3.4.2.1 *ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA* 40

3.4.2.1.1 *TESTE DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ÁCIDO  
ACÉTICO* 40

3.4.2.1.2 *TESTE DA FORMALINA EM CAMUNDONGOS* 41

3.4.2.2 *ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA* 42

3.4.2.2.1 *TESTE DO EDEMA DE PATA EM CAMUNDONGOS* 42

3.4.2.2.1 *PRESSÃO ARTERIAL EM RATOS ANSTESIADOS* 43

|  |    |
|--|----|
| 3.4.2.3 ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA   | 44 |
| 3.4.2.2.1 PLEURISIA INDUZIDA POR CARRAGENINA EM RATOS  | 44 |
| 3.4.2.2.2 DETERMINAÇÃO DO VOLUME DO EXUDATO  | 45 |
| 3.4.2.2.3 CONTAGEM CELULAR E DIFERENCIAL   | 45 |
| <b>3.4.3 ENSAIOS BIOQUÍMICOS "EX VIVO"</b>   | 46 |
| 3.4.3.1 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE ATRAVÉS DO TESTE DO COMETA   | 46 |
| 3.4.3.2 PREPARAÇÃO DO EXUDATO PLEURAL DE RATOS PARA TESTES BIOQUÍMICOS.  | 49 |
| 3.4.3.3 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DO RADICAL ÂNION SUPERÓXIDO EM CÉLULAS DA CAVIDADE PLEURAL DE RATOS SUBMETIDOS A PLEURISIA            | 50 |
| 3.4.3.4 DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NAS CÉLULAS ISOLADAS DA CAVIDADE PLEURAL DE RATOS SUBMETIDOS A PLEURISIA                  | 52 |
| 3.4.3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) NAS CÉLULAS DA CAVIDADE PLEURAL DE RATOS SUBMETIDOS A PLEURISIA | 52 |
| 3.4.3.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE NITRITO/NITRATO NO EXUDATO PLEURAL DE RATOS SUBMETIDOS A PLEURISIA                                  | 54 |
| <b>3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>   | 55 |
| <b>RESULTADOS</b>  | 56 |
| <b>4.1 RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE "IN VITRO"</b>   | 56 |
| 4.1.1 Inibição da Degradação da Desoxirribose  | 56 |
| 4.1.2 Inibição da Redução do NBT.  | 59 |
| 4.1.3 Peroxidação Lipídica.  | 61 |
| <b>4.2 RESULTADOS DOS ENSAIOS FRAMACOLÓGICOS.</b>  | 63 |
| 4.2.1 Contorções Abdominais Induzidas Pelo ÁcidoÁcético  | 63 |
| 4.2.2 Teste da Formalina em Camundongos  | 65 |
| 4.2.3 Edema de Pata Induzido pela Carragenina em Camundongos   | 70 |
| 4.2.4 Pressão Arterial em Ratos Anestesiados   | 82 |
| 4.2.5 Teste da Pleurisia Induzida pela Carragenina em Ratos  | 84 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>4.3 RESULTADOS BIOQUÍMICOS "EX VIVO".</b>   | 88  |
| 4.3.1 <i>Produção de Radical Ânion Superóxido por Células Isoladas da Cavidade Pleural de Ratos Submetidos a Pleurisia</i>     | 88  |
| 4.3.2 <i>Índice de Peroxidação Lipídica nas Células Isoladas da Cavidade Pleural de Ratos Submetidos a Pleurisia</i>           | 90  |
| 4.3.3 <i>Atividade da Enzima Superóxido Dismutase nas Células Isoladas da Cavidade Pleural de Ratos Submetidos a Pleurisia</i> | 92  |
| 4.3.4 <i>Teste do Cometa em Células Isoladas da Cavidade Pleural de Ratos Submetidos a Pleurisia</i>                           | 94  |
| 4.3.5 <i>Determinação dos Níveis de Nítrito/Nitrato no Exudato Pleural de Ratos Submetidos a Pleurisia</i>                     | 96  |
| <b>DISCUSSÃO</b>   | 99  |
| <b>CONCLUSÕES</b>  | 120 |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>  | 124 |

# INTRODUÇÃO

Os milhares de remédios que estão atualmente disponíveis não têm mais do que 100 anos de idade. Até 1928, quando Friedrich Woheir sintetizou a uréia a partir de uma substância inorgânica, o cianato de amônio, o homem não concebia como fonte de matéria orgânica qualquer coisa que não fosse vegetal ou animal. Isto significa que, descontando praticamente apenas o século XX, toda a história da medicina e também da terapêutica, encontra-se intimamente ligada às plantas medicinais (Alzugaray, 1983).

Todas as civilizações utilizaram e ainda utilizam plantas medicinais para o tratamento das mais diversas doenças. Os chineses por volta do ano 3000 A.C. já conheciam as propriedades curativas da raiz de Ginseng e, em épocas posteriores, surgiram tratados de plantas medicinais. Os egípcios em 2300 A.C. criaram vermífugos, diuréticos, cosméticos e uma grande quantidade de líquidos perfumados e antisépticos, onde também diversas matérias vegetais eram empregadas no embalsamento de múmias. No começo da era cristã, Dioscórides enumerou, em seu tratado "De Materia Medica", mais de 500 extratos de origem vegetal, descrevendo o uso terapêutico de muitas delas. A utilização de plantas na prevenção e cura de

moléstias, condicionadas a um processo empírico que vem se desenvolvendo desde os tempos mais remotos, constitui a base da Medicina Popular (Alzugaray, 1983)

Plantas medicinais, são aquelas que tem uma história de uso tradicional como agente terapêutico. Os fitoterápicos são medicamentos cujos componentes terapêuticamente ativos são exclusivamente plantas ou derivados vegetais, não podendo ter em sua composição a inclusão de substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem associações destas com extratos vegetais. O uso de medicamentos fitoterápicos com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico, passou a ser oficialmente reconhecido pela Organização Mundial da Saúde em 1978, que recomendou a difusão, em nível mundial, dos conhecimentos necessários para o seu uso (OMS, 1978).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) 80% da população dos países em desenvolvimento utiliza-se de práticas tradicionais na atenção primária, e desse total, 85% usa plantas medicinais ou preparações destas. Ainda, segundo a OMS, as práticas da medicina tradicional expandiram globalmente na última década e ganharam popularidade, incentivadas não somente pelos profissionais que atuam na rede básica de saúde dos países em desenvolvimento, mas também naqueles onde a medicina convencional é predominante no sistema de saúde local. Em tal sentido a OMS, tem elaborado uma série de resoluções com o objetivo de considerar o valor potencial da medicina tradicional em seu conjunto para a expansão dos serviços de saúde regionais (OMS, 2000) .

No presente trabalho, objetivou-se o estudo farmacológico de uma planta medicinal, visando verificar, através de ensaios pré-clínicos, algumas propriedades terapêuticas preconizadas popularmente. Estes estudos representam os primeiros passos, os quais são determinantes para estudos mais profundos, visando o

desenvolvimento de novos medicamentos a partir de matérias-primas vegetais. Para tanto, após um *screening* preliminar com o extrato bruto de algumas espécies no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, escolheu-se, pelos ótimos resultados apresentados, a *Croton celtidifolius* Bail. da família Euphorbiaceae, conhecida popularmente como Sangue de Adáve.

### **A PLANTA *Croton celtidifolius* Bail.**

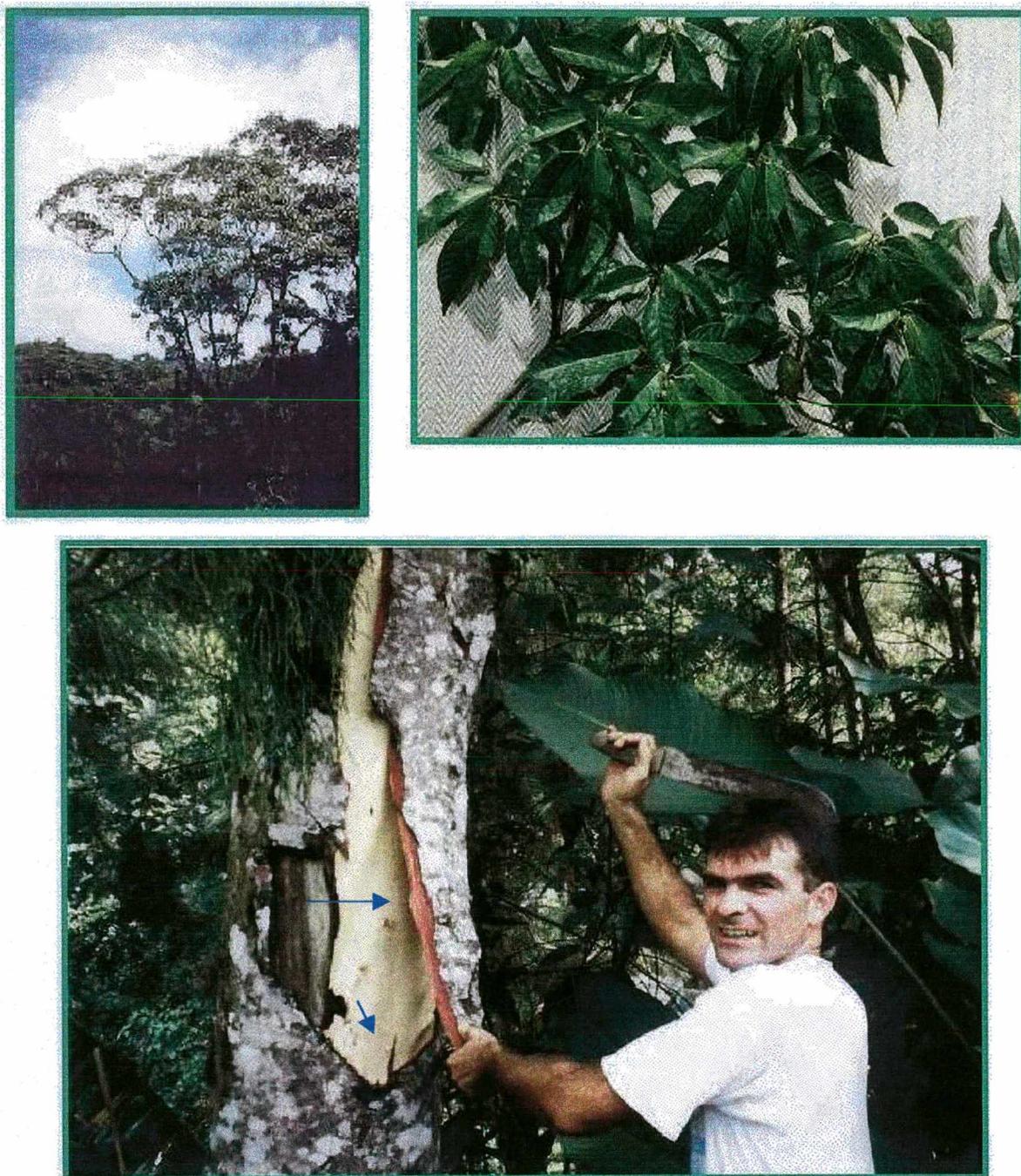
A *Croton celtidifolius* é uma planta pertencente à família Euphorbiaceae, que compreende 283 gêneros e em torno de 7300 espécies. Esta família tem distribuição cosmopolita, preferencialmente nos Trópicos. As maiores áreas de distribuição dessa planta são a América e a África tropical. (Farnsworth *et al.*, 1969)

No Brasil, a *Croton celtidifolius* é encontrada nas regiões de Mata Atlântica, desenvolve-se preferencialmente nas capoeiras e, por vezes, forma densos agrupamentos. É uma espécie frequentemente encontrada do Estado do Rio de Janeiro até Goiás, e já se observaram exemplares em São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Recebe diferentes nomes populares, tais como, Sangue de Adáve, Sangue de Drago, Pau-Sangue, Pau-Andrade, Urucurana, Capixingui, Sangue de Dragão, Tapixingui, etc. (Smith, 1988)

Os aspectos botânicos desta espécie foram estudados por Smith *e cols.*, (1988). Em resumo, é uma arvoreta de fácil reconhecimento no campo, comumente de 5 a 15 metros de altura e 10 a 25 cm de diâmetro; tronco quase cilíndrico e reto, raízes subterrâneas, casca externa acinzentada; casca interna ocre-esverdeada com exudação abundante ao corte, vermelha lembrando a cor de sangue, copa transparente. Suas folhas tem de 10 –18 cm de comprimento, palminervadas,

miudamente serrilhadas, delgadas, a face superior verde com pêlos entrelados deprimidos mais ou menos dispersos, a face inferior coberta de um indumento pálido.

A *Croton celtidifolius* é utilizada, na região do Planalto Serrano de Santa Catarina, para o tratamento de doenças inflamatórias e ulcerativas. Apesar da existência de estudos botânicos, não existe nenhuma referência científica sobre atividade biológica e indicação popular do uso da *Croton celtidifolius*, na literatura consultada. Existem apenas referências de estudos químicos da *Croton celtidifolius*, como a presença de ciclitóis, sendo que foram isolados o 1L-1-O-metil-*myo*-inositol, *neo*-inositol e sitosterol. O *neo*-inositol era conhecido somente como um composto sintético, sendo esta a primeira ocorrência deste composto em plantas (Mukherjee e Axt, 1984). Outros estudos demonstraram a presença de alcalóides e saponinas nas cascas dessa planta (Farnsworth *et al.*, 1969; Barnes *et al.*, 1980; Amaral e Barnes, 1997).



**Figura 1** – (A) A *Croton celtidifolius* em seu habitat natural, observando em destaque suas proporções, 5 – 15 m, em relação as outras espécies da mesma região, em (B) Folhas de 10 – 25 cm de comprimento e em (C) retirada da casca, matéria prima utilizada nos ensaios farmacológicos e bioquímicos, observando uma característica importante da espécie a cor vermelha de sua casca, e nas bordas de corte a exudação do látex avermelhado (setas azuis).

## ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO GÊNERO *Croton*.

Muitos estudos biológicos foram realizados com espécies do gênero *Croton*. Dentre elas podemos destacar as atividades antiinflamatória (Perdue *et al.*, 1979; Ichihara *et al.*, 1992; Carvalho *et al.*, 1996; Bighetti *et al.*, 1999), antinociceptiva (Carvalho *et al.*, 1996; Bighetti *et al.*, 1999; Vanderlinde, 1999; Oliveira *et al.*, 2001), anti-genotóxica (Agner *et al.*, 2001), anti-tumoral (Kupchan *et al.*, 1969; Chen *et al.*, 1994; Grynberg *et al.*, 1999), gastroprotetora (Hiruma-Lima *et al.*, 2000), anti-ulcerogênica (Kitazawa *et al.*, 1980; Hiruma-Lima *et al.*, 1999) hipoglicemiante (Farias *et al.*, 1997), redutora dos níveis de colesterol e triglicérides (Silva *et al.*, 2001), antimicrobiana (De Albuquerque *et al.*, 1974; McChesney *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1994; Abo *et al.*, 1999; Martins *et al.*, 2001), anti-diarreica (Gurgel *et al.*, 2001) anti-hipertensiva e vasorelaxante (Guerrero *et al.*, 2001), hemolítica (Banerjee e Sem, 1981), cicatrizante (Vaisberg *et al.*, 1989), citotóxica (Roengsumran *et al.*, 2001), anti-HIV (El-Mekkawy *et al.*, 2000), inibidora de síntese protéica (Stirpe *et al.*, 1976), inibidora da produção de radicais livres (Desmarchelier *et al.*, 1997) e inibidora da proliferação celular (Pieters *et al.*, 1993).

Desde o início dos estudos com espécies sul-americanas de *Croton*, já foram registradas 4 patentes, todas americanas. Somente uma proantocianidina, o SP-303 de posse da Shaman Pharmaceuticals, INC, vislumbrou êxito na fase III de estágio clínico. O "PROVIR<sup>®</sup>" nome comercial do SP-303, está para ser comercializado para o tratamento de diarreia em pacientes com AIDS (Shaman Pharmaceuticals, 2002).

## RADICAIS LIVRES

Os elétrons nos átomos ocupam regiões no espaço conhecidas como orbitais. Cada orbital pode ter no máximo dois elétrons com *spins* em direções opostas. Um radical livre pode ser definido como uma espécie capaz de existência independente, que contém um ou mais elétrons desemparelhados, sendo que um elétron desemparelhado é aquele que ocupa sozinho um orbital. Os elétrons são mais estáveis quando estão pareados no orbital, sendo que uma espécie radicalar é muito mais reativa do que moléculas não radicais que possuem os orbitais com dois elétrons. A maioria das moléculas no meio biológico não são radicais, contendo somente elétrons pareados (Halliwell e Gutteridge, 1989).

Em meio biológico os radicais livres são denominados de espécies reativas e possuem uma série de efeitos fisiológicos e patológicos.

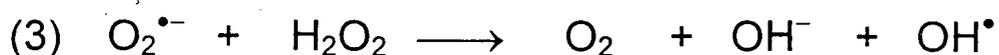
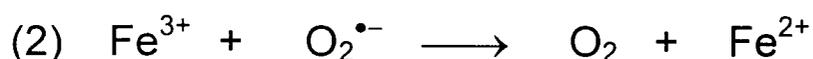
## ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs).

A presença do oxigênio na atmosfera é paradoxal: por um lado é indispensável a vida dos organismos aeróbicos; por outro lado, é responsável pela degradação química de inúmeras macromoléculas existentes no sistema biológico (Davies, 1994). Os malefícios provocados pelo oxigênio se devem em grande parte às espécies reativas de oxigênio (EROs). A produção de EROs ocorre através de sucessivas reduções monoelétrônicas do oxigênio molecular ( $O_2$ ), formando espécies parcialmente reduzidas denominadas espécies radicalares, que apresentam um elétron desemparelhado no orbital mais externo (Naqui, 1986; Halliwell, 1991).

Os radicais livres derivados do oxigênio que possuem relevância em sistemas biológicos são o radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o radical peridroxil (superóxido protonado,  $HO_2^{\bullet}$ ), o radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), e o radical livre óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ). A transferência de um elétron para o  $O_2$  produz o primeiro intermediário reativo o  $O_2^{\bullet-}$ , que sofre dismutação espontânea a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )(Reação 1).



Qualquer reação posterior requer a quebra das ligações entre os átomos de  $O_2$  para formar o  $OH^{\bullet}$ . O que ocorre é que traços de metais, primariamente o íon  $Fe^{2+}$  ou  $Cu^+$ , reage com o  $H_2O_2$  para produzir o  $OH^{\bullet}$ , conhecida como Reação de Fenton (Reação 2) (Cadenas, 1989; Jaeschke, 1995; Cuzzocrea, 2001). Outra reação que acreditava-se poder gerar  $O_2^{\bullet-}$ , era a Reação de Haber-Weiss, (Reação 3) (Storey, 1996). No entanto, estudos mais detalhados demonstraram que esta reação não acontece em condições fisiológicas (Cuzzocrea, 2001).



A geração de EROs em sistemas biológicos pode ocorrer através de diversas reações bioquímicas durante o metabolismo celular. A maioria do  $O_2$  consumido é reduzido completamente à água ( $H_2O$ ) através da cadeia respiratória, gerando

energia para produção de adenosina 5'-trifosfato (ATP). Esse processo envolve reações em cadeia, onde há transferência bivalente de elétrons para o  $O_2$  sem a formação de intermediários (Jaeschke, 1995). Entretanto, uma pequena fração do  $O_2$  (2-5%) sofre redução monovalente e é convertido em subprodutos como o  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  e  $^{\bullet}OH$  (McCord, 1983; Ji, 1995).

Situações patológicas, geralmente geram EROs. Por exemplo, durante um período isquêmico, baixas concentrações de oxigênio, promovem um declínio na fosforilação oxidativa, que ocorre na mitocôndria, pelo decréscimo da capacidade da cadeia respiratória transportar elétrons. Este fato gera um aumento da dependência da célula na produção de ATP via glicólise anaeróbica. Este processo é um meio ineficiente de produzir ATP da glicose e leva o aumento das concentrações de adenosina e os produtos de sua quebra, incluindo hipoxantina e xantina, que são substratos para o sistema enzimático xantina desidrogenase. Quando os níveis de ATP baixam, as células não são capazes de manter o gradiente iônico através de suas membranas, precipitando uma redistribuição de íons  $Ca^{2+}$ . As elevadas concentrações de  $Ca^{2+}$  citosólico ativam uma protease, possivelmente a calpaina, que catalisa a conversão da xantina desidrogenase em xantina oxidase. A reperfusão de um órgão temporariamente isquêmico restaura o suprimento de substrato requerido pela xantina oxidase o  $O_2$  e gera com isso grandes quantidades de  $O_2^{\bullet-}$  (McCord, 1985)

Outras fontes geradoras de EROs são as enzimas do sistema citocromo P450 que evitam efeitos tóxicos agudos de agentes químicos estranhos ao organismo de animais, mas resultam em subprodutos oxidantes que danificam a molécula de DNA (Block, 1992).

Existem também as origens exógenas de EROs que podem aumentar significativamente essa carga de oxidantes endógenos, como a poluição do ar, pesticidas, condições de hiperóxia e certos compostos presentes nos alimentos e no cigarro, são exemplos desta classe (Block, 1992). Os agentes antitumorais (por exemplo: as quinonas e as antraciclinas) danificam o DNA de forma indireta, envolvendo EROs como intermediários (Thornton *et al.*, 1995). Muitos dos efeitos quimioterápicos dessas drogas têm sido atribuídos à capacidade de reduzir o  $O_2$  a  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  e  $OH^{\bullet}$  (Freeman e Crapo, 1982). Além disso, durante exercícios aeróbicos prolongados, por exemplo, há uma produção excessiva de EROs (Ji, 1995).

### **ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO (ERNs).**

O Óxido Nítrico (NO) é sintetizado a partir do grupo guanidino da L-arginina por uma família de enzimas denominadas NO sintases (NOS). Três isoformas têm sido descritas e clonadas: NOS em células endoteliais (NOSe) e NOS neuronal (NOSn), ambas constitutivas, e um tipo induzível (NOSi). A formação de NO é ligada à incorporação de  $O_2$  na molécula de L-arginina e todas as isoformas são dependentes de calmodulina e NADPH (Stuehr, 1997; Geller e Billiar, 1998).

Muitas das ações biológicas do NO são mediadas através da ação sobre o sistema guanilato ciclase. O NO é uma pequena molécula lipofílica que se difunde através da célula e facilmente entra no citosol, onde ativa a guanilato ciclase pela ligação com o ferro do componente Heme da enzima. Com isto aumentam os níveis de monofosfato cíclico de 3', 5'-guanosina (GMPc), que ocasiona a redução da concentração de cálcio. O decréscimo do cálcio intracelular é responsável pelo relaxamento do músculo liso vascular e não vascular, inibição da aderência e

agregação plaquetária, inibição da quimiotaxia de neutrófilos, e transdução de sinal no sistema nervoso central e periférico (Ignarro, 1991; Moncada *et al.*, 1991; Dusting, 1995).

Os efeitos citotóxicos do NO envolvem a inibição de enzimas mitocondriais chaves, incluindo NADH oxireductase, NADH succinato oxireductase e aconitase (Nathan, 1992), inibição da atividade das enzimas do citocromo P-450 (Khatsenko *et al.*, 1993). Muitas condições inflamatórias são associadas com a produção em grande quantidade de NO pela NOSi, com consequentes efeitos citotóxicos. A expressão desta enzima é em resposta a estímulos imunológicos. O NO pode agir como molécula citotóxica e citostática para fungos, bactérias, helmintos, e organismos protozoários, tão bem quanto para células tumorais (Nathan, 1992).

A geração simultânea de NO e  $O_2^{\bullet-}$  favorece a produção de um produto tóxico o ânion peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Beckman *et al.*, 1990) e este produto pode ser o responsável por alguns dos efeitos tóxicos associados com a produção do NO. O  $ONOO^-$  pode danificar ou depletar um número de componentes vitais, causando dano no DNA (King *et al.*, 1992), promovendo a peroxidação lipídica (Radi *et al.*, 1991) e a incapacidade antioxidante em sistemas biológicos (Van der Vliet *et al.*, 1994). De fato, estudos recentes têm demonstrado que o  $ONOO^-$ , pode ser a última espécie reativa e não o NO em muitas condições (Castro *et al.*, 1994; Szabó *et al.*, 1996).

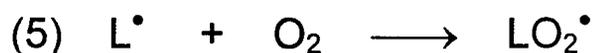
## PRINCIPAIS ALVOS BIOLÓGICOS DAS EROs

As EROs, geradas através de processos fisiológicos ou não, podem danificar diversas macromoléculas nos sistemas biológicos, devido à sua grande instabilidade e consequente reatividade (Halliwell e Gutteridge, 1989).

Um dos processos mais importantes e deletérios promovidos pelos radicais livres é conhecido como peroxidação lipídica. Após a geração do radical  $\text{OH}^\bullet$  pela reação de Fenton, ocorre o processo denominado de iniciação, onde ocorre o ataque do radical ou outras espécies radicalares a ácido graxos poliinsaturados (L) que tenham suficiente reatividade para abstrair um átomo de hidrogênio do carbono da cadeia lateral (Reação 4).

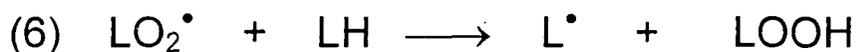


O átomo de hidrogênio tem somente um elétron, sendo que a sua remoção deixa um elétron desemparelhado no átomo de carbono que foi originalmente atacado. Isso resulta mais provavelmente em rearranjos moleculares seguidos pela reação com o oxigênio levando a formação do radical peroxila (Reação 5).



Esse radicais por sua vez, podem combinar-se, ou podem atacar proteínas de membrana, além de serem capazes de abstrair hidrogênios da cadeia lateral de

ácidos graxos adjacentes e deste modo, propagar a reação em cadeia da peroxidação (Esterbauer *et al.*, 1992; Halliwell e Chirico, 1993; Farber, 1994). (Reação 6).



A ocorrência da peroxidação lipídica em membranas biológicas causa danos nas funções da membrana, mudando sua fluidez, inativando receptores de membrana e enzimas e aumentando a permeabilidade a íons como, por exemplo, o cálcio (Halliwell e Chirico, 1993). Existem evidências demonstrando que os aldeídos gerados no processo de peroxidação lipídica, estão envolvidos em diversos processos patológicos associados ao estresse oxidativo em células e tecidos (Gutteridge, 1995). Em contraste com os radicais livres, estes aldeídos são geralmente estáveis e podem atacar alvos distantes do sítio de produção destes radicais (Uchida *et al.*, 1999). Um exemplo destes derivados é o 4-hidroxi-2-nonenal, que está implicado na indução da proliferação, apoptose e ativação de vias de sinalização celular (Parola *et al.*, 1999; Uchida *et al.*, 1999). Outros produtos gerados na peroxidação lipídica como o ácido hidroperoxi-6,8,11,14-eicosatetraenóico, metillinolenato hidroperóxido e metillinolenato autooxidado, causam danos e quebras no DNA e podem estar implicados no processo de envelhecimento e indução de tumores (Inouye, 1984; Ueda *et al.*, 1985; Weitberg e Corvese, 1989).

Outro alvo bastante importante das EROs é o DNA, uma vez que lesões produzidas a uma pequena porcentagem dessa molécula podem trazer conseqüências maiores do que em outros componentes celulares (Schraufstatter *et al.*, 1988).

Nem o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , nem o  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , reagem com o DNA sob condições fisiológicas, a menos que íons metálicos estejam presentes para permitir a formação do  $\text{OH}^\bullet$  (Blakeky *et al.*, 1990). O  $\text{OH}^\bullet$  tem capacidade de retirar átomos de hidrogênio da desoxirribose, levando à formação de radicais derivados do açúcar que, se não reparados, levam à clivagem do esqueleto açúcar-fosfato do DNA e liberação de bases nitrogenadas do DNA (produzindo sítios apurínicos/apirimidínicos) (Halliwell e Aruoma, 1991; Breen e Murphy, 1995).

Os níveis elevados de EROs no organismo parecem ser um dos maiores contribuintes para o envelhecimento (Harman, 1992) e para muitos processos degenerativos como o câncer, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, catarata, e outros (Halliwell e Gutteridge, 1990; Gutteridge, 1994; Spector, 1995). Para o desenvolvimento da aterosclerose, com conseqüente surgimento de doença coronária, a peroxidação lipídica aparece como um importante contribuinte (Jialal e Devaraj, 1996). O envelhecimento pode ser o resultado de danos aleatórios produzidos pelos radicais aos tecidos produzidos durante o metabolismo aeróbico normal (Halliwell e Gutteridge 1989). Com relação ao câncer, sabe-se que as espécies radicais podem induzir alterações permanentes na sequência do DNA, que podem resultar na ativação de proto-oncogenes ou inativação de genes supressores de tumor (Hsie *et al.*, 1986; Cerutti, 1991).

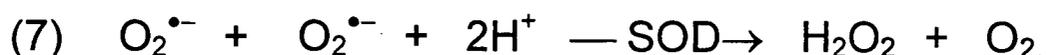
## SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO E NÃO ENZIMÁTICO DE PROTEÇÃO CONTRA OS RADICAIS LIVRES.

Para evitar a formação assim como reparar os danos oxidativos em tecidos e macromoléculas, todos os organismos de vida aeróbica possuem um complexo sistema de defesas antioxidantes.

Entre estas defesas estão as que fazem parte do processo enzimático Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GSH) e a catalase (CAT); e as pequenas moléculas, muitas delas derivadas da dieta como a vitamina C ou ácido ascórbico (VC), vitamina E ou alfa-tocoferol (VE), carotenóides e flavonóides antioxidantes não enzimáticos. (Ames *et al.*, 1993). O balanço entre as atividades e os níveis desses antioxidantes é essencial para a sobrevivência dos organismos e sua homeostase (Matés; 1999).

### *Superóxido Dismutase (SOD).*

É uma enzima antioxidante que cataliza a dismutação de uma espécie radicalar, o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), em uma espécie menos reativa, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Reação 7), que posteriormente pode ser destruído pela Catalase ou Glutathione Peroxidase (Fridovich, 1995; Sandalio *et al.*, 1997; Teixeira *et al.*, 1998).



Em humanos a SOD existe em três formas a citosólica (SOD-Cu/Zn), a mitocondrial SOD-Mn, e uma isoforma extracelular SOD (EC-SOD) (Sansdstróm *et al.*, 1994; Sun *et al.*, 1995). A SOD destrói o  $O_2^{\bullet-}$  por sucessiva reação de oxidação e

redução do íon metálico de transição no sítio ativo da enzima em um tipo de mecanismo *Ping-Pong* com altas taxas de reação (Meier *et al.*, 1998) (fig. 2).

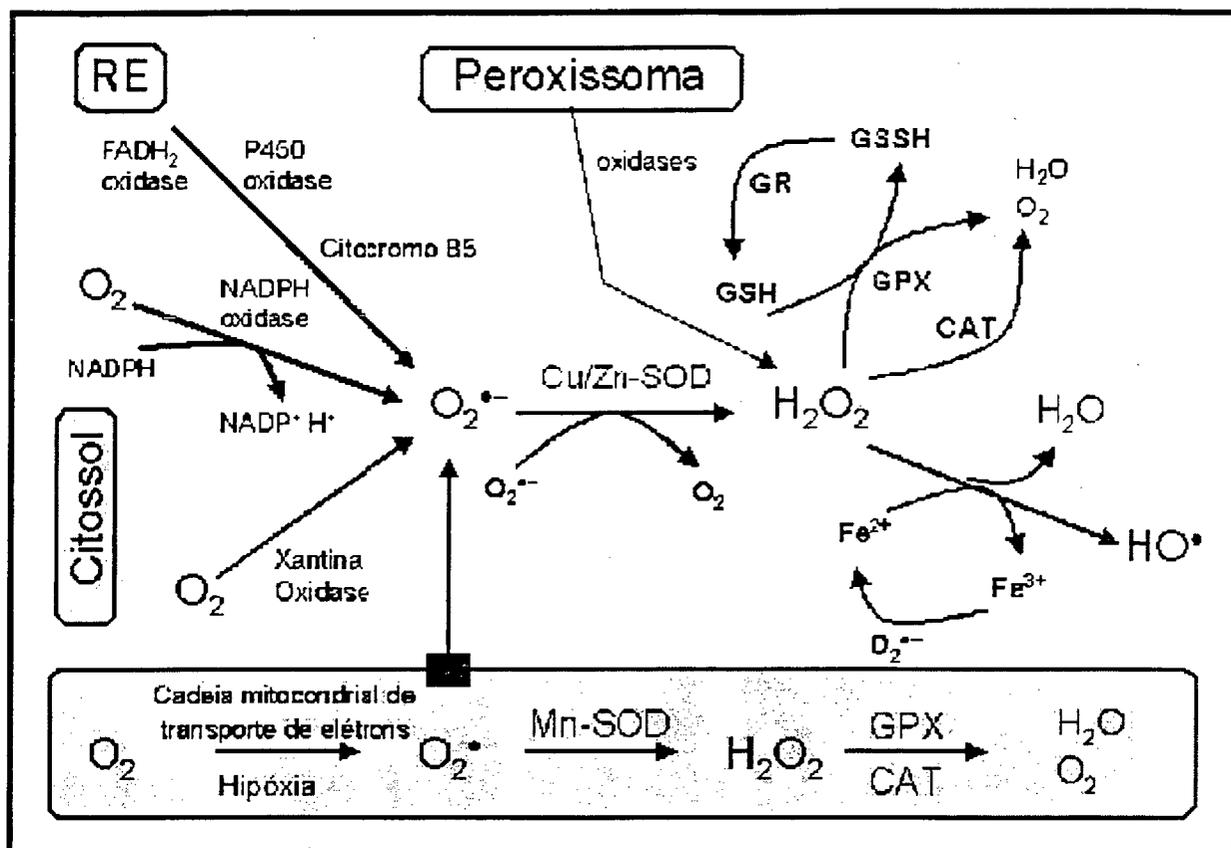
SOD-Mn é um homotetrâmero (96 KDa) contendo um átomo de manganês por subunidade (MacMillan-Crow *et al.*, 1993). Está localizada na matriz mitocondrial e inativa principalmente o  $O_2^{\bullet-}$  proveniente da cadeia respiratória da mitocôndria (Halliwell e Gutteridge, 1989). O *knock-out* desta enzima em camundongos é letal e leva principalmente à uma cardiomiopatia e aumento da sensibilidade ao oxigênio. SOD-Mn é induzida por citocinas, TNF, mas é moderadamente influenciada por agentes oxidantes (Stralin e MarKlund, 1994; Li *et al.*, 1995).

SOD-Cu/Zn e a SOD-EC são outras enzimas conservadas através da evolução, a Cu/Zn, está localizada no citosol e possui em seu sítio ativo dois átomos metálicos Cu e Zn, ligados por um resíduo de histidina (Battistoni *et al.*, 1996; Stroppolo *et al.*, 1998) enquanto a SOD-EC, é secretada e encontrada no espaço intersticial, tendo grande afinidade por certos glicosaminoglicanos, como a heparina, é relacionada com a maioria dos efeitos da atividade de SOD no plasma, na linfa e no líquido sinovial (Marklund, 1980; Sandström *et al.*, 1994). As duas também catalizam a redução do  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$ .

### *Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPX)*

CAT é uma enzima tetramérica consistindo de 4 unidades idênticas que contém um simples grupo ferroprotoporfirina por subunidade (Leah *et al.*, 1998). A GPX, possui quatro subunidades idênticas contendo um átomo de selênio em seu centro ativo (Tappel, 1978). Existem 5 tipos de GPX, distribuídas em diferentes regiões celulares, e variando sua expressão em diferentes tecidos (Matés *et al.*, 1999). As

duas enzimas reagem muito eficientemente com  $\text{H}_2\text{O}_2$  para formar  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ , protegendo as células do  $\text{H}_2\text{O}_2$  (fig. 2).



**Figura 2** – Adaptado de Mátés, 1999 – Geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), e mecanismo de defesa enzimático contra o dano provocados pelos EROs. Durante um período de hipoxia, o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  gerado pode ser degradado dentro da mitocôndria pela Mn-SOD ou, se está presente no citosol, pela Cu/Zn-SOD. No reticulo endoplasmático (RE), a NADPH oxidase pode doar elétrons para o  $\text{O}_2$  e gerar  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . O  $\text{FADH}_2$  e o citocromo b5 também podem contribuir neste sistema. Dentro dos peroxissomas, há enzimas que produzem  $\text{H}_2\text{O}_2$  sem a intermediação do  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Contrariamente ao  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  é capaz de atravessar membranas e dentro das células reage com  $\text{Fe}^{2+}$  para formar radicais  $\text{OH}^{\bullet}$  via reação de Fenton. A glutaciona peroxidase (GPX) e catalase (CAT), catalizam a remoção do  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A glutaciona oxidada (GSSH) é reduzida a glutaciona (GSH) pela glutaciona redutase (GR), que é utilizada novamente na reação.

A GPX, também cataliza a redução de hidroperóxidos, usando Glutaciona (GSH), protegendo as células contra o dano oxidativo. A GSH é o tiol não protéico mais importante presente em células animais (Kozumbo e Cerutti, 1986). Este tiol

atua, entre outras funções, como um redutor no metabolismo de vários peróxidos e radicais livres, e como um sequestrador (Jernström *et al.*, 1993; Ji, 1995). A GSH pode também inibir a peroxidação lipídica (Mosialou e Morgensten, 1989), sendo o metabolismo da glutathione um dos mais essenciais mecanismos de defesa antioxidante (Rikans e Hornbrook, 1997; Grazioli *et al.*, 1998).

VE ou  $\alpha$ -tocoferol é o principal antioxidante lipossolúvel biológico *in vitro* e *in vivo* (Packer e Landvick, 1989 e Burton e Traber, 1990). Acredita-se que a principal função biológica deste composto é sua alta reatividade com os radicais peroxil (Sies *et al.*, 1992). Ligado a sua estrutura hidrofóbica, existe um grupamento -OH em que seu hidrogênio pode ser facilmente abstraído por estes radicais. Após esta abstração, o  $\alpha$ -tocoferol se transforma em um novo radical, só que fracamente reativo, e incapaz de atacar novas estruturas lipídicas, impedindo a propagação de reações em cadeia (Wefers e Sies, 1988; Esterbauer *et al.*, 1989). Este composto protege então as membranas celulares contra a peroxidação lipídica, evitando a ocorrência de danos pelos radicais livres, incluindo aqueles originados na membrana interior mitocondrial (Ji, 1995). Apresenta também uma eficiente proteção contra os radicais OH<sup>\*</sup> (Ames *et al.*, 1993).

A VC é o antioxidante de baixo peso molecular mais efetivo presente no fluido extracelular, apresentando capacidade de sequestrar rapidamente os radicais livres de oxigênio *in vitro* e *in vivo* (Niki, 1990), além de suprimir a oxidação. Devido a sua eficiência em sequestrar os radicais peroxil na fase aquosa antes que ele inicie a peroxidação lipídica das membranas e lipoproteínas (Niki, 1991).

Geralmente, os carotenóides têm a função de antioxidantes apenas sob baixa concentração de oxigênio (Burton e Ingold, 1984). Estas moléculas podem proteger as células de danos oxidativos por sequestrar os radicais livres capazes de causar

dano celular. Tanto *in vivo* como *in vitro*, o  $\beta$ -caroteno protege as membranas de lipídios da peroxidação (Bendich e Olson, 1989).

Acredita-se que muitos antioxidantes podem ter efeitos sinérgicos. Palozza e Krinsky (1992) mostraram que o B-caroteno e a VE podem agir em conjunto nas membranas no sequestro de radicais livres. As VC e VE podem também agir sinergicamente no processo de peroxidação lipídica (Mirvish, 1986).

Além de estudos com antioxidantes clássicos, é crescente o número de investigações referentes a antioxidantes naturais presentes na dieta (Vinson *et al.*, 1995; Wiseman *et al.*, 1996; Robinson *et al.*, 1997). É conhecido na literatura que dieta rica em alimentos e preparações de origem vegetal, tais como chás, frutas, verduras, legumes e vinho tinto protegem contra doenças cardiovasculares e algumas formas de câncer (Larson, 1988; Abu-Amsa *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996; Moran *et al.*, 1997). Estes efeitos protetores têm sido atribuídos, em grande parte, a presença de antioxidantes tais como vitamina C e E, carotenóides e compostos fenólicos como, por exemplo, flavonóides e ácidos fenólicos presentes em abundância nas plantas. Os compostos fenólicos provavelmente constituem o maior grupo de metabólitos secundários das plantas. (Rice-Evans *et al.*, 1996).

O efeito antioxidante dos compostos fenólicos em sistemas biológicos pode ser atribuído tanto a sua capacidade de sequestrar EROs como a de quelar íons metálicos, impedindo a oxidação de biomoléculas (Starvic, 1994).

Os flavonóides são compostos fenólicos, derivados biossinteticamente da chalcona e amplamente distribuídos no reino vegetal. Frequentemente são encontrados em flores, frutos e, algumas vezes, nas folhas constituindo-se nos pigmentos responsáveis pela coloração destes órgãos vegetais. Além disso, estão presentes universalmente nas cutículas e células epiteliais das folhas, garantindo

assim a proteção dos tecidos contra os efeitos nocivos da radiação ultravioleta (Middleton *et al.*, 2000).

Aos compostos fenólicos atribuí-se além do potencial antioxidante, muitas outras atividades biológicas e de interesse humano, que podem ser resultado de sua atividade antioxidante, como antiinflamatória, antiviral, antígenotóxica, diurética, antiesclerótica e antiedematosa, anticarcinogênica, espasmolítica, antihepatotóxica, colerética, estrógena, entre outras (Stich, 1991; Bruneton, 1993; Rice-Evans, 1996; Benavente-García, 1997).

Além desse mecanismo fisiológico, existem algumas situações patológicas onde são geradas EROs. O processo inflamatório, por exemplo, realizado pelas células de defesa do organismo, produz EROs que são utilizadas para destruir os microorganismos causadores da infecção (Yamashina *et al.*, 1986; Ischiropoulos *et al.*, 1992).

## **PROCESSO INFLAMATÓRIO.**

A inflamação é um mecanismo de defesa do organismo, que envolve uma série de eventos que são iniciados por uma série de estímulos, agentes infecciosos, isquemia, interação antígeno-anticorpo, lesão física ou térmica (Rocha e Silva, 1978; Scott *et al.*, 1994). A nível macroscópico, a reação inflamatória é acompanhada de sinais bem distintos, como eritema, hiperalgesia, edema e aumento da temperatura no local da lesão.

A resposta inflamatória, ocorre em três fases distintas, cada uma delas aparentemente mediada por fatores distintos. Na primeira fase, ocorre um aumento do fluxo sanguíneo, na área lesada, devido a dilatação dos capilares, sendo responsável

pelo eritema da área comprometida. Vários mediadores são liberados neste estágio, entre os quais podemos citar as cininas, histamina, serotonina (5-HT), fator de agregação plaquetária (PAF), proteínas do sistema complemento, produtos da via do ácido araquidônico (AA), como leucotrienos (LTs), prostaglandinas (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>), substâncias liberadas localmente nas terminações nervosas (taquicinas e o peptídeo relacionados com o gene da calcitonina - CGRP (Hua, 1986; Haanen e Vermes, 1995; Ichikawa *et al.*, 1996, Schuiling *et al.*, 1999).

A segunda fase da resposta inflamatória é caracterizada pela migração de leucócitos e de outras células fagocíticas para o sítio da lesão.

A liberação de mediadores pró-inflamatórios (quimiotáticos e vasoativos), citocinas, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), ácido 5-hidroperóxido-eicosatetraenóico (5-HETE), cininas, fibrino-peptídeos, peptídeos liberados pelos neutrófilos e o leucotrieno B<sub>4</sub> - LTB<sub>4</sub>, como consequência do dano tecidual, induz a rápidas mudanças nas propriedades adesivas das células endoteliais (Fontone, 1985; Beutler e Cerami, 1986; Haanen e Vermes, 1995). Os leucócitos, que antes circulavam na luz do vaso, passam agora a ser detectados nas proximidades da parede do vaso, processo denominado marginação leucocitária (Bevilacqua, 1983). Imediatamente após estas mudanças, inicia-se o processo de rolamento (*rolling*), onde os leucócitos fazem ligação fraca com a superfície das células endoteliais, principalmente mediadas por moléculas de adesão denominadas selectinas. As L-selectinas expressas em muitos leucócitos interagem com as E-selectinas e P-selectinas expressas no endotélio vascular (Diáz-González e Sánchez-Madrid, 1998). Em um segundo momento ocorre um aumento da afinidade e adesão molecular entre a superfície dos leucócitos e as células endoteliais pela expressão de outras moléculas de adesão nos leucócitos, VLA-4 (*very late activation antigen 4*), Mac-1 e

LFA-1 (*leukocyte function-associated molecule 1*). Estas integrinas ativadas interagem com seus receptores no endotélio vascular VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) para o VLA-4 e ICAM-1 (*intercelular adhesion molecule 1*) para Mac-1 e LFA-1. Esta interação é um evento chave que resulta na adesão firme dos leucócitos na superfície do vaso. Finalmente, os leucócitos migram para os tecidos por entre as células do endotélio vascular, e migram para o foco inflamatório. Cada um destes eventos adesivos é absolutamente essencial para o processo de migração leucocitária. Se um destes eventos não ocorre, a migração não acontece (Butcher, 1991; Springer, 1994; Walchec *et al.*, 1996; Allport *et al.*, 1996)

Após migrarem para o sítio inflamatório, estes leucócitos (polimorfo ou mono nucleares) são ativados e passam a sintetizar e liberar produtos da via do AA e citocinas além de outros mediadores (Wolfe e Horrocks, 1994).

Na terceira fase, ocorre a dor e a lesão tecidual. A dor associada nesta reação se deve a estimulação de fibras sensoriais nociceptivas por mediadores químicos tais como bradicinina, histamina, prostaglandinas, substância P, neurocinina A e peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP) (Dray e Bevam, 1993; Dray e Perkins, 1993; Geppetti, 1993). A transdução da dor envolve interações de mediadores, com os receptores de membrana que são acoplados a canais iônicos ou sistemas de segundo mensageiro, resultando na mudança da excitabilidade da membrana celular. A resposta dolorosa induzida por estes mediadores é potencializada por produtos da via do AA (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) e por aminas simpatomiméticas, possivelmente a dopamina liberada localmente. A produção de hiperalgesia também deve ser vista como um importante mecanismo que contribui para a regeneração e reparo tecidual (Dray *et al.*, 1994). Além disso, outros mediadores são liberados no sítio inflamatório, entre eles as citocinas, as Interleucinas (IL) do tipo IL-1, IL-6 e IL-8, o fator de necrose

tumoral (TNF) e o interferon (IFN). Estes mediadores, exceto a IL-8, medeiam a resposta febril através da indução da síntese de PGE<sub>2</sub> em áreas específicas do hipotálamo (Dinarello *et al.*, 1988, 1991).

## ESPÉCIES REATIVAS NA INFLAMAÇÃO

Durante os anos 80, o interesse sobre as EROs e ERNs, cresceu rapidamente a partir de evidências que mostravam que estes radicais livres, estavam relacionados com doenças inflamatórias como, artrite reumatóide, enfisema pulmonar, aterosclerose e doenças neurodegenerativas (Winyard e Blake, 1997)

Estes radicais foram estudados dentro do conceito direto de seus efeitos destrutivos em meios biológicos. Isto é verdadeiro ao passo de que altas concentrações destes radicais (EROs e ERNs), tem uma relação particular com o dano a biomoléculas como o DNA (Williams, 1985; Wiseman na Halliwell, 1986). No entanto, evidências recentes têm demonstrado que estes radicais têm um papel fisiológico importante, como mensageiros celulares a baixas concentrações. (Saran and Bors, 1989; Snyder, 1995).

Várias são as fontes de EROs na inflamação. Os maiores produtores de EROs no tecido inflamatório são os leucócitos sanguíneos, que tornam-se ativados e aderem a superfície das células endoteliais. Estudos com suspensões destas células *in vitro*, quando ativadas por éster de forbol, liberam entre 35-360 nmol de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>/hora (Tauber *et al.*, 1993; Lum *et al.*, 1994). A NADPH oxidase, de leucócitos polimorfonucleares, contém citocromo b<sub>245</sub> e cataliza a redução monovalente do O<sub>2</sub> para gerar o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Forman e Thomas, 1986; Segai, 1991), outras células inflamatórias como linfócitos e macrófagos possuem uma NADPH oxidase na membrana (Hancock

*et al.*, 1989). A cascata do AA, que gera prostaglandinas e leucotrienos, gera EROs no processo do metabolismo de seus produtos (Cadenas, 1989). Durante o exercício nas articulações inflamadas a pressão intra-articular é transmitida diretamente para a vasculatura da membrana sinovial, produzindo oclusão dos capilares sinoviais superficiais e consequente isquemia. A reperfusão da membrana sinovial ocorre quando o exercício cessa e, conseqüentemente, leva à geração de EROs pelo sistema xantina oxidase (Merry *et al.*, 1989).

O íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), geralmente não está presente em condições fisiológicas (*in vivo*), e não se acreditava que este íon, pudesse ser gerado em concentrações suficientes para catalisar a formação de  $\text{OH}^\bullet$  em condições inflamatórias. No entanto com medidas químicas sensíveis foi relatado que a concentração de ferro livre no líquido sinovial de joelhos inflamados, pode catalizar a Reação de Fenton e gerar grandes quantidades de EROs (Cuzzocrea *et al.*, 2001).

IL-1 e TNF- $\alpha$ , dois mediadores importantes do processo inflamatório, são capazes de induzir a produção de EROs, perpetuando assim sua formação e ação (Adamson e Billings, 1992; Goucherot-Pocidaló e Reviliard, 1993; Lo *et al.*, 1998)

A ativação de células endoteliais também gera EROs e contribui significativamente para a manutenção de um ambiente oxidante no sítio inflamatório. O tratamento de células endoteliais da veia umbilical humana com IL-1, IFN- $\gamma$ , resulta em um aumento dependente da dose e do tempo da produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Matsubara e Ziff, 1986). Peptídeos vasoativos como a bradicinina induzem a produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , após 5 minutos de sua ligação com seu receptor em células endoteliais (Holland *et al.*, 1990).

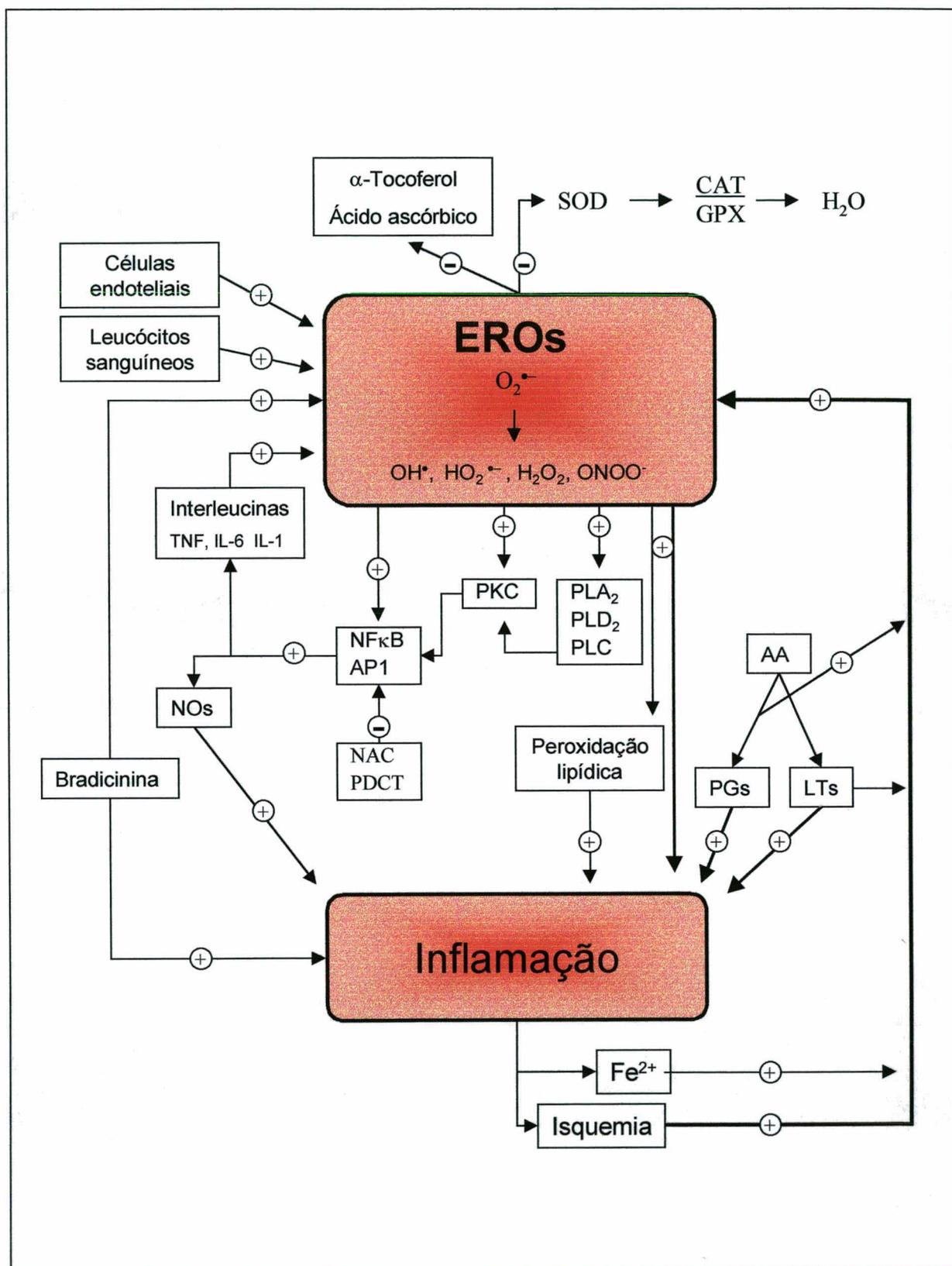
Vários são os efeitos das EROs no processo inflamatório. Uma característica chave das doenças inflamatórias, como artrite reumatóide, é o aumento da expressão

de certos genes que codificam proteínas (como citocinas) e proteínases envolvidas na destruição celular. Uma importante característica da expressão gênica é o controle da transcrição por proteínas específicas, os fatores de transcrição (McKay, 1994). Dois fatores de transcrição, AP-1 e NF- $\kappa$ B, são influenciados pelo estado redox (Blake, 1994). Os genes alvos para o NF- $\kappa$ B compreendem uma lista crescente de genes intrinsecamente ligados a coordenação da resposta inflamatória e, dentre eles destacamos: TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, NOSi, selectinas E, VCAM-1, entre outros (Baeuerle and Henkel, 1994). Tem sido demonstrado que EROs podem induzir a atividade do NF- $\kappa$ B em células T humanas (Schreck *et al.*, 1991). Um mecanismo proposto para esta ativação do NF- $\kappa$ B pelas EROs é que estas controlam a fosforilação do I $\kappa$ B, já que o NF- $\kappa$ B, se encontra na forma de complexo NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B, e sua ativação depende da sua dissociação de seu inibidor o I $\kappa$ B (Traenckner *et al.*, 1994). O mecanismo em que esta fosforilação ocorre não está completamente entendido, no entanto as EROs tem demonstrado ativar PKC, capaz de catalisar a fosforilação do I $\kappa$ B em preparações semi-purificadas contendo o complexo NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B (Ghosh and Baltimore, 1990).

Um outro mecanismo para ativação da PKC envolve a direta modificação oxidativa de um domínio regulatório, resultando na sua atividade independente de cálcio e fosfolipídeos (Gopalakrishna e Anderson, 1989), ou um mecanismo secundário pela ativação de fosfolipases (PLC, PLD e PLA<sub>2</sub>). Foi demonstrado que, em células endoteliais, as EROs ativam PLC e PLA<sub>2</sub>, gerando assim mediadores e cofatores que são potentes ativadores da PKC (Taher *et al.*, 1993; Natarajan, 1995; Liu, 1996). Vários autores tem postulado que a ativação do NF- $\kappa$ B por EROs seja um dos eventos iniciais na indução de reações inflamatórias (Kaltschimidt *et al.*, 1994).

A expressão de IL-8 é up-regulada em células Hep-G2 e, em células epiteliais gástricas, MKN28 por *stress* oxidativo (Deforge *et al.*, 1993; Shimada *et al.*, 1999). Tem sido proposta que a expressão de moléculas de adesão é regulada por eventos sensíveis ao balanço redox. A expressão de E-selectinas, ICAM-1 e VCAM-1 parece em parte ser controlada pela ação de citocinas como o TNF- $\alpha$  e IL-1 e pela ativação por EROs do NF- $\kappa$ B (Pober e Cotram, 1990; Gosh, 1998). Foi demonstrado que células endoteliais de veias umbilicais humanas, tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aumentam a expressão de selectinas P por mais de 3 h (Patel *et al.*, 1991).

Durante o estresse oxidativo, tem se observado a estimulação da produção e liberação de fator ativador de plaquetas (PAF) em células endoteliais (Lewis *et al.*, 1994). O LTB<sub>4</sub> também tem demonstrado aumentar a produção de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Needleman *et al.*, 1986). Um esquema simplificado do processo pode ser visualizado na página



Esquema 1 – Resumo da participação dos EROs, no processo inflamatório.

Vários antioxidantes tem demonstrado modular o processo inflamatório, N-acetilcisteína (NAC) e pirrolidina ditiocarbamato (PDCT), tem demonstrado suprimir a produção de EROs, induzida por  $\text{TNF-}\alpha$  e IL-1 (Rahman *et al.*, 1999), A NAC, também demonstrou bloquear a ativação do  $\text{NF}\kappa\text{B}$  induzido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Schreck *et al.*, 1991), outros antioxidantes como dietil ditiocarbamato, 2-mercaptoetanol,  $\alpha$ -fenantrolina,  $\alpha$ -tocoferol e desferrioxamina também são capazes de inibir a ativação do  $\text{NF}\kappa\text{B}$  (Schreck *et al.*, 1992). A glutatona, outro importante antioxidante, tem mostrado inibir a fosforilação do  $\text{I}\kappa\text{B}$  (Cho *et al.*, 1998). Probucol e outros antioxidantes demonstraram uma *downregulation*, da expressão de selectinas-E, em células do endotélio vascular (Kaneko, *et al.*, 1996).

Flavonóides de origem vegetal como a quercetina tem demonstrado inibir a produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , por neutrófilos humanos, sua degranulação e geração de  $\text{OH}^\bullet$  (Fantone e Hart *et al.*, 1990), a flavona-3-hidroxifarrerol inibiu o burst respiratório em neutrófilos humanos ativados por f-MLP (Ursini *et al.*, 1994), muitos destes compostos tem demonstrado atividade de sequestrar EROs e inibidoras da peroxidação lipídica no processo inflamatório.

Seguindo a indicação popular do uso da *Croton celtidifolius*, resolvemos então analisar através de ensaios farmacológicos clássicos, a possível atividade antiinflamatória e analgésica, e devido ao seu perfil químico, determinar se os compostos presentes na planta poderiam modular parâmetros oxidativos do processo inflamatório

# OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos analgésicos, antiinflamatório e antioxidante da *Croton celtidifolius*, através de ensaios farmacológicos e bioquímicos *in vivo* e *in vitro*.

1. Avaliar a atividade antioxidante do extrato bruto, frações, sub-frações e compostos isolados da *Croton celtidifolius* em relação as suas capacidades de sequestrar radicais hidroxila, ânion superóxido e de redução da peroxidação lipídica em testes *in vitro*.
2. Investigar o possível efeito antinociceptivo da *Croton celtidifolius* no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e no teste de formalina.
3. Avaliar o efeito do extrato bruto, frações, sub-frações e compostos isolados no teste do edema de pata induzido pela carragenina.
4. Avaliar um possível efeito vasoconstritor da fração que demonstrou melhor atividade antiedematogênica.
5. Avaliar a atividade da fração, suas sub-frações e compostos isolados, que apresentaram atividade antiedematogênica na pleurisia induzida pela carragenina em ratos.

6. Determinar a produção de radicais ânion superóxido de células isoladas da cavidade pleural de ratos tratados e não tratados submetidos a pleurisia.
7. Determinar o índice de peroxidação lipídica, a atividade da enzima superóxido dismutase e o índice de danos no DNA, nas células isoladas da cavidade pleural de ratos tratados e não tratados submetidos a pleurisia.
8. Determinar os níveis de nitrito/nitrato no exudato da cavidade pleural de ratos tratados e não tratados submetidos a pleurisia.

# MATERIAL E MÉTODOS

## 3.1. ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados camundongos Suíços machos (20 - 30g) e ratos Wistar (180 – 250 g) fornecidos pelo Biotério Central da UFSC. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, CCB - UFSC, em temperatura controlada de  $22 \pm 2$  °C, em ciclo claro/escuro de 12 h, com acesso à água e ração *ad libitum*. Os animais foram aclimatados no laboratório durante um período de 24 h. Os experimentos foram realizados entre 8 e 18 h e conduzidos de acordo com orientações para os cuidados com os animais de laboratório.

## 3.2. MATERIAL BOTÂNICO

Cascas de *Croton celtidifolius* Baill foram coletadas em março de 2000, na cidade de Orleães, Santa Catarina e a espécie foi identificada pelo Professor Daniel de Barcelos Falkenberg no Departamento de Botânica, UFSC, onde encontra-se depositada uma excicata sob número de voucher, FLOR 31272.

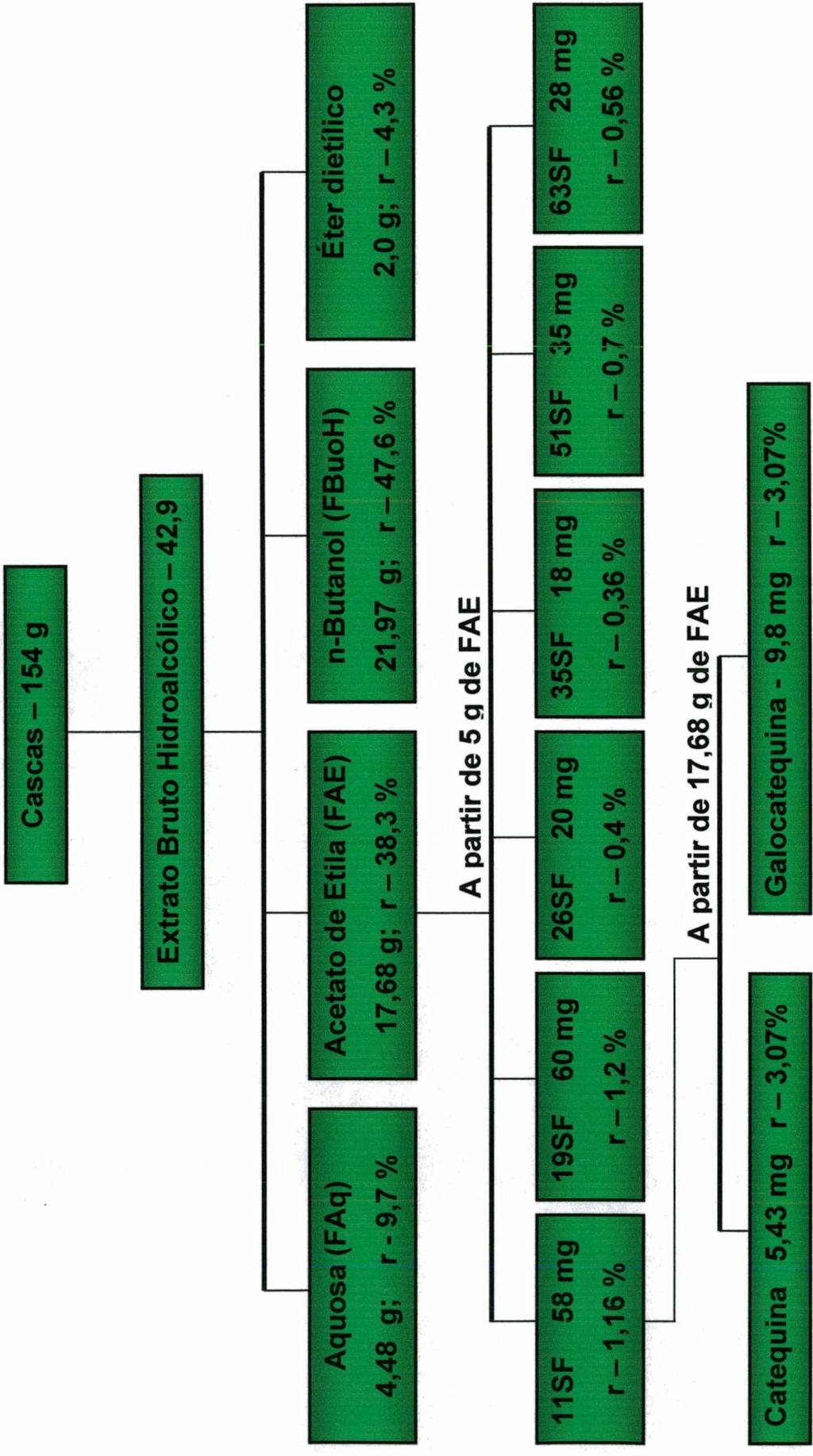
### 3.2.1. EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO.

A coleta do material botânico, extração e isolamento dos compostos das cascas da *Croton celtidifolius*, foram realizados no laboratório de Produtos Naturais do Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti no Departamento de Química da UFSC.

As cascas (154 g) da *Croton celtidifolius*, secas sob ventilação, cortadas em pequenos pedaços e maceradas com etanol 80 % EtOH (3 x) a temperatura ambiente. O extrato foi filtrado e o solvente evaporado sob vácuo rendendo 42.9 g de extrato bruto hidroalcoólico (EB). Uma suspensão aquosa deste extrato foi sucessivamente particionada com éter dietílico, acetato de etila e n-butanol, resultando em 2.0 g da fração éter dietílico, 17.68 g da fração acetato de etila (FAE); 21,97 g da fração n-butanol (FBuOH) e 4,48 g da fração aquosa (FAq).

Foi realizada a cromatografia da fração éter em sílica gel usando um sistema gradiente de solvente de hexano a acetato de etila, de onde se obteve três frações (A, B e C). As frações A e B foram analisadas por HRCG-MS mostrando hidrocarbonetos, ésteres, ácidos graxos,  $\alpha$ -tocoferol e esteróis. Da recristalização da fração C produziu cristais incolores (52 mg), com ponto de fusão de 130 °C, que foram identificados como sendo  $\beta$ -sitosterol.

A FAE (9.0 g) foi submetida à cromatografia em coluna aberta de sílica gel inativada com 20% de água, usando como eluente hexano/acetato de etila (4:1) e aumentando a polaridade pela adição gradual de acetato de etila e metanol. Após análise por cromatografia em camada fina, foram obtidas 6 sub-frações denominadas de 11SF, 19SF, 26SF, 35SF, 51SF e 63SF, conforme o esquema da fig. 3.



**Figura 3** – Representação do esquema de fracionamento e isolamento da Frações, Sub-Frações e compostos isolados e seus respectivos rendimentos da *Croton celtidifolius*. *r* – representa o rendimento.

As análises químicas e espectroscópicas preliminares revelaram a presença de:

- 19SF: catequina, galocatequina, proantocianidina I e II
- 26SF e 35SF: galocatequina, proantocianidina I e II e dois compostos não identificados.
- 51SF: mistura de proantocianidinas, não determinadas.
- 63SF: proantocianidinas, não determinadas.

A sub-fração 11SF foi purificada por cromatografia "flash" usando eluição isocrática de hexano 40%/AtOAc 59%/AcOH 1% onde, obteve-se os compostos 1 (54,3 mg) e 2 (9,8 mg).

Composto 1 - *Catequina* Amorfa, ponto de fusão. 143-144 °C,  $M^+$  290, IV  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3382, 1612, 1518, 1464.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $(\text{CD})_3\text{CO}$ ):  $\delta$  6.90 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2'), 6.79 (1H, dd,  $J = 1.8, 8.2$  Hz, H-6'), 6.75 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-5'), 6.05 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-6), 5.91 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-8), 4.60 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz, H-2), 4.08 (1H, m, H-3), 2.94 (1H, dd,  $J = 5.4, 16.0$  Hz, H-4), 2.56 (1H, dd,  $J = 8.4, 16.0$  Hz, H-4).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $(\text{CD})_3\text{CO}$ ):  $\delta$  28.61 (C-4), 68.29 (C-3), 82.48 (C-2), 95.37 (C-8), 96.09 (C-6), 100.52 (C-10), 115.16 (C-2'), 115.68 (C-5'), 120.02 (C-6'), 131.96 (C-1'), 145.55 (C-3', C-4'), 156.75 (C-5), 157.10 (C-7), 157.56 (C-9).

Composto 2 - *Galocatequina*. Amorfa, ponto de fusão. 167-170 °C,  $M^+$  306, IV  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3374, 1626, 1520, 1462, 1352.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $(\text{CD})_3\text{CO}$ ):  $\delta$  6.45 (2H, s, H-2', H-6'), 6.02 (1H, d,  $J = 1.9$  Hz, H-6), 5.85 (1H, d,  $J = 1.9$  Hz, H-8), 4.50 (1H, d,  $J = 7.4$  Hz, H-2), 3.97 (1H, m, H-3), 2.88 (1H, dd,  $J = 5.3, 16.0$  Hz, H-4), 2.51 (1H, dd,  $J = 8.2, 16.0$  Hz, H-4).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $(\text{CD})_3\text{CO}$ ):  $\delta$  28.44 (C-4), 68.31 (C-3), 82.76 (C-2), 95.41 (C-8), 96.07 (C-6), 100.55 (C-10), 107.20 (C-2', C-6'), 131.52 (C-4'), 146.36 (C-3', C-5'), 156.88 (C-5), 157.21 (C-7), 157.70 (C-9).

A identificação das substâncias foi feita por espectroscopia de massa, infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear ( $^1\text{H}$  RMN), ( $^{13}\text{C}$  RMN), de acordo com os dados espectrais publicados previamente por Agrawal (1989).

### 3. 3. DROGAS E REAGENTES

O EB, a FAE, a FBUOH, a FAq, a Fração Éter dietílico; as sub-frações 19SF, 26SF, 35SF, 51SF, 63SF e os compostos isolados catequina e galocatequina foram todos fornecidos pelo Laboratório de Produtos Naturais do Professor Moacir Geraldo Pizzolati, UFSC.

- ácido nitrilo acético (NTA), ácido tiobarbitúrico (TBA), nicotinamida adenina dinucleotideo reduzida (NADH), nitro blue tetrazolium (NBT), carragenina, citocromo C, indometacina, salina tamponada (PBS), desoxirribose, superóxido Dismutase (SOD), acetilcolina, lauril sarcosinato de sódio, uretana, dimetil-sulfoxido (DMSO), hidroxitolueno butilado (BHT), brometo de etídio, peróxido t-butila, fenazina-metasulfato, xantina, foram todos adquiridos da Sigma, EUA.
- agarose (NMA - "normal melting agarose") agarose (LMA - "low melting agarose"), PBS livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , tris (GibcoBRL, Escócia)
- cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), cianeto de potássio (KCN), éter, EDTA, tampão fosfato de potássio (Reagen, Brasil),
- May-Greenwald-Giemsa, NaOH, lauril sulfato de sódio, NaCl, formaldeído, (Nuclear, Brasil),
- ácido tricloroacético (TCA) (Aldrich, USA)
- ácido acético (Cinética Química, Brasil);
- triton X-100 (Union Carbide, adquirido da SARDI, Brasil)
- $\text{H}_2\text{O}_2$ , HCl (Quimex, Brasil)
- heparina (Roche, Brasil)

### 3.4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

#### 3.4.1. ENSAIOS BIOQUÍMICOS "IN VITRO".

##### 3.4.1.1. DETERMINAÇÃO DE DANOS OXIDATIVOS SOBRE A DESOXIRRIBOSE.

O sistema gerador de radical  $\text{OH}^\bullet$  utilizado para detecção de danos oxidativos a desoxirribose foi realizado de acordo com Nishida et al. (1991), através do sistema  $\text{Fe}^{3+}$ -NTA (ácido nitrilotriacético) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). A detecção dos produtos de oxidação da desoxirribose foi realizada como descrito em Halliwell e Gutteridge, 1981. Os ensaios foram realizados em triplicatas, em um volume final de 1,2 mL, em tubos de 10 mL. Inicialmente foi realizada uma pré-incubação de 25  $\mu\text{L}$  de solução estoque de  $\text{FeCl}_3$  (25  $\mu\text{M}$ ) com 100  $\mu\text{l}$  da solução estoque de NTA (100  $\mu\text{M}$ ), por 10 min, à temperatura ambiente, para formação do quelato. Posteriormente, foi adicionado seqüencialmente: água (volume necessário para completar 1,2 mL), 150  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato (0,01M, pH 7,4), 100  $\mu\text{L}$  de solução de desoxirribose (2,8 mM) e por último,  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1,4 mM). Os tubos foram incubados por 20 minutos em banho-maria à 37°C. Ao final da incubação, foi realizada a reação com ácido tiobarbitúrico (TBA), onde foi adicionado aos ensaios 1 mL da solução de TBA 1% e 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 2,8%. Os tubos de ensaios foram incubados por mais 15 min à temperatura de 100°C para a formação do pigmento e, ao final do tempo, resfriados imediatamente em banho de gelo. A absorbância dos ensaios foi medida em espectrofotômetro U-2001 (Hitashi, Japão) a 532 nm em temperatura ambiente, contra um branco contendo todos os reagentes, com exceção de desoxirribose.

Nos tubos teste, foram adicionados 120  $\mu\text{L}$ , nas concentrações de 0,1; 1; 10 e 100  $\mu\text{g/mL}$  de uma suspensão do EB, FAE, FBuOH, FAq, 19SF, 26SF, 35SF, 51SF, 63SF, catequina e galocatequina da *Croton celtidifolius*, suspensas em água deionizada por meio de ultrassom, ao meio de reação, antes da adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A absorbância de cada ensaio foi medida contra um branco específico, contendo a mesma concentração dos compostos utilizados no ensaio.

Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  E.P.M das percentagens de degradação da desoxirribose, considerando-se os valores da absorbância dos controles como 100% de oxidação.

#### 3.4.1.2. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE SEQUESTRADORA DO RADICAL ÂNION SUPERÓXIDO

Para avaliar a capacidade sequestradora do radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) foi utilizado o sistema gerador deste radical: fenazina-metasulfato-NADH, segundo Robak e Gryglewski, (1988). O meio de incubação consistiu de fenazina-metasulfato (10  $\mu\text{M}$ ); nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) (78  $\mu\text{M}$ ) e “nitro blue tetrazolium” (NBT) (25  $\mu\text{M}$ ) em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4). Nesse sistema, o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  gerado, reduz o NBT produzindo formazan. Após 2 min de incubação, à temperatura ambiente, a reação foi interrompida adicionando-se aos tubos teste HCl (0,01N). Em seguida, foi medido espectrofotometricamente em comprimento de onda de 560 nm contra um branco que não continha fenazina-metasulfato. Diferentes concentrações de EB, FAE, FBuOH, FAq, 19SF, 35SF, 51SF, 63SF, catequina e galocatequina da *Croton celtidifolius*, diluídas em água deionizada (0,1; 1; 10 e 100  $\mu\text{g/ml}$ ), foram adicionadas aos tubos teste antes da adição de fenazina-metasulfato.

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M das percentagens, sendo considerado os valores da absorbância dos controles como 100% da redução do NBT sem a presença dos compostos testados.

### 3.4.1.3. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A peroxidação lipídica foi testada usando homogenato de fígado de ratos como substrato alvo, os animais foram sacrificados e rapidamente procedeu-se com a perfusão do fígado com salina 0,9%, para retirada do sangue, posteriormente o fígado foi retirado, pesado e por fim, homogenizado com ultraturax (Bosch) e armazenados a  $-20^{\circ}$  C (Chen e Tappel 1996). Neste sistema, a peroxidação é induzida por peróxido t-butila. Os reagentes foram adicionados na seguinte ordem: 10 mM PBS ( $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$ ) pH 7.4, diferentes concentrações de EB, FAE, FBUOH, FAq, 19SF, 35SF, 51SF, 63SF, catequina e galocatequina (0.1 a 100  $\mu$ g /mL) da *Croton celtidifolius*, ou hidroxitolueno butilado (BHT), homogenato de fígado de rato (150  $\mu$ L) e 100  $\mu$ M peróxido t-butila. A mistura foi incubada a  $37^{\circ}$  C, sob condições aeróbicas, por 2 h. Após a incubação, 1 mL de 1% (p/v) ácido tiobarbitúrico (TBA) e 1 mL de 2.8% ácido tricloroacético (TCA) foram adicionados aos tubos e aquecidos a  $100^{\circ}$ C por 15 min; após a remoção dos precipitados por centrifugação, foram quantificados os níveis de malondialdeído por espectrofotometria em um comprimento de onda de 532 nm.

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M das percentagens, sendo considerados os valores da absorbância dos controles como 100% dos níveis de malondialdeído sem a presença dos compostos testados.

### 3.4.2 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS .

#### 3.4.2.1 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.

##### 3.4.2.1.1. TESTE DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ÁCIDO ACÉTICO.

Diferentes grupos de camundongos machos (25 – 35 g) foram tratados por via oral (v.o.) com veículo (0,1 ml/ 10 g , grupo controle) e com EB da *Croton celtidifolius* (3 – 300 mg/kg). Após 1 hora do tratamento, os animais receberam, por via intraperitoneal, ácido acético 0,6 % (0,1 mL/10 g).

Para determinar o tempo de duração da atividade antinociceptiva, os animais foram pré-tratados com o EB na dose de 100 mg/kg; v.o. nos tempos 0; 0,5; 1; 2; 3 e 4 horas antes da injeção intraperitoneal de ácido acético. Como controle positivo os animais receberam ácido acetilsalicílico 100 mg/kg, i.p.

As contorções abdominais foram consideradas como contrações da parede abdominal seguidas por extensão de, pelo menos, uma das patas posteriores (Vacher *et al.*, 1964) e foram contadas cumulativamente por 30 min em camundongos colocados individualmente em caixas de acrílico com medidas de (15x15x15), com um espelho ao fundo (90°) e com outro abaixo do animal (45°), permitindo a visualização completa de seu comportamento.

Os resultados foram expressos como as médias  $\pm$  E.P.M. do número de contorções abdominais acumuladas durante 30 min da avaliação experimental.

### 3.4.2.1.2. TESTE DA FORMALINA EM CAMUNDONGOS.

Para avaliar o efeito antinociceptivo da *Croton celtidifolius* foi utilizado o teste da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina, um modelo mais específico que o teste de contorções abdominais, onde pode-se avaliar duas fases distintas de nocicepção. A primeira, observada nos primeiros 5 min após a injeção intraplantar de formalina, considerada nocicepção neurogênica e, a segunda, que ocorre entre 15 e 30 min após a injeção do agente nociceptivo. Esta última representa a resposta nociceptiva acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada com a liberação de mediadores inflamatórios (Hunskaar e Hole, 1987).

Neste experimento foram utilizados camundongos machos (25 - 35 g) tratados por via oral ou i.p. com veículo (0,1 mL/10 g, grupo controle) e com EB nas doses de (10, 30, 100, 300 mg/kg; v.o.), FBUOH e FAq nas doses de (10, 30, 100, 300 mg/kg; v.o.) e (3, 10, 30, 100 mg/kg; i.p.) e FAE nas doses de (3, 10, 30, 100 e 300 mg/kg; v.o. e i.p.) estas doses foram escolhidas pelo fato de o EB apresentar uma redução significativa no número de contorções no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético com estas doses.

Outro grupo de animais foi tratado com 19SF, 26SF, 35SF, 51SF, 63SF e com os compostos isolados catequina e galocatequina na dose de 30 mg/kg de peso, por via i.p.

Após 1 hora do tratamento por via oral e 30 min, por via i.p., os animais receberam uma injeção intraplantar de 20 µl de formalina 2,5 % (formaldeído 0,92% em PBS) e foram colocados individualmente em caixas de acrílico (15x15x15 cm), com um espelho ao fundo (90°) e com outro abaixo do animal (45°), permitindo a visualização completa de seu comportamento (Castro, 2000).

Em seguida, foi observada a reatividade, considerada como o tempo gasto (em segundos) pelos animais lambendo e mordendo a pata injetada, durante os primeiros 5 min (primeira fase) e de 15 a 30 min (segunda fase) da avaliação experimental (Hunskaar *et al.*, 1985; Murray *et al.*, 1988).

Decorrido o tempo de observação, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e suas patas posteriores foram cortadas e pesadas. A diferença em peso (mg) foi considerado como índice de edema

Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  E.P.M. dos tempos de reatividade dos animais, cronometrados em segundos (s), durante as duas fases de nocicepção, e da diferença de peso entre as patas como índice de edema.

### **3.4.2.2. ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA.**

#### **3.4.2.2.1. EDEMA DE PATA EM CAMUNDONGOS INDUZIDO PELA CARRAGENINA.**

Para este experimento, foram utilizados camundongos machos 25 -30g. O volume da pata foi determinado através do aumento do peso promovido pela imersão da pata até a articulação tíbio-társica em um Becker contendo uma solução 2,5 % de lauril sulfato de sódio, colocado sobre uma balança eletrônica. As variações do volume das patas foram registradas numericamente pela balança nos tempos zero (antes da injeção do agente flogístico) e após 30, 60, 120 e 240 minutos. Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  E. P. M. da diferença de volume da pata posterior direita injetada com carragenina, e da pata posterior esquerda injetada com o veículo PBS (salina tamponada com fosfato/PBS;

composição em mmol/litro: NaCl 137, KCl 2,7 e tampão fosfato 10). As percentagens de inibição para cada grupo tratado em relação ao controle foram calculadas através da área sob a curva (Torres, 2000).

Os animais receberam por v.o., 0,1 mL/10 g de animal, de uma solução contendo EB, FAE, FBUOH e FAq, nas doses de 10, 30, 100 e 300 mg/kg de peso, 1 antes da aplicação intraplantar de carragenina e por via i.p. nas doses de 3, 10, 30 e 100 mg/kg de peso, 30 min antes da administração na pata do agente flogístico. A fração éter dietílico foi administrada por via i.p. somente nas doses de 30 e 100 mg/kg de peso, 30 min antes do agente flogístico.

Outros grupos de animais, foram tratados com 19SF, 26SF, 35SF, 51SF, 63SF, catequina e galocatequina na dose de 30 mg/kg de peso, por via i.p. 30 min antes da aplicação de carragenina.

Os grupos controle receberam somente a solução veículo (PBS) e os controles positivos foram tratados com indometacina, diluída em uma solução salina (PBS) com bicarbonato de sódio a 5% (v/v), foram realizados sempre estes grupos em cada procedimento.

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M do volume da pata dos animais. Os valores percentuais de inibição do edema foram determinados pela diferença percentual da área sob a curva de animais controle, considerado como 100 % de edema, e animais tratados.

#### **3.4.2.2.2. PRESSÃO ARTERIAL EM RATOS ANESTESIADOS**

Para se descartar um possível efeito vasoconstritor da FAE, que poderia nos fornecer um resultado falso-positivo no edema, ratos Wistar (250-300 g) foram

anestesiados pela via i.p. com uretana, 800 mg/kg . Canulou-se então a veia jugular para a injeção das drogas e a artéria carótida para o registro da pressão arterial. As variações pressóricas foram registradas em um transdutor de pressão conectado a um analisador de pressão arterial (*Blood Pressure Analyzer*). Após a estabilização da pressão os animais receberam, por via endovenosa, a FAE nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg, antes e após o tratamento com FAE foi administrado pela mesma via acetilcolina ( $1.10^{-6}$  M) (Rivaplamed, 1996).

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M da pressão arterial média dos animais após a administração endovenosa da FAE.

### **3.4.2.3 ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA.**

#### **3.4.2.3.1. PLEURISIA INDUZIDA POR CARRAGENINA EM RATOS.**

Para este experimento foram utilizados ratos machos (180 - 250 g), tratados por via i.p. com veículo (0,1 ml/100 g de animal) considerado grupo controle ou com FAE nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg; i.p. e com 35SF, 63SF e catequina na dose de 30 mg/kg, i.p. Como controle positivo foi utilizada indometacina 10 mg/kg, i.p. Após 30 minutos do tratamento prévio dos animais, foi induzida a pleurisia com uma injeção de 0,2 mL de carragenina a 1% (p/v) na cavidade pleural direita dos ratos. Quatro horas depois os animais foram sacrificados com *overdose* de éter e a seguir foram fixados em uma plataforma cirúrgica, onde fez-se uma incisão na pele do abdômem a fim de expor o tórax. Logo em seguida o apêndice xifóide foi pinçado, a fim de expor o diafragma, e a cavidade pleural foi lavada com injeção de 1,5 ml de PBS heparinizado (heparina 5 UI/mL). Após a lavagem, uma pequena incisão no

diafragma, expôs a cavidade pleural onde todo o líquido, resultado da lavagem, foi aspirado cuidadosamente. Exudatos contaminados com sangue foram imediatamente desprezados (Salvemini *et al.*, 2001).

Em todos os casos, os resultados foram expressos como as médias  $\pm$  E.P.M. do número de células totais ( $10^6$ ) contadas na cavidade pleural.

#### 3.4.2.3.2. DETERMINAÇÃO DO VOLUME DE EXUDATO

Após a lavagem da cavidade, o exudato foi cuidadosamente acondicionado dentro de uma seringa de 5 ml, adaptada em sua extremidade com uma cânula flexível, com diâmetro de 2 mm, para não causar dano nas células presentes. Após este procedimento o volume do exudato foi determinado, pela observação do volume do líquido pleural que preenchia a seringa em relação a escala (ml) da mesma.

Em todos os casos, os resultados foram expressos como as médias  $\pm$  E.P.M. do volume de exudato subtraído do volume de PBS utilizado na lavagem.

#### 3.4.2.3.3. CONTAGEM CELULAR TOTAL E DIFERENCIAL

Uma alíquota de exudato foi diluído em solução de Turk (1/20). A contagem dos leucócitos totais foi realizada em câmara de Neubauer por meio de microscópio óptico comum. Para a contagem do diferencial celular (polimorfonucleares e mononucleares), foram preparados esfregaços, as células coradas com May-Griinwald-Giemsa e contadas através de microscópio óptico sob objetiva de imersão.

Em todos os casos, os resultados foram expressos como as médias  $\pm$  E.P.M. da quantidade de polimorfonucleares ( $\times 10^6$ ) contados e diferenciados.

### **3.4.3. ENSAIOS BIOQUÍMICOS “EX VIVO”.**

Não se pode avaliar o efeito da EROs sobre sistemas biológicos através de uma única metodologia experimental. Um conjunto de resultados experimentais, revela se as substâncias consideradas antioxidantes, podem interferir nos efeitos promovidos pela EROs nestes sistemas biológicos.

Foram analisados no laboratório da Prof. Dra. Rosa Maria Ribeiro-do-Valle, parâmetros oxidativos nas células da cavidade pleural de ratos submetidos a pleurisia, para isso utilizou-se uma criteriosa bateria experimental para revelar se as frações, sub-frações e compostos isolados da *Croton celtidifolius*, considerados como antioxidantes, poderiam reduzir os efeitos das EROs sobre os sistemas biológicos, e se este efeito antioxidante seria o responsável pela atividade antiinflamatória desta planta, propondo assim parte de seu mecanismo de ação.

#### **3.4.3.1. AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE ATRAVÉS DO TESTE DO COMETA.**

EROs, podem causar alterações estruturais no DNA, como deleções, rearranjos e inserções. Além da produção mitocondrial, EROs, são gerados em quadros patológicos (Cuzzocrea, *et al.*, 2000). Para se avaliar se as substâncias da *Croton* poderiam reduzir os danos ao DNA promovidos pelas EROs utilizou-se o teste do Cometa, um ensaio de genotoxicidade recente unido técnicas citogenéticas e bioquímicas para detecção de danos ao DNA, inclusive danos oxidativos (Hartmann e Speit 1995; Tuo, 1996).

Este teste fundamenta-se em uma eletroforese de células lisadas sob condições alcalinas e embebidas em gel de agarose de baixo ponto de fusão, sobre

lâminas de microscopia. Após a coloração, os núcleos intactos encontram-se redondos, enquanto que o DNA das células lesadas migra em direção ao ânodo, formando uma “cauda” (Anderson *et al.*, 1994; Klaude *et al.*, 1996).

Lâminas de microscópio foram primeiramente mergulhadas em uma solução 1,5% de agarose (NMA - “normal melting agarose”) em PBS (tampão salina - fosfato, pH 7,4) livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  e mantidas à temperatura ambiente até a solidificação. Posteriormente foi adicionado sobre as lâminas 300  $\mu\text{L}$  de agarose (NMA) a 0,75% em PBS livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  e foram imediatamente cobertas com lamínulas (24x50) e acondicionadas no refrigerador pelo período máximo de uma semana. Após a solidificação da agarose, as lamínulas foram retiradas e 5  $\mu\text{L}$  de exudato coletado da cavidade pleural de ratos tratados com veículo (animais controle), ou com EB, FAE, 35SF, 63SF e catequina da *Croton celtidifolius*, foi misturado a 90  $\mu\text{L}$  de agarose com baixo ponto de fusão (LMA - “low melting agarose”) a 0,70% em PBS livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  e foram espalhados sobre a lâmina. Essas lâminas foram novamente cobertas pelas lamínulas e mantidas em refrigeração por 5 min. Posteriormente, as lamínulas foram removidas e as lâminas mergulhadas em solução de lise por, no mínimo, 24 h. Essa solução estoque de lise (pH 10) apresentou: 2,5 M NaCl; 100 mM EDTA; 10 mM Tris e 1% lauril sarcosinato de sódio. Uma hora antes do uso desta solução, foram adicionados 10% de DMSO; 1% de Triton X-100 e resfriadas a 10°C.

As lâminas foram retiradas da lise, acomodadas na cuba de eletroforese, mantida a baixa temperatura com gelo e cobertas pela solução tampão (30ml NaOH e 5ml EDTA, pH 12), permanecendo nesse tratamento alcalino por 30 min. Posteriormente, as lâminas foram submetidas a uma corrente elétrica de 25 Volts e 280-300 mA por 20 min e lavadas três vezes com um solução neutralizadora que consiste de 0,4M

Tris, pH 7,5. Finalmente, cada lâmina foi corada com 70  $\mu$ l de brometo de etídio (2  $\mu$ g/ml)

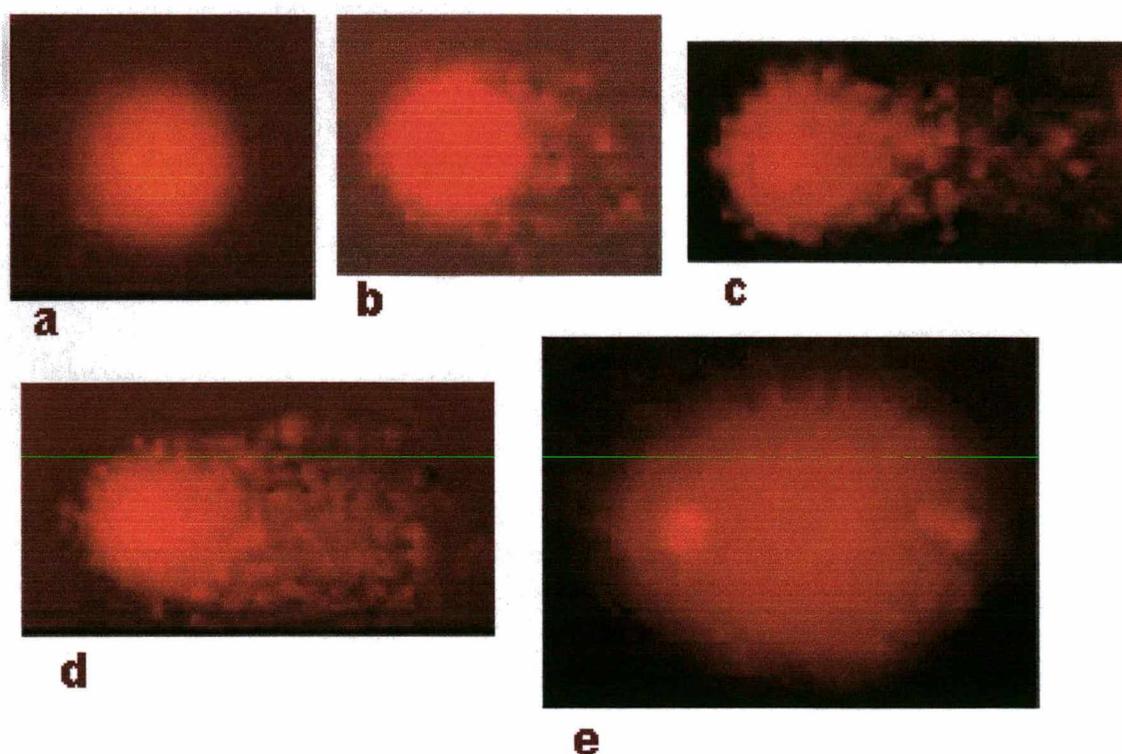
Após a coloração com brometo de etídio, foram selecionadas aleatoriamente 100 células (50 células de cada duplicata) para serem analisadas ao microscópio de imunofluorescência equipado com um filtro de 515-560 nm. A análise dos resultados foi feita através da avaliação visual das classes de dano, classe 0 – sem dano (a) I (b) II (c) III (d) e IV – dano máximo (e) como mostrado na figura 4, e a análise estatística foi realizada através de ANOVA, complementado pelo teste de Dunnett (Anderson *et al.*, 1994; Klaude *et al.*, 1996).

Como não existe um índice quantitativo para se determinar o dano no DNA, utiliza-se o índice de unidades arbitrárias, que fornece valores de escores para as células contidas em cada classe. O índice de unidades arbitrárias foi determinado a partir da somatória dos escores de cada classe, segundo a fórmula:

$$\Sigma: \text{Classe 0 (n}^\circ \text{ de células x 0) + I (n}^\circ \text{ x 1) + II (n}^\circ \text{ x 2) + III (n}^\circ \text{ x 3) + IV (n}^\circ \text{ x 4)=}$$

$\Sigma$ : Representa o somatório do número de unidades arbitrárias.

Em todos os casos, os resultados foram expressos como as médias  $\pm$  E.P.M. das unidades arbitrárias de cada grupo experimental e da quantidade de células por classe de dano.



**Figura 4** – Representação das classes de dano no DNA observada no teste do Cometa; classe 0 – sem dano (a) I (b) II (c) III (d) e IV dano máximo (e). Adaptado de Susin (1998).

#### **3.4.3.2. PREPARAÇÃO DO EXUDATO PLEURAL DE RATOS PARA TESTES BIOQUÍMICOS.**

Após o procedimento descrito no item 3.4.2.3.1., o exudato foi lavado para a redução da quantidade de proteínas, que posteriormente foi utilizado nos ensaios bioquímicos. Neste processo, 1,5 mL do exudato foi lavado em uma solução de salina 0,9 % na proporção de 1:5, e centrifugado, a 1500 rpm por 5 minutos, logo em seguida, foi ressuspenso com 1,5 mL de PBS heparinizado (heparina 5 UI/mL) e

aliquotado para a realização dos ensaios bioquímicos. O procedimento está sumarizado na figura 5, página 48.

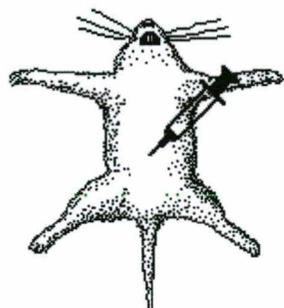
#### 3.4.3.3. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DO RADICAL ÂNION SUPERÓXIDO EM CÉLULAS ISOLADAS DA CAVIDADE PLEURAL DE RATOS SUBMETIDOS A PLEURISIA.

Uma das principais fontes de EROs é ativação de um sistema NADPH-oxidase, presente nos fagócitos e células epiteliais, que resulta na redução monoelétrica do  $O_2$  a  $O_2^{\bullet-}$ . Este ânion, como já vimos anteriormente, participa de uma série de efeitos deletérios em sistemas biológicos (Eiserich *et al.*, 1998; Walsh, 1999; Wu *et al.*, 2000; MacPherson *et al.*, 2001).

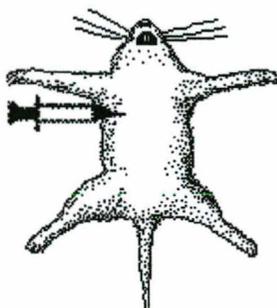
O seguinte ensaio foi adaptado de Robak e Gryglewski (1988). A uma alíquota de 200  $\mu$ l do exudato pleural lavado de cada amostra em duplicata, foram adicionados 200  $\mu$ l de uma solução de NBT (*nitroblue tretazolium*). O  $O_2^{\bullet-}$  gerado pelas células presentes no exudato reduz o NBT produzindo formazan, que posteriormente foi medido espectrofotometricamente. Após 30 minutos de incubação à 37° C, a reação foi interrompida adicionando-se aos tubos teste HCl (0,01N), as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante desprezado e o formazan ressuspenso com 700  $\mu$ l de DMSO (dimetilsulfóxido). Em seguida, o produto reduzido do NBT, o formazan, foi medido espectrofotometricamente em comprimento de onda de 560 nm.

**TRATAMENTO**

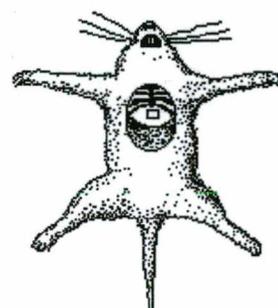
- Veículo; Salina 0,9 %
- FAE 10, 30, 100 mg/kg i.p
- Catequina, SF 35, SF 63; 30 mg/kg i.p.

**INDUÇÃO**

- Carragenina 1%, 0,2 mL, na cavidade pleural

**COLETA E QUANTIFICAÇÃO DO EXUDATO**

- 4 horas após a indução houve a coleta e quantificação do exudato em seringa de 5 mL.



- 10  $\mu$ L da Amostra + 190  $\mu$ L de solução de Turk, Contagem de células totais;
- 10  $\mu$ L Contagem diferencial.



20  $\mu$ L da Amostra para o teste do Cometa



200  $\mu$ l do Sobrenadante separados e congelados para posterior dosagem de nitrito/nitrato.

Centrifugado por 5 min. a 1500 rpm (3)

Pellet ressuscitado  
1,5 mL de Salina  
estéril 0,9 %

**LAVAGEM DO EXUDATO**

- 1,5 mL de exudato + 7,5 mL de salina estéril 0,9%

**Foram aliquotados:**

1. 450  $\mu$ L para dosagem da Peroxidação lipídica (ependorf, banho de gelo 4° C) \*
2. 400  $\mu$ L (2 x 200  $\mu$ L) da amostra incubados com o NBT 200  $\mu$ L (1 mM; 37° C; 30 min.) \*
3. 200  $\mu$ L para atividade da SOD (ependorf; - 20 °C)

\* experimentos realizados no dia do sacrifício.

1. Após o término da pleurisia seguiu-se com o protocolo da peroxidação.

2. Após a incubação, parou-se a reação com HCl (0,1 N), centrifugado e ressuscitado em 700  $\mu$ L de DMSO.

3. Proceder com a lise celular com nitrogênio líquido e posterior dosagem da SOD (dia seguinte).

#### 4.3.4. DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NAS CÉLULAS ISOLADAS DA CAVIDADE PLEURAL DE RATOS SUBMETIDOS A PLEURISIA.

Um alvo importante das EROs, são as membranas fosfolipídicas e a geração de EROs nestas membranas promove reações de oxidação em cadeia, aumentando a permeabilidade a íons, promovendo inativação de receptores de membrana e produção de metabólitos tóxicos (Macnee, 2001). O processo de peroxidação lipídica está ligado a uma série de processos patológicos envolvendo EROs, como inflamação (Middleton *et al.*, 2000).

Os índices de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico principalmente o malondialdeído, são determinadas como índice de peroxidação lipídica (Ohkawa *et al.*, 1979). Para essa determinação, duas alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  do exudato pleural lavado, foram separadas e adicionadas a uma mistura contendo 200  $\mu\text{L}$  de lauril sulfato de sódio (SDS 8,1 %), 1500  $\mu\text{L}$  de ácido acético (20 %), 1500  $\mu\text{L}$  de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,8 %) e 700  $\mu\text{L}$  de água deionizada. Esta mistura foi aquecida a 95° C por 1 h, após a remoção dos precipitados por centrifugação, foram quantificadas as substâncias que reagem com o TBA por espectrofotometria em um comprimento de onda de 532 nm (Salvemini, 2001).

#### 3.4.3.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) NAS CÉLULAS ISOLADAS DA CAVIDADE PLEURAL DE RATOS SUBMETIDOS A PLEURISIA.

A SOD é uma metaloproteinase que a célula utiliza para dismutar uma espécie radicalar o  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , para uma espécie menos reativa o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Esta reação

envolve uma série de transferências mono e bi-eletrônicas sem requerer energia da célula. (Klug-Roth *et al.*, 1973; Waldo e Penner-Hahn, 1995).

A medida da atividade da SOD nas células isoladas da cavidade pleural de ratos submetidos a pleurisia foi adaptada da metodologia descrita por McCord e Fridovich, (1969) que se baseia na inibição da redução do citocromo c pelo  $O_2^{\cdot-}$ , medindo-se o aumento de absorbância em 550 nm, à 25°C. A adição da amostra promove uma inibição na velocidade de redução de citocromo C, uma vez que a SOD compete com o citocromo pelo  $O_2^{\cdot-}$ , dismutando-o a  $H_2O_2$ . O meio de reação continha citocromo C 10 mM, xantina 50 mM, EDTA 0,1 mM, KCN 20 mM e tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8.

Após a coleta as amostras de células isoladas de animais controle e tratados com FAE, 35SF, 63SF e catequina, foram mergulhadas em nitrogênio líquido 3 vezes por 10 s, em seus respectivos recipientes, para a ruptura da membrana plasmática. Após uma breve homogeneização, foram centrifugadas (1500 rpm por 5 min) e o seu sobrenadante utilizado como amostra no sistema.

Foi adicionado à 1 mL do meio de reação um volume pré-definido do sobrenadante da amostra juntamente com um volume pré-definido da enzima xantina oxidase e observou-se espectofotometricamente a cinética de reação por um período de 120 s.

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  E.P.M de unidades de SOD por mg de proteína. Uma unidade (U) de SOD é definida como a quantidade da enzima que promove 50 % de inibição na redução do citocromo C por minuto, a 25°C, em pH 7,8.

#### 3.4.3.6. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE NITRITO/NITRATO NO EXUDATO PLEURAL DE RATOS SUBMETIDOS A PLEURIA.

A geração simultânea de NO e  $O_2^{\bullet-}$  favorece a formação de um dos metabólitos tóxicos do NO o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Beckman *et al.*, 1990). A determinação de nitrito/nitrato, como um indicador da síntese de NO, foi medida no sobrenadante do exudato pleural de ratos submetidos a pleurisia.

As amostras foram previamente desproteinizadas e o nitrato foi reduzido a nitrito pela incubação por 3 h, com a bactéria *Escherichia coli* a 37° C. A concentração de nitrito nos exudatos dos animais tratados com FAE nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg; i.p., e com catequina, 35SF e 63SF na dose de 30 mg/kg; i.p. foi medida pela reação de Griess, pela adição de 100  $\mu$ l do reagente (0,1 %  $\alpha$ -naftiletilenodiamina, 1 % de sulfanilamida e 10%  $H_2PO_4$ ) em 200  $\mu$ l de amostra. As amostras foram medidas usando leitor de ELISA com densidade ótica a 550 nm.

### 3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias (E.P.M) dos respectivos índices analisados. Quando necessário, foram mostrados na forma de  $CI_{50}$  e  $DI_{50}$  (concentração e dose do composto que reduz a resposta para 50 % em relação ao grupo controle), que são apresentadas como as médias geométricas acompanhadas de seus respectivos intervalos de confiança (IC) em nível de 95 %. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas com análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett ou Tukey, quando indicado. Valores de  $p$  menores que 0,05 foram considerados indicativos de significância.

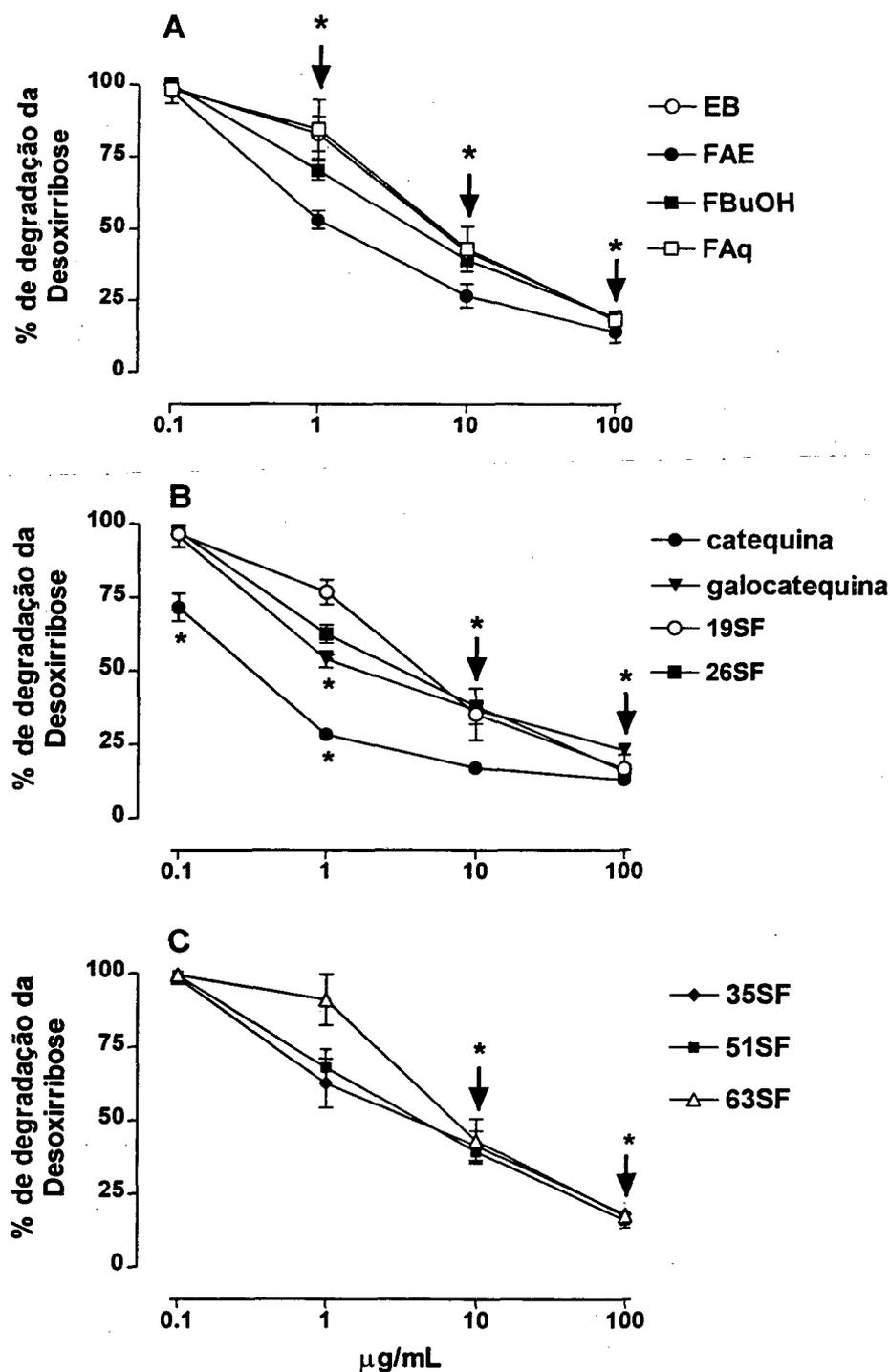
A análise estatística foi realizada através de dois softwares: Graph Pad InStat<sup>®</sup> versão 3.01 e Graph Pad Prism<sup>®</sup> versão 3.00, direitos autorais pertencentes a Graph Pad Software<sup>®</sup>

# RESULTADOS

## 4.1 RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE “in vitro”.

### 4.1.1 *Inibição da Degradação da Desoxirribose.*

Os resultados do teste de degradação da desoxirribose demonstram que o EB, FAE, FBuOH, FAq, 19SF, 26SF, 35SF, 51SF e 63SF e os compostos isolados catequina e galocatequina, foram capazes de inibir a degradação da desoxirribose provocada por sistema  $Fe^{2+}$ - $H_2O_2$ -NTA, de maneira concentração-dependente (fig. 6 A, B e C), sendo que a FAE, a catequina e a galocatequina foram as mais efetivas neste sistema com valores de  $IC_{50}$  menores que  $1 \mu g/mL$  (tab 1).



**Figura 6** - Efeito do EB, FAE, FBuOH, FAq (A); catequina, galocatequina, 19SF, 26SF (B); 35SF, 51SF e 63SF (C), sobre a degradação da desoxirribose induzida pelo sistema  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$ -NTA. As flechas invertidas ( $\downarrow$ ) indicam significância em todos os grupos numa determinada concentração. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  E.P.M das percentagens de inibição da degradação da desoxirribose, e diferem significativamente do controle em \*  $p < 0,05$  (ANOVA, complementado por Tukey).

**Tabela 1.** Comparação dos valores de  $CI_{50}$  e seus respectivos intervalos de confiança, da inibição da degradação da desoxirribose do extrato bruto, frações, sub-frações e compostos isolados da *Croton celtidifolius*

| Teste da desoxirribose | $CI_{50}(\mu\text{g/ml})^1$ | Inibição (%) <sup>2</sup> |
|------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| EB                     | 4,32 (3,03 – 6,15)          | 81,3 ± 2,91               |
| FAE                    | 0,69 (0,44 – 1,06)          | 86,0 ± 12,8               |
| FBuOH                  | 1,45 (0,73 – 2,89)          | 81,0 ± 2,47               |
| FAq                    | 5,07 (3,15 – 8,11)          | 81,2 ± 6,21               |
| Catequina              | 0,20 (0,11 – 0,39)          | 87,0 ± 7,70               |
| Galocatequina          | 0,55 (0,28 – 1,08)          | 77,0 ± 1,94               |
| 19SF                   | 3,09 (1,78 – 5,37)          | 83,3 ± 11,5               |
| 26SF                   | 1,21 (0,61 – 2,38)          | 84,0 ± 3,03               |
| 35SF                   | 1,11 (0,48 – 2,57)          | 82,0 ± 4,56               |
| 51SF                   | 1,74 (0,88 – 3,44)          | 84,0 ± 8,02               |
| 63SF                   | 5,53 (3,05 – 8,72)          | 82,5 ± 3,04               |

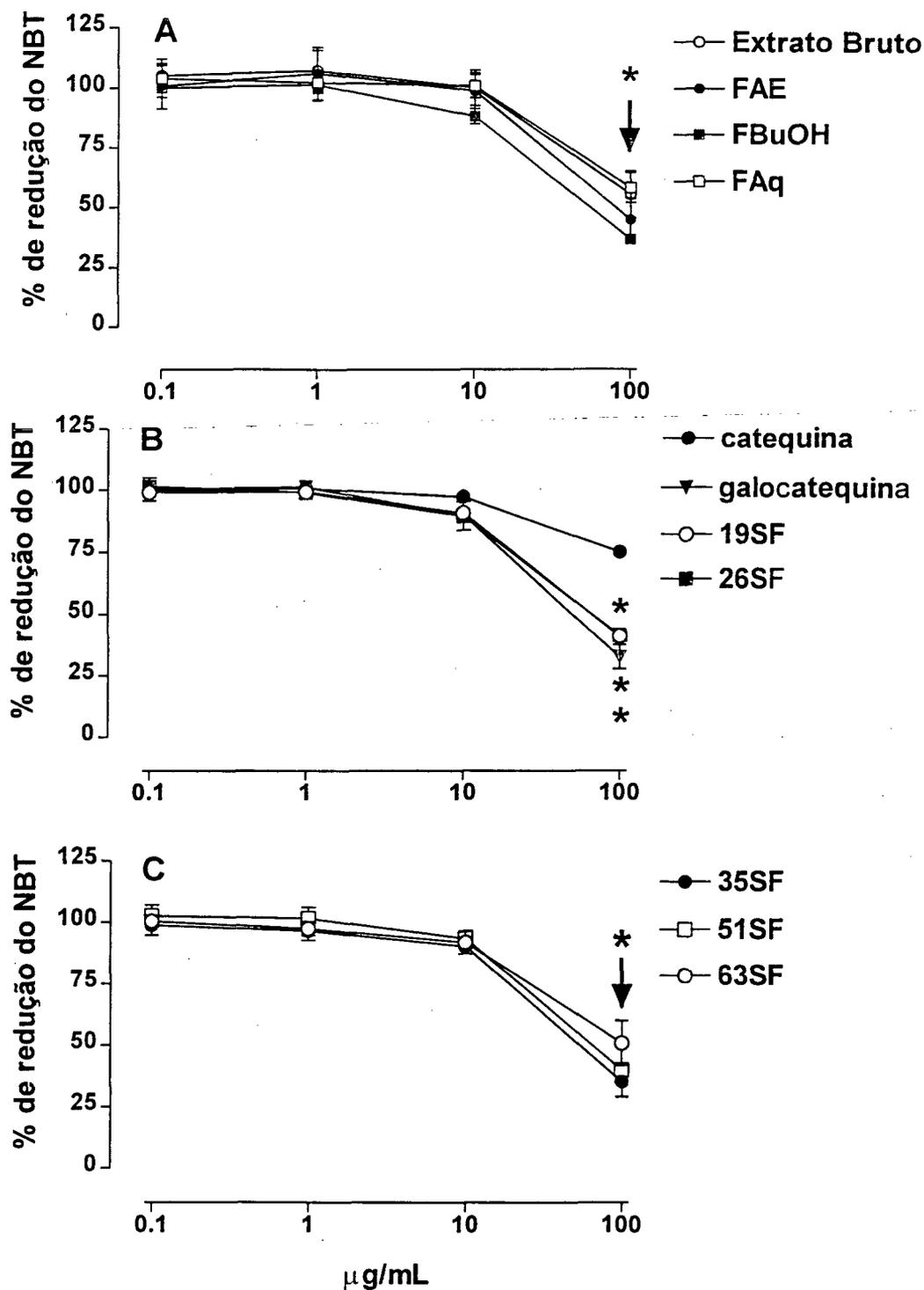
<sup>1</sup>Os valores da concentração inibitória ( $IC_{50}$ ) e as médias geométricas com seus respectivos intervalos de confiança, foram determinados por regressão não-linear usando "Graph Pad Prism<sup>®</sup> Software - versão 3.0".

<sup>2</sup>Valor da inibição total na maior concentração.

#### **4.1.2 Inibição da Redução do NBT (determinação da capacidade sequestradora do radical ânion superóxido).**

O EB, frações, sub-frações e compostos isolados da *Croton celtidofolius* demonstraram atividade antioxidante *in vitro*. Neste sistema, a inibição da redução do NBT foi observada somente na concentração de 100 µg/mL (fig. 7A). Esta inibição foi de  $45,0 \pm 3,5$  % para o EB, de  $55,5 \pm 5,5$  % para a FAE,  $63,7 \pm 0,5$  % para a FBUOH,  $42,2 \pm 2,3$  % para a FAq,  $67,5 \pm 10,2$  % para a galocatequina,  $59,0 \pm 1,9$  % para a 19SF,  $58,7 \pm 2,1$  % para a 26SF,  $65,0 \pm 2,9$  % para a 35SF,  $60,2 \pm 8,1$  % 51SF e  $49,3 \pm 5,1$  % para a 63SF (fig. 7A, B e C).

Neste ensaio podemos observar que as inibições foram relativamente semelhantes, sendo que somente a catequina não apresentou efeito neste sistema.

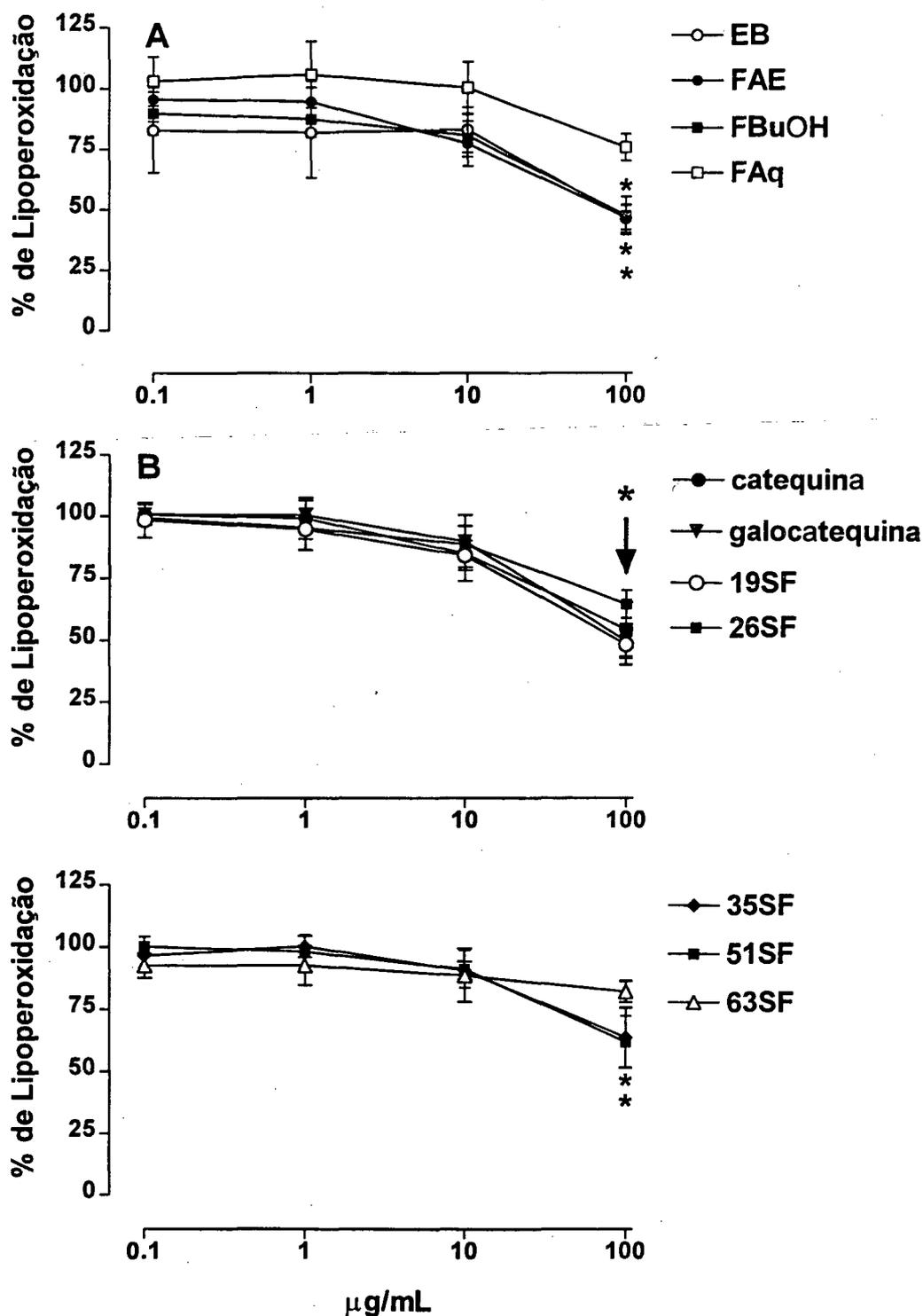


**Figura 7** - Efeito do EB, FAE, FBUOH, FAq (A); catequina, galocatequina, 19SF, 26SF (B); 35SF, 51SF e 63SF (C) da *Croton celtidifolius*, na inibição da redução do NBT causada pelo  $O_2^{\cdot -}$  gerado pelo sistema fenazina metassulfato-NADH. As flechas invertidas ( $\downarrow$ ) indicam significância em todos os grupos numa determinada concentração. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  E.P.M das percentagens de redução do NBT. Difere significativamente do controle em \*  $p < 0,05$  (ANOVA, complementado por Tukey).

### 4.1.3 Peroxidação Lipídica

O EB, frações, sub-frações e compostos isolados inibiram a lipoperoxidação somente na concentração de 100 µg/mL. O EB inibiu a peroxidação em  $54,4 \pm 3,1$  %. Do mesmo modo as frações FAE e FBUOH inibiram a oxidação do homogenato de fígado de rato, respectivamente, em  $54,0 \pm 3,4$  e  $53,2 \pm 3,9$  % (fig. 8A).

Nas mesmas condições experimentais, as outras sub-frações e compostos demonstraram a mesma atividade: catequina  $46,0 \pm 4,7$  %; galocatequina  $50,7 \pm 3,9$  %; 19SF  $52,0 \pm 5,1$  %; 26SF  $35,8 \pm 3,1$  %; 35SF  $36,5 \pm 4,9$  % e 51SF  $38,3 \pm 3,9$  % de inibição da peroxidação. Neste sistema hidrofóbico somente a fração FAq e a sub-fração 63SF não inibiram a peroxidação lipídica (fig. 8B e C).



**Figura 8** - Efeito do EB, FAE, FBuOH, FAq(A); catequina, galocatequina, 19SF, 26SF (B); 35SF, 51SF e 63SF (C) da *Croton celtidifolius*, sobre a oxidação do homogenato de fígado de rato induzido por peróxido *t*-butila. As flechas invertidas (↓) indicam significância em todos os grupos numa determinada concentração. Os resultados foram expressos em média ± E.P.M das percentagens de redução da peroxidação lipídica. Difere significativamente do controle em \*  $p < 0,05$  (ANOVA, complementado por Tukey).

## 4.2. RESULTADOS DOS ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

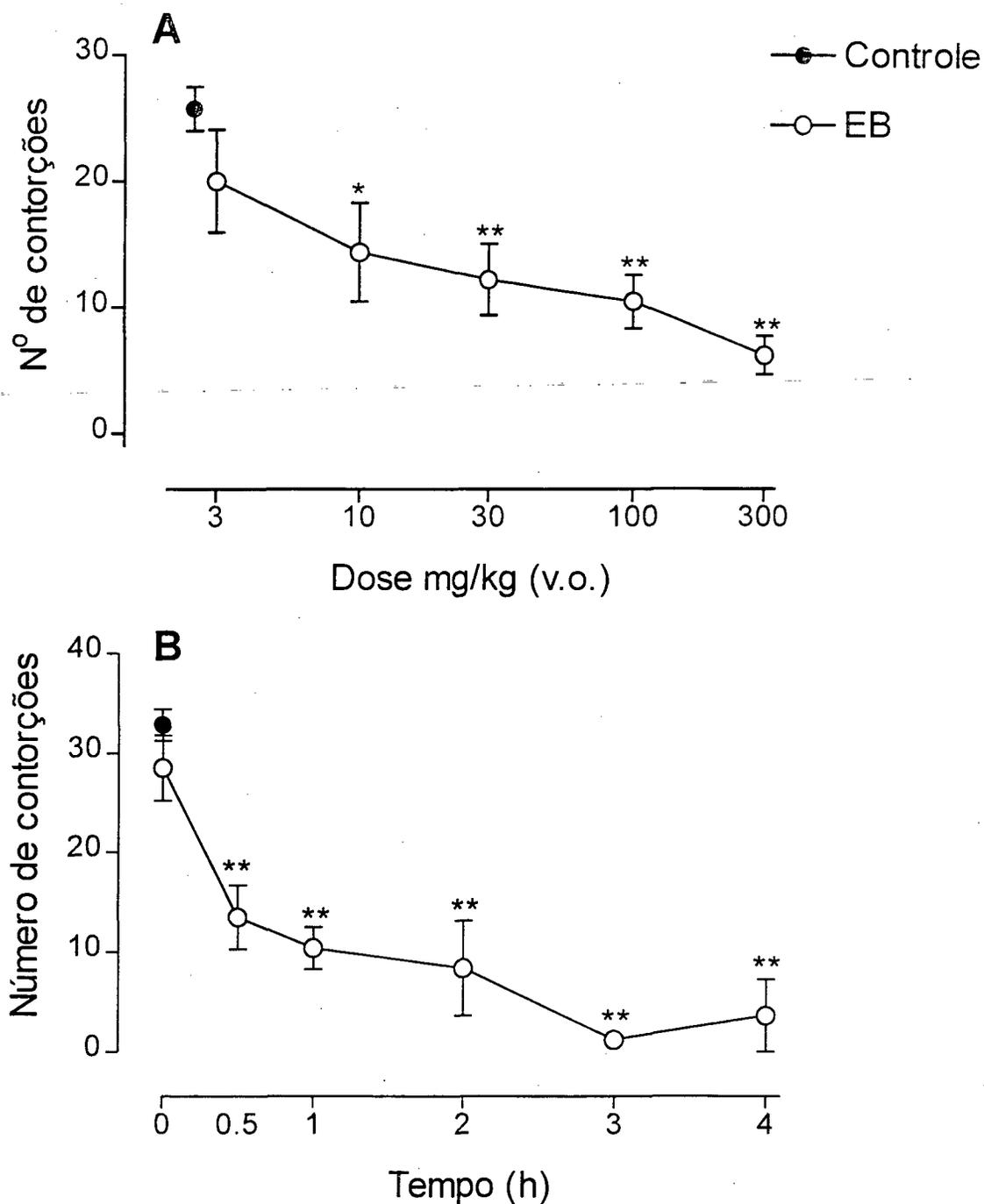
### 4.2.1 Contorções Abdominais Induzidas pelo Ácido Acético

O número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (0,6 %; 0,1 mL/10g, i.p.) nos animais controle, previamente tratados por via oral com veículo (0,1 mL/10g), foi de  $25,7 \pm 1,7$  contorções em 30 min, considerado como 100 % (fig. 9A e B).

A administração prévia por via oral do EB da *Croton celtidifolius* inibiu significativamente as contorções abdominais nos animais nas doses de 10, 30, 100 e 300 mg/kg em 44,4 % ( $14,3 \pm 3,9$ ), 52,5% ( $12,2 \pm 2,8$ ), 59,5 % ( $10,4 \pm 2,1$ ) e 75,89 % ( $6,2 \pm 1,5$ ) para cada dose respectivamente (fig. 9A).

O efeito da redução do número de contorções abdominais pela administração prévia do EB da *Croton celtidifolius*, ocorreu após 30 min da administração intraperitoneal de ácido acético, sendo que este efeito antinociceptivo perdurou por mais de 4 h (fig. 9B).

O tratamento dos animais com ácido acetilsalicílico 100 mg/kg, via i.p. reduziu significativamente as contorções abdominais em 67,0 % ( $8,48 \pm 0,7$ ).



**Figura 9** - Efeito da administração prévia (1 h) por v.o. de várias doses (A) e na dose de 100 mg/kg, (v.o.), em diferentes tempos de pré-tratamento (B) do EB de *Croton celtidifolius*, sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6%, i.p., em camundongos. Os gráficos representam as médias  $\pm$  E.P.M do número de contorções de 5 – 12 animais por grupo experimental. Difere significativamente do grupo controle, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ . (ANOVA, complementado por teste Dunnett)

#### 4.2.2 Teste da Formalina em Camundongos.

A injeção intraplantar de 20  $\mu$ L de formalina 2,5% (formaldeído 0,92%) na pata posterior direita de camundongos induziu um quadro nociceptivo intenso com duas fases bem definidas, e formação de edema.

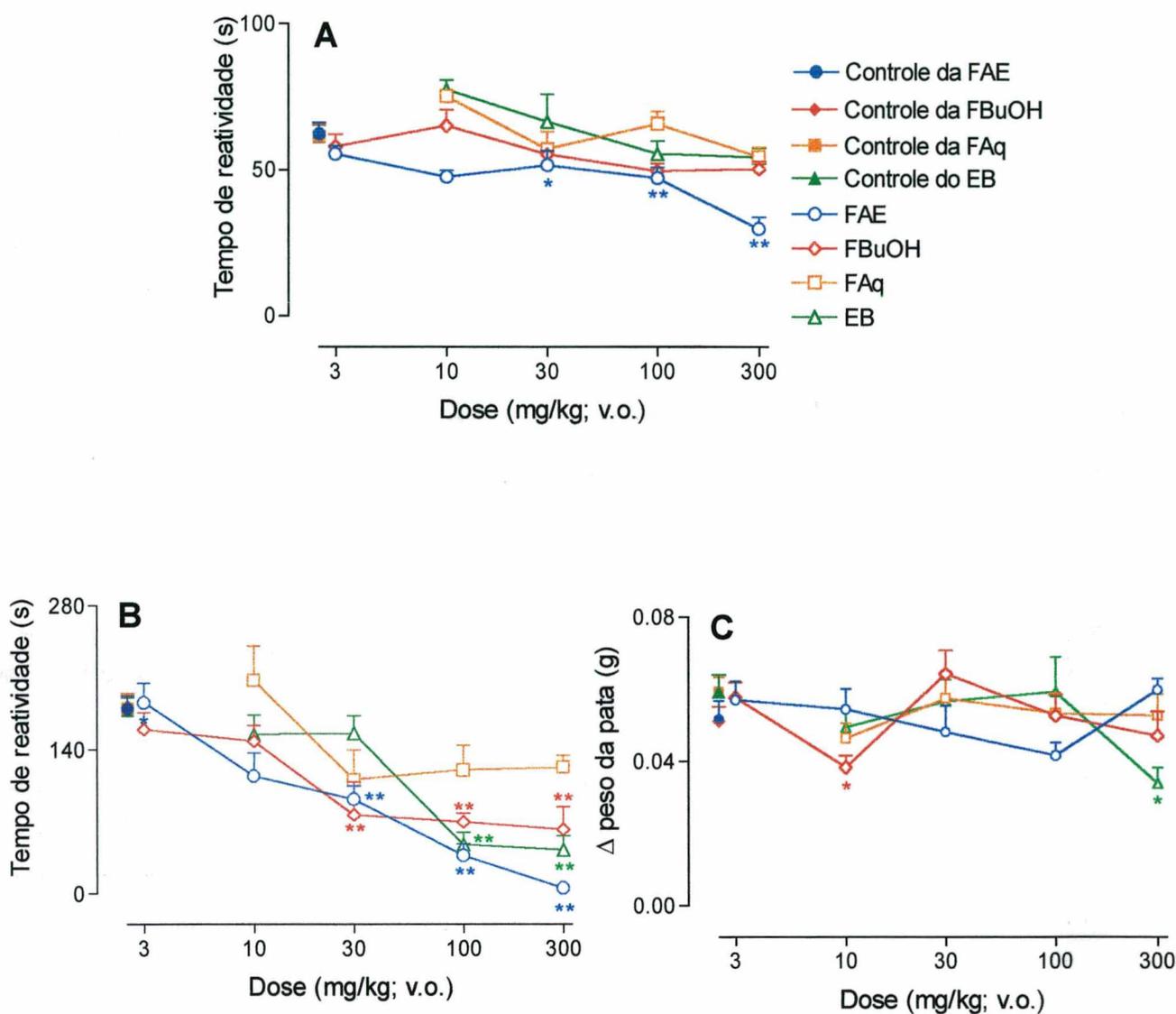
Na PRIMEIRA FASE do teste de formalina, a resposta dos animais tratados com veículo (animais controle) foi de  $61,6 \pm 4$  s, por v.o., e  $65,7 \pm 3,1$  s, por via i.p. (figs. 10A e 11A). O tratamento prévio com FAE, reduziu significativamente o tempo de reatividade dos animais tratados por v.o. com  $DI_{50}$  de 99,6 (83,4 - 114,5) mg/kg (fig. 10A) e por via i.p. de 29,0 (13,1 - 64,4) mg/kg (fig. 11A). O pré-tratamento com EB, FbuOH e FAq, não reduziram o tempo de reatividade, tanto por v.o. quanto por via i.p.

Na SEGUNDA FASE do teste de formalina, o tempo de reatividade dos animais controle foi de  $179 \pm 12,5$  s, naqueles que receberam o veículo por v.o. e  $150,9 \pm 8,6$  s, nos animais que receberam o veículo por via i.p. O tratamento prévio com a FAE foi capaz de reduzir o tempo de reatividade com  $DI_{50}$  de 16,4 (7,1 - 37,7) mg/kg, v.o. (fig. 10B) e 5,5 (3,3 - 9,2) mg/kg, i.p. (fig. 11B). Os pré-tratamentos com EB e FbuOH foram capazes de reduzir o tempo de reatividade com  $DI_{50}$  de 56,6 (44,0 - 70,3) e 39,71 (32,6 - 52,9) mg/kg, v.o., respectivamente. Os animais dos grupos tratados com FbuOH e FAq, por via i.p., apresentaram redução significativa no tempo de reatividade com valores de  $DI_{50}$  estimados em 25,49 (10,8 - 46,8) mg/kg e 7,1 (2,9 - 16,88) mg/kg, respectivamente (fig. 11B).

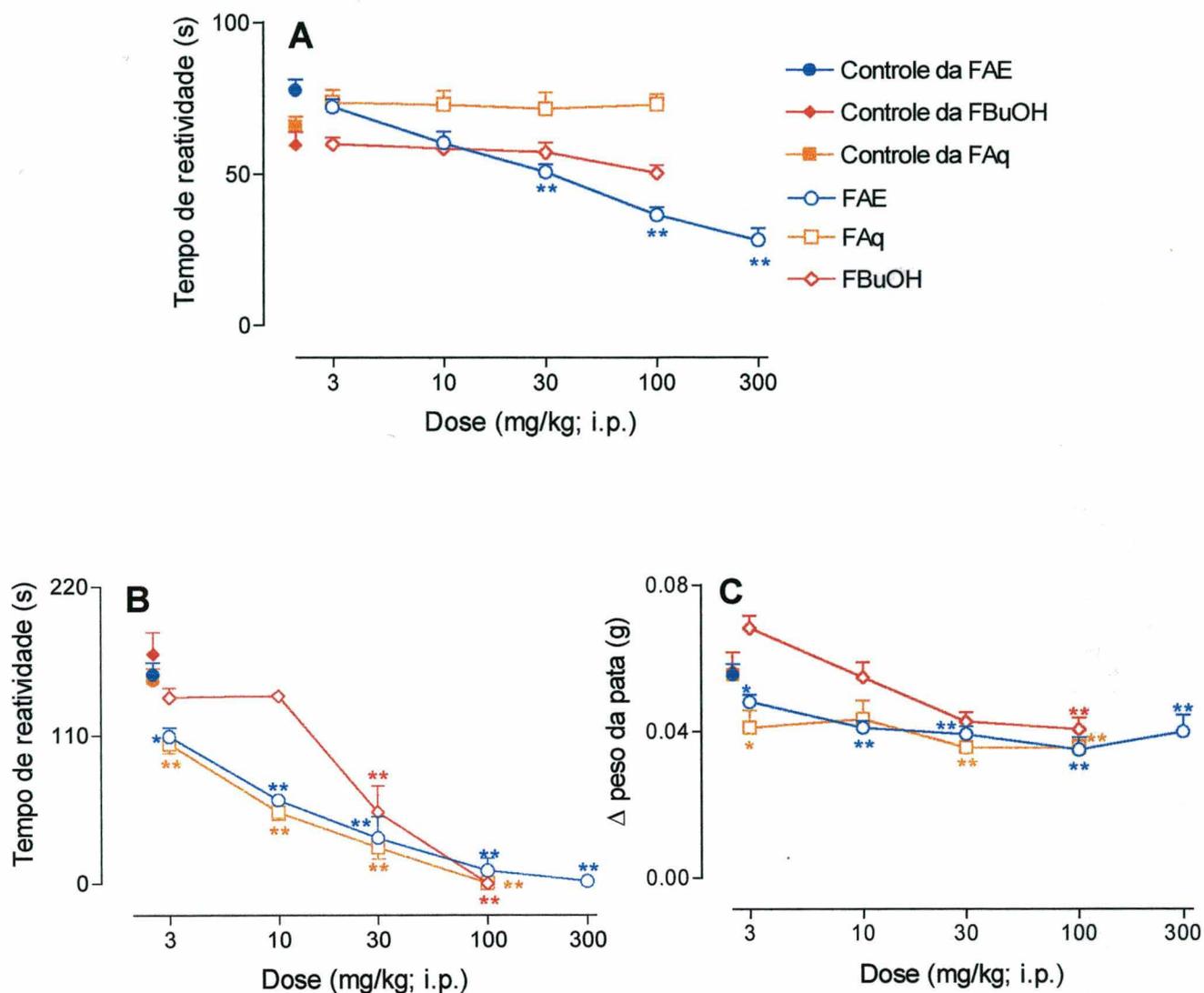
Nas mesmas condições experimentais, os animais foram pré-tratados com as subfrações na dose de 30 mg/kg via i.p. e somente a 63SF foi capaz de reduzir significativamente a primeira e a segunda fase da nocicepção induzida por formalina.

O edema produzido pela formalina foi reduzido significativamente nos animais tratados com FAE por via i.p., que na dose de 300 mg/kg inibiram em 27,7% o edema quando comparado ao controle (fig. 11C); nos animais tratados com FbuOH e FAq, por via i.p. (fig. 11C) e pelo EB, v.o. (300 mg/kg) inibiram o edema quando comparado ao controle, conforme figura 10C.

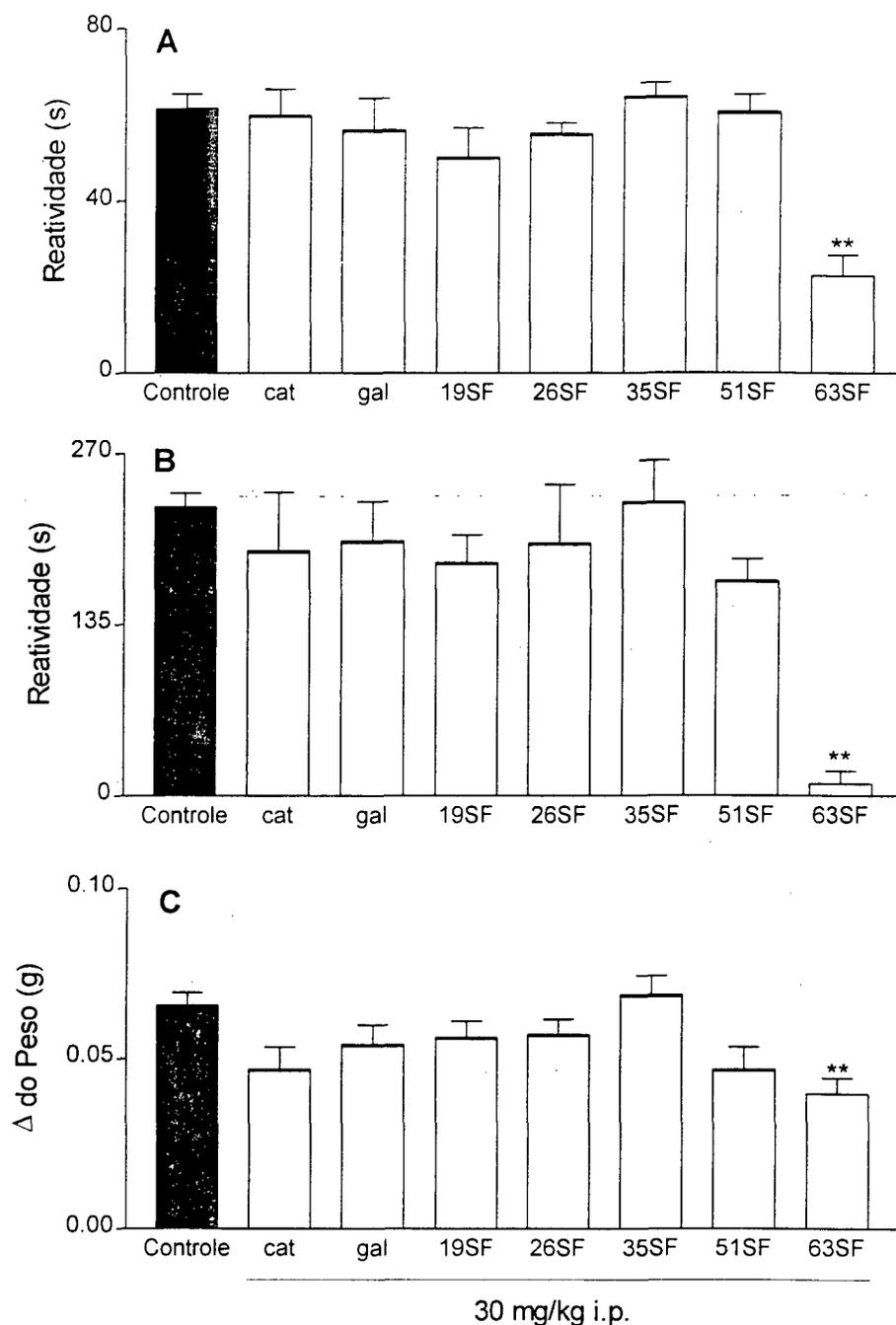
A fração éter dietílico, as subfrações 19SF, 26SF, 35SF, 51SF, catequina e galocatequina, não demonstraram atividade neste modelo.



**Figura 10** – Avaliação do efeito antinociceptivo promovido pelo EB, FAE, FBUOH e FAq da *Croton celtidifolius*, administrada nas doses de 3 – 300 mg/kg por via oral (v.o.), 1 h antes, sobre a reatividade da primeira fase (A) e segunda fase (B) e edema (C), induzidos pela injeção intraplantar de formalina em camundongos. Animais controles simbolos fechados (■ ● ◆), animais tratados simbolos abertos (□ ○ ◇). Os gráficos representam as médias  $\pm$  E.P.M da reatividade e do  $\Delta$  do peso da pata de 5 – 12 animais por grupo experimental. Difere significativamente do grupo controle, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ . (ANOVA, complementado por teste Dunnett)



**Figura 11** – Avaliação do efeito antinociceptivo promovido pelas FAE, FBUOH e FAq da *Croton celtidifolius*, administrada nas doses de 3 – 300 mg/kg por via intraperitoneal (i.p.), 30 min antes, sobre a reatividade da primeira fase (A) e segunda fase (B) e edema (C), induzidos pela injeção intraplantar de formalina em camundongos. Animais controles simbolos fechados (■ ● ◆), animais tratados simbolos abertos (□ ○ ◇). Os gráficos representam as médias  $\pm$  E.P.M da reatividade e do  $\Delta$  do peso da pata de 5 – 12 animais por grupo experimental. Difere significativamente do grupo controle, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ . (ANOVA, complementado por teste Dunnett)



**Figura 12** – Avaliação do efeito antinociceptivo promovido pela catequina (cat), galocatequina (gal) e sub-frações de *Croton celtidifolius*, administradas na dose de 30 mg/kg por via intraperitoneal, 30 min antes, sobre a reatividade da primeira fase (A) e segunda fase (B) e edema (C), induzidos pela injeção intraplantar de formalina em camundongos. Os gráficos representam as médias  $\pm$  E.P.M da reatividade e do  $\Delta$  do peso da pata de 5 – 10 animais por grupo experimental. Difere significativamente do grupo controle, \*\* $p < 0,01$ . (ANOVA, complementado por teste Dunnett)

#### **4.2.3 Edema de Pata em Camundongos Induzido pela Carragenina.**

No grupo dos animais tratados com veículo, por via i.p. ou oral, a injeção intraplantar de carragenina (300 µg/pata) promoveu a formação de um edema progressivo, que foi avaliado nos tempos 0, 30, 60 120 e 240 min.

Após 4 h da injeção de carragenina os animais controle tiveram um aumento entre  $76,7 \pm 3,7$  e  $99,2 \pm 4,6 \times 10^{-3}$  mL no volume da pata (fig. 13, 14, 15, 16 e 17 e tab. 2, 3, 4, 5 e 6).

Todos os resultados de inibições percentuais que serão apresentadas abaixo são correspondentes a diferença percentual da área sob a curva dos gráficos entre animais controle e animais tratados.

O grupo de animais, tratados 1 h antes com EB por via oral, demonstraram uma redução significativa do edema, nas doses de 100 e 300 mg/kg, esta redução foi respectivamente de 27,7 e 35,6 % (fig. 13 e tab. 2).

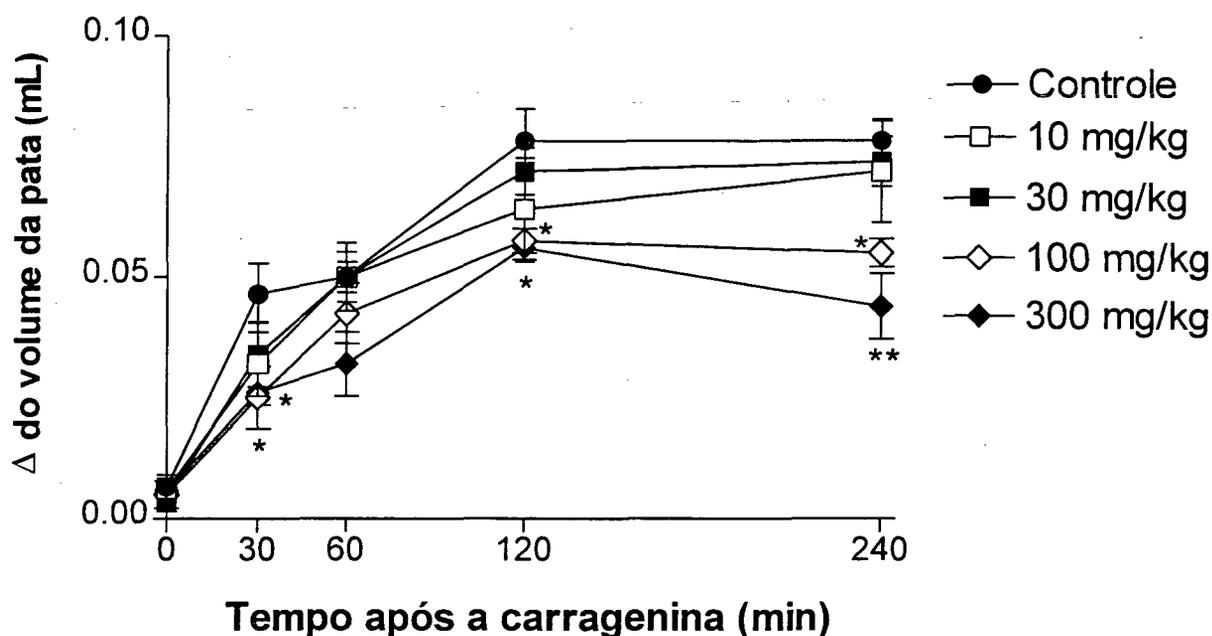
A FAE reduziu significativamente o edema de pata em 30,4 e 43,3 %, respectivamente na doses de 100 e 300 mg/kg, por v.o. Do mesmo modo quando administrada por via i.p., a FAE, nas doses de 10, 30 e 100 mg, reduziu significativamente o edema em 31,1; 52,7 e 72,6 % respectivamente (fig. 14 e tab. 3).

A administração, por v.o., da FBUOH reduziu significativamente o edema apenas no tempo de 120 min na dose de 300 mg/kg ( $35,75 \pm 6,6 \times 10^{-3}$  mL) e no tempo de 240 min nas doses 30, 100 e 300 mg/kg ( $63,8 \pm 3,8$ ;  $57,7 \pm 5,1$  e  $64,4 \pm 1,8 \times 10^{-3}$ ) respectivamente. No entanto, a administração por via i.p. reduziu significativamente o edema em 38,1; 56,8 e 74,3%, nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, respectivamente. (fig. 15 e tab. 4).

Como a FBUOH, a administração da FAq, por v.o., reduziu significativamente o edema apenas no tempo de 120 min na dose de 300 mg/kg ( $40,0 \pm 3,7 \times 10^{-3}$  mL) e no tempo de 240 min nas doses 30, 100 e 300 mg/kg ( $68,3 \pm 6,0$ ;  $55,0 \pm 8,5$  e  $38,3 \pm 6,0 \times 10^{-3}$ ), respectivamente. A administração da mesma fração por via i.p. reduziu significativamente o edema em 35,2; 60,4 e 61,0, nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, respectivamente. (fig. 16 e tab. 5).

Nas mesmas condições experimentais, o tratamento com as sub-frações catequina, 35 SF e 63 SF na dose de 30 mg/kg, via i.p. reduziu o edema de pata induzido pela carragenina em 28,9; 56,3 e 59,9 %, respectivamente. (fig. 17B e tab. 6).

A fração éter dietílico (dados não apresentados), sub-frações 19SF, 26SF e 51SF e galocatequina, não demonstraram reduzir o edema de pata. (Fig. 17A)



**Figura 13** - Efeito antiedematogênico induzido pelo EB da *Croton celtidifolius* nas doses de 10 - 300 mg/kg, administrado por via oral, 1 hora antes, sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina (300  $\mu$ g/pata). Os animais controle receberam apenas veículo. Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M. do  $\Delta$  edema de 6 - 10 animais por grupo experimental, e diferem significativamente do grupo controle, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  (ANOVA, complementado por teste Dunnett).

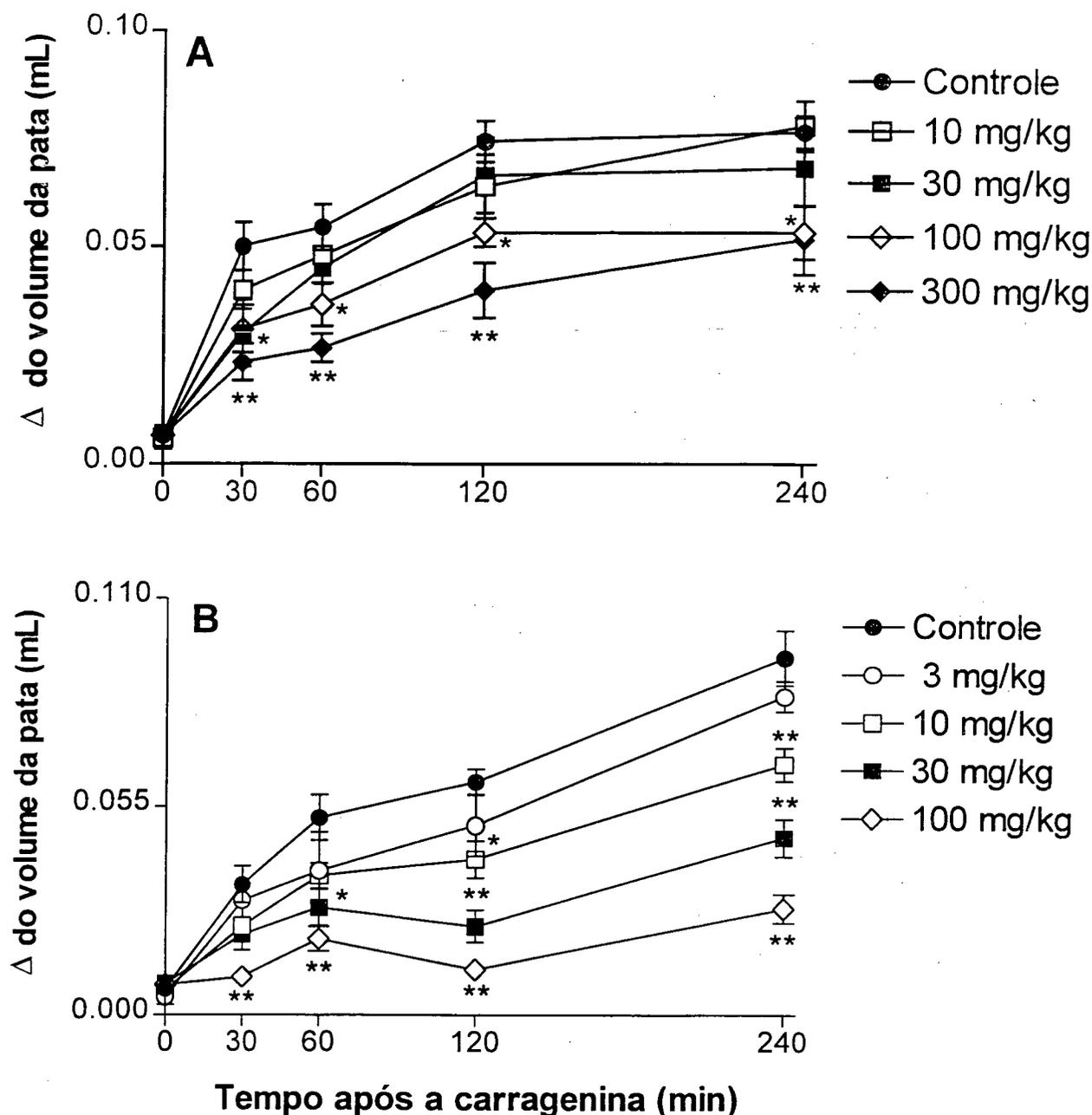
**Tabela 2** - Efeito antiedematogênico do EB da *Croton celtidifolius* administrada por via oral (v.o.), no edema de pata em camundongos.

| Grupos          | Dose<br>mg/kg | Edema de pata induzido por carragenina<br>(média ± E.P.M.) 10 <sup>-3</sup> (ml) |                 |                 |                 | Inibição<br>Edema<br>(%) |
|-----------------|---------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
|                 |               | 30 min   | 60 min          | 120 min         | 240 min         |                          |
| <b>Controle</b> | <b>v.o.</b>   | <b>46,7±6,1</b>  | <b>50,0±5,2</b> | <b>78,3±6,5</b> | <b>78,3±4,0</b> | <b>0,0</b>               |
| EB              | 10            | 32,0±6,6   | 50,0±3,2        | 64,0±10         | 72,0±10         | 13,7                     |
|                 | 30            | 34,0±6,8   | 50,0±7,1        | 72,0±4,9        | 74,0±5,1        | 8,1                      |
|                 | 100           | 25,0±6,6   | 42,5±6,3        | 57,5±2,5*       | 55,0±2,9*       | 27,7                     |
|                 | 300           | 26,0±2,4*  | 32,0±6,6        | 56,0±2,4*       | 44,0±6,8**      | 35,6                     |

(n= 6-10 animais).

Difere significativamente em relação ao controle \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$

A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob a curva.



**Figura 14** – Em (A), efeito antiedematogênico induzido pela FAE da *Croton celtidifolius* nas doses de 10 - 300 mg/kg, v.o., 1 h antes. Em (B), efeito antiedematogênico induzido pela FAE nas doses de 3 - 100 mg/kg, via i.p., 30 min antes, sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina (300  $\mu$ g/pata). Os animais controle receberam apenas veículo. Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M. do  $\Delta$  edema de 6 - 10 animais por grupo experimental, e diferem significativamente do grupo controle, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ . (ANOVA, complementado por teste Dunnett)

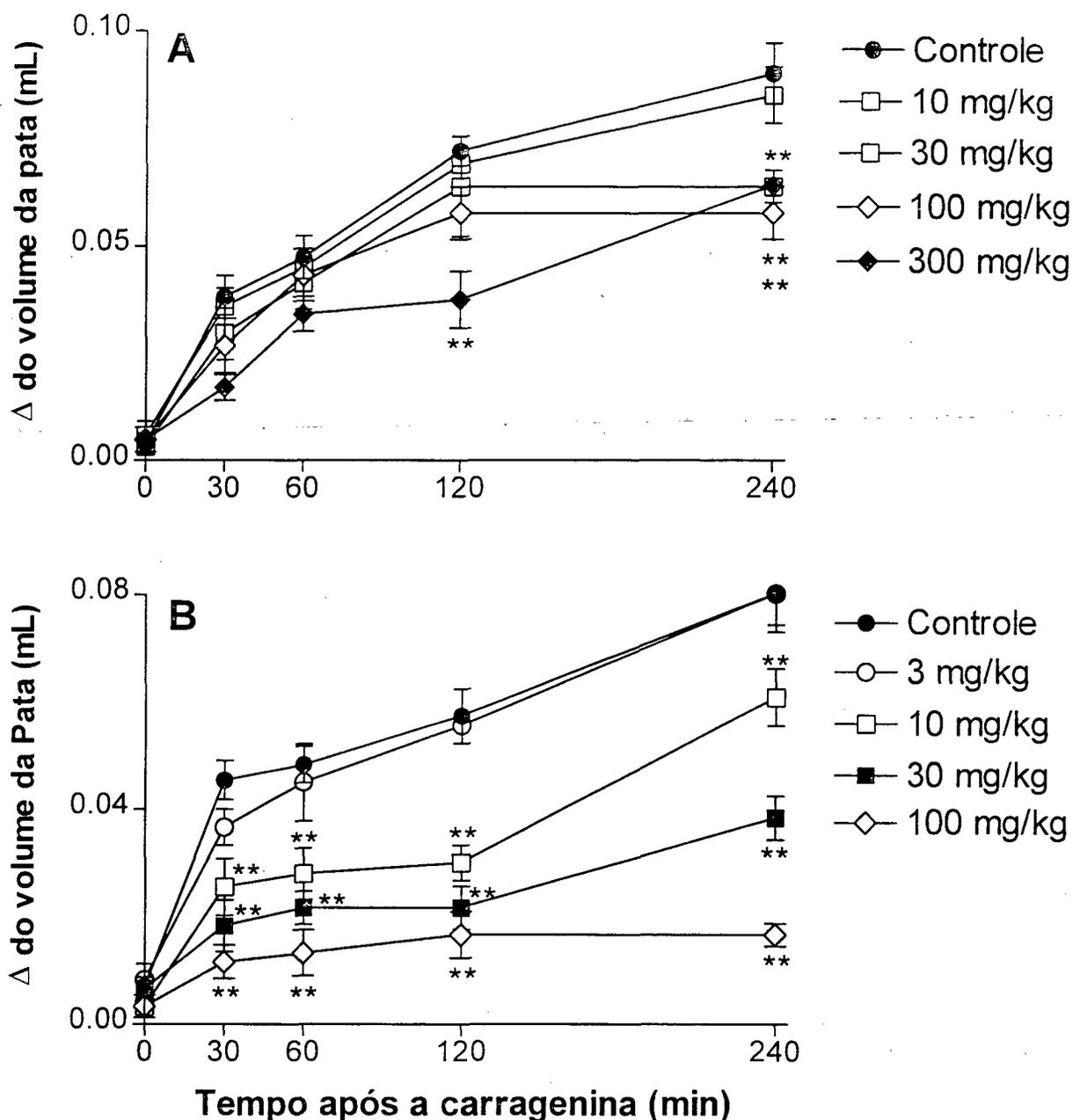
**Tabela 3** - Efeito antiedematogênico da FAE da *Croton celtidifolius* administrada por via oral (v.o.) e intraperitoneal (i.p.), sobre o edema de pata em camundongos.

| Grupos          | Dose<br>mg/kg | Edema de pata induzido por carragenina<br>(média ± E.P.M.) 10 <sup>-3</sup> (ml) |                 |                 |                 | Inibição<br>Edema<br>(%) |
|-----------------|---------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
|                 |               | 30 min   | 60 min          | 120 min         | 240 min         |                          |
| <b>Controle</b> | <b>v.o.</b>   | <b>50,0±5,5</b>  | <b>54,4±5,3</b> | <b>74,4±4,7</b> | <b>76,7±3,7</b> | <b>0,0</b>               |
| FAE             | 10            | 40,0±4,5   | 48,0±6,6        | 64,0±7,5        | 78,0±5,8        | 9,5                      |
|                 | 30            | 30,0±7,7   | 45,0±3,4        | 66,6±8,8        | 68,3±8,7        | 14,5                     |
|                 | 100           | 31,0±5,4*  | 36,7±4,9*       | 53,3±3,3*       | 53,3±6,1*       | 30,4                     |
|                 | 300           | 23,3±4,2**   | 26,7±3,3**      | 40,0±6,3**      | 51,7±7,9**      | 43,3                     |
| <b>Controle</b> | <b>i.p.</b>   | <b>34,3±4,8</b>  | <b>52,0±6,1</b> | <b>61,4±3,4</b> | <b>94,2±7,2</b> | <b>0,0</b>               |
| FAE             | 3             | 30,0±4,5   | 68,0±10,1       | 50,0±8,2        | 84,0±4,0        | 16,5                     |
|                 | 10            | 23,3±2,1   | 36,6±3,3        | 41,0±4,9*       | 66,0±4,5**      | 31,1                     |
|                 | 30            | 21,0±4,0   | 28,3±4,2*       | 23,3±4,2**      | 46,6±4,5**      | 52,7                     |
|                 | 100           | 10,0±0,5**   | 20,0±3,2**      | 12,0±2,0**      | 28,0±3,7**      | 72,6                     |

(n= 6-10 animais).

Difere significativamente em relação ao controle \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$

A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob a curva.



**Figura 15** - Em (A), efeito antiedematogênico induzido pela FBUOH da *Croton celtidifolius* nas doses de 10 - 300 mg/kg, v.o., 1 h antes. Em (B), efeito antiedematogênico induzido pela FBUOH nas doses de 3 - 100 mg/kg, via i.p., 30 min antes, sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina (300  $\mu$ g/pata). Os animais controle receberam apenas veículo. Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M. do  $\Delta$  edema de 6 - 10 animais por grupo experimental, e diferem significativamente do grupo controle, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ . (ANOVA, complementado pelo teste Dunnett)

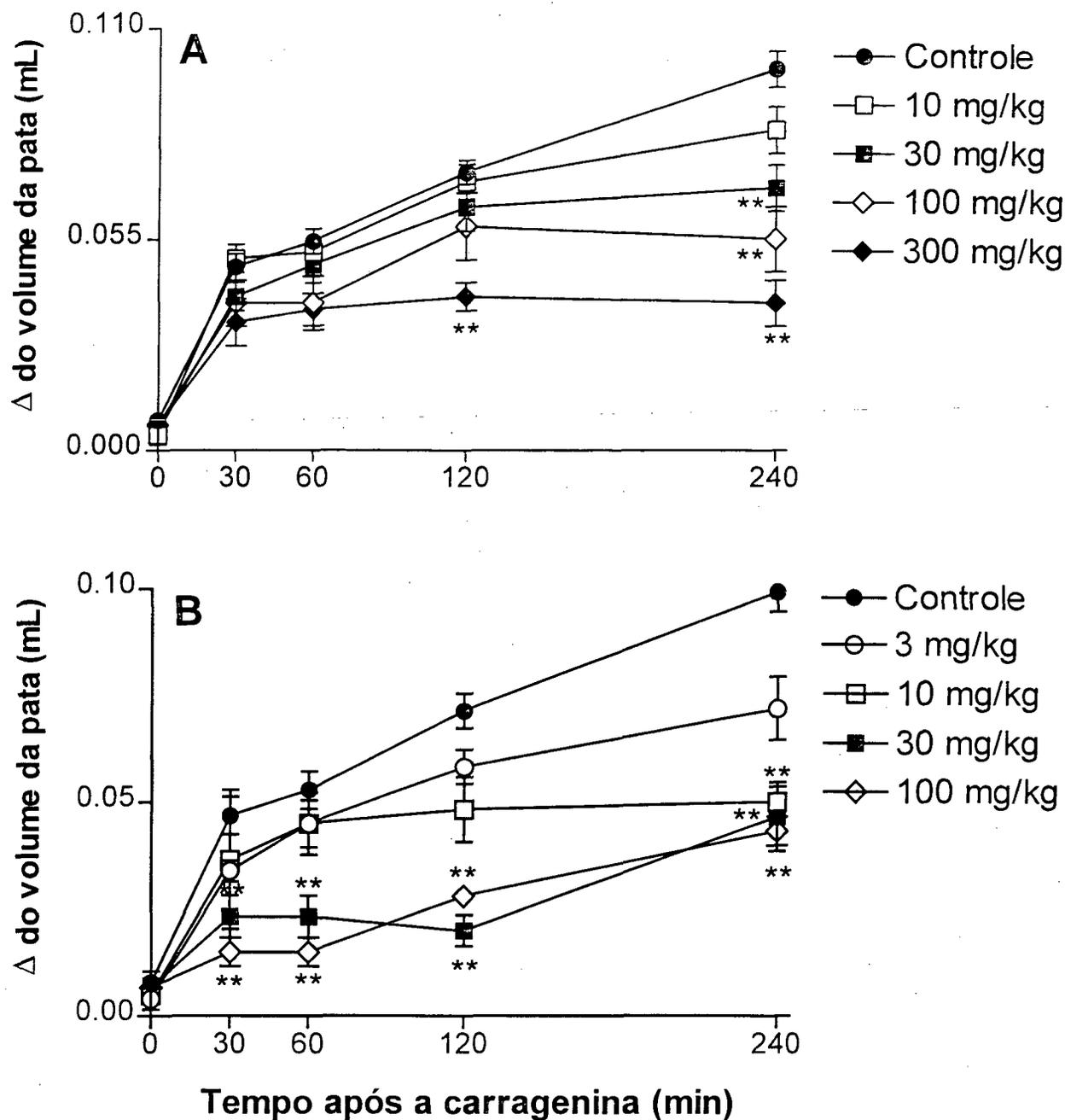
**Tabela 4** - Efeito antiedematogênico FBUOH da *Croton celtidifolius*, administrada por via oral (v.o.) e intraperitoneal (i.p.), sobre o edema de pata em camundongos.

| Grupos          | Dose<br>mg/kg | Edema de pata induzido por carragenina<br>(média ± E.P.M.) 10 <sup>-3</sup> (ml) |                 |                 |                 | Inibição<br>Edema<br>(%) |
|-----------------|---------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
|                 |               | 30 min   | 60 min          | 120 min         | 240 min         |                          |
| <b>Controle</b> | <b>v.o.</b>   | <b>38,2±5,0</b>  | <b>47,4±5,0</b> | <b>72,0±3,3</b> | <b>90,0±7,1</b> | <b>0,0</b>               |
| FBUOH           | 10            | 36,0±4,3   | 45,0±2,2        | 69,0±3,4        | 85,0±6,5        | 4,71                     |
|                 | 30            | 29,6±6,0   | 41,5±6,2        | 63,8±11         | 63,8±3,8**      | 18,7                     |
|                 | 100           | 26,8±6,4   | 43,3±6,1        | 57,7±6,2        | 57,7±5,1**      | 24,6                     |
|                 | 300           | 17,0±3,0   | 34,3±4,1        | 37,5±6,6**      | 64,0±1,8**      | 38,6                     |
| <b>Controle</b> | <b>i.p.</b>   | <b>45,5±3,7</b>  | <b>48,3±3,4</b> | <b>57,3±5,1</b> | <b>80,0±5,8</b> | <b>0,0</b>               |
| FBUOH           | 3             | 36,7±3,3   | 45,0±7,2        | 55,5±5,0        | 80,0±7,1        | 4,12                     |
|                 | 10            | 25,6±5,3**   | 28,0±4,8**      | 30,0±3,3**      | 60,7±5,3**      | 38,1                     |
|                 | 30            | 18,3±4,8**   | 21,7±3,1**      | 21,7±4,0**      | 38,3±4,0**      | 56,8                     |
|                 | 100           | 11,7±3,1**   | 13,3±4,2**      | 16,7±4,2**      | 16,7±2,1**      | 74,3                     |

(n= 6-10 animais).

Difere significativamente em relação ao controle \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$

A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob a curva.



**Figura 16** - Em (A), efeito antiedematogênico induzido pela FAq da *Croton celtidifolius* nas doses de 10 - 300 mg/kg, v.o., 1 h antes. Em (B), efeito antiedematogênico induzido pela FAq nas doses de 3 - 100 mg/kg, via i.p., 30 min antes, sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina (300  $\mu$ g/pata). Os animais controle receberam apenas veículo. Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M. do  $\Delta$  edema de 6 - 10 animais por grupo experimental, e diferem significativamente do grupo controle, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ . (ANOVA, complementado pelo teste Dunnett)

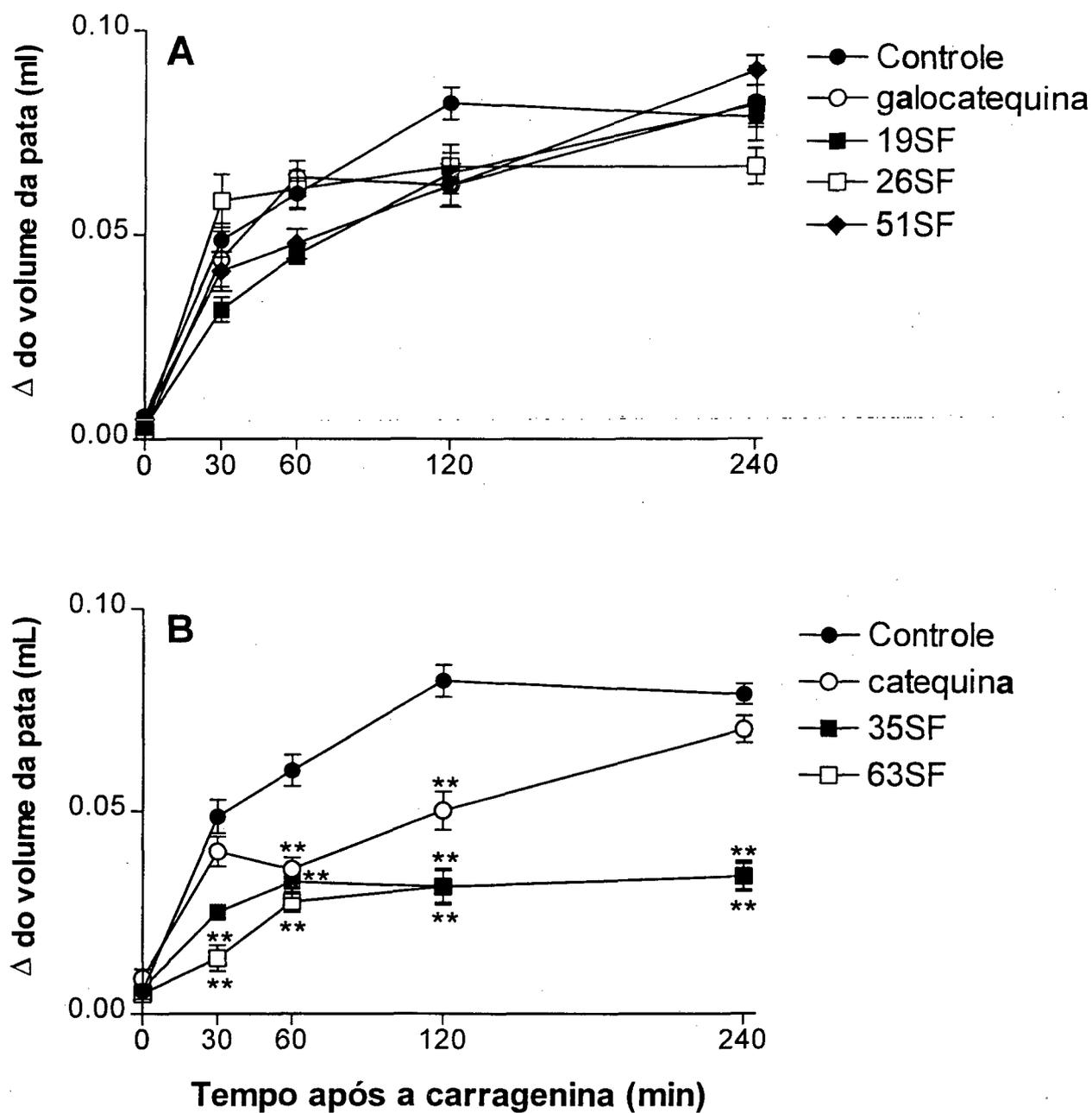
**Tabela 5** - Efeito antiedematogênico da FAq da *Croton celtidifolius*, administrada por via oral (v.o.) e intraperitoneal (i.p.), sobre o edema de pata em camundongos.

| Grupos          | Dose<br>mg/kg | Edema de pata induzido por carragenina<br>(média ± E.P.M.) 10 <sup>-3</sup> (ml) |                 |                 |                 | Inibição<br>Edema<br>(%) |
|-----------------|---------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
|                 |               | 30 min   | 60 min          | 120 min         | 240 min         |                          |
| <b>Controle</b> | <b>v.o.</b>   | <b>46,9±4,4</b>  | <b>52,9±4,4</b> | <b>71,4±4,0</b> | <b>99,2±4,6</b> | <b>0,0</b>               |
| FAq             | 10            | 50,0±3,7   | 51,7±6,0        | 70,0±4,5        | 83,4±6,1        | 7,83                     |
|                 | 30            | 40,0±3,7   | 48,3±4,8        | 63,3±6,1        | 68,3±6,0**      | 19,6                     |
|                 | 100           | 38,3±6,0   | 38,3±7,0        | 58,3±8,7        | 55,0±8,5**      | 30,1                     |
|                 | 300           | 33,3±6,1   | 36,7±4,2        | 40,0±3,7**      | 38,3±6,0**      | 47,5                     |
| <b>Controle</b> | <b>i.p.</b>   | <b>46,9±4,4</b>  | <b>52,9±4,4</b> | <b>71,4±4,0</b> | <b>99,2±4,6</b> | <b>0,0</b>               |
| FAq             | 3             | 34,0±2,4   | 45,0±7,2        | 58,3±4,0        | 72,0±7,3        | 22,2                     |
|                 | 10            | 36,7±1,6   | 45,0±5,5        | 48,3±7,5        | 50,0±3,7**      | 35,2                     |
|                 | 30            | 23,3±5,0**   | 23,3±4,9**      | 20,0±3,7**      | 46,7±8,0**      | 60,4                     |
|                 | 100           | 15,0±3,4**   | 15,0±3,4**      | 28,0±2,0**      | 43,3±3,3**      | 61,0                     |

(n= 6-10 animais).

Difere significativamente em relação ao controle \* p<0,05 e \*\* p<0,01

A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob a curva.



**Figura 17-** Efeito antiedematogênico induzido pela galocatequina, 19SF, 26SF, 51SF (A) e catequina, 35SF e 63SF (B) na dose de 30 mg/kg, administrado via i.p., 30 min antes, sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina (300  $\mu$ g/pata). Os animais controle receberam apenas veículo. Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M. do  $\Delta$  edema de 6 – 10 animais por grupo experimental, e diferem significativamente do grupo controle, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ . (ANOVA, complementado pelo teste Dunnett)

**Tabela 6** - Efeito antiedematogênico das sub-frações e compostos isolados da *Croton celtidifolius*, administrados por via i.p., sobre o edema de pata em camundongos.

| Grupos          | Dose<br>mg/kg<br>i.p. | Edema induzido pela carragenina<br>(Média ± E.P.M.) 10 <sup>-3</sup> (mL) |                 |                 |                 | Inibição<br>edema<br>(%) |
|-----------------|-----------------------|---|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
|                 |                       | 30 min  | 60 min          | 120 min         | 240 min         |                          |
| <b>Controle</b> |                       | <b>48.7±4.1</b>   | <b>60.0±3.9</b> | <b>82.0±3.9</b> | <b>78.7±2.6</b> | <b>0.0</b>               |
| galocatequina   | 30                    | 44,0±6,8  | 64,0±4,0        | 62,0±4,9        | 82,0±9,1        | 9,91                     |
| 19SF            | 30                    | 31,7±3,1  | 45,0±2,2        | 65,0±5,0        | 81,7±4,8        | 15,8                     |
| 26SF            | 30                    | 58,3±6,5  | 61,1±4,5        | 66,6±5,3        | 66,6±4,4        | 11,1                     |
| 51SF            | 30                    | 41,0±4,8  | 47,7±3,6        | 62,0±5,3        | 90,0±3,6        | 11,7                     |
| catequina       | 30                    | 40,0±3,7  | 35,5±2,9**      | 50,0±4,7**      | 70,0±3,3        | 28,9                     |
| 35SF            | 30                    | 25,0±1,9**  | 32,5±4,1**      | 31,2±4,4**      | 33,7±3,2**      | 56,3                     |
| 63SF            | 30                    | 13,7±3,2**  | 27,5±2,5**      | 31,3±3,9**      | 33,8±3,7**      | 59,9                     |

(n= 6-10 animais).

Difere significativamente em relação ao controle \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$

A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob a curva.

#### **4.2.4 Pressão Arterial em Ratos Anestesiados.**

Para se descartar um possível efeito vasoconstritor da FAE, a mesma foi administrada por via endovenosa em ratos anestesiados.

A pressão arterial média (PAM) basal, após a estabilização, foi de  $76,8 \pm 0,83$  mmHg. A administração da FAE nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, por via endovenosa, não alterou significativamente a PAM dos ratos, que foi de  $77,2 \pm 1,8$ ;  $77,2 \pm 2,1$  e  $70,9 \pm 3,9$  mmHg, respectivamente.

Quando administrada por via endovenosa, a acetilcolina ( $10^{-6}$  M) reduziu significativamente a PAM dos ratos anestesiados em 35,9 % ( $49,3 \pm 1,1$  mmHg) (fig. 18A e B).

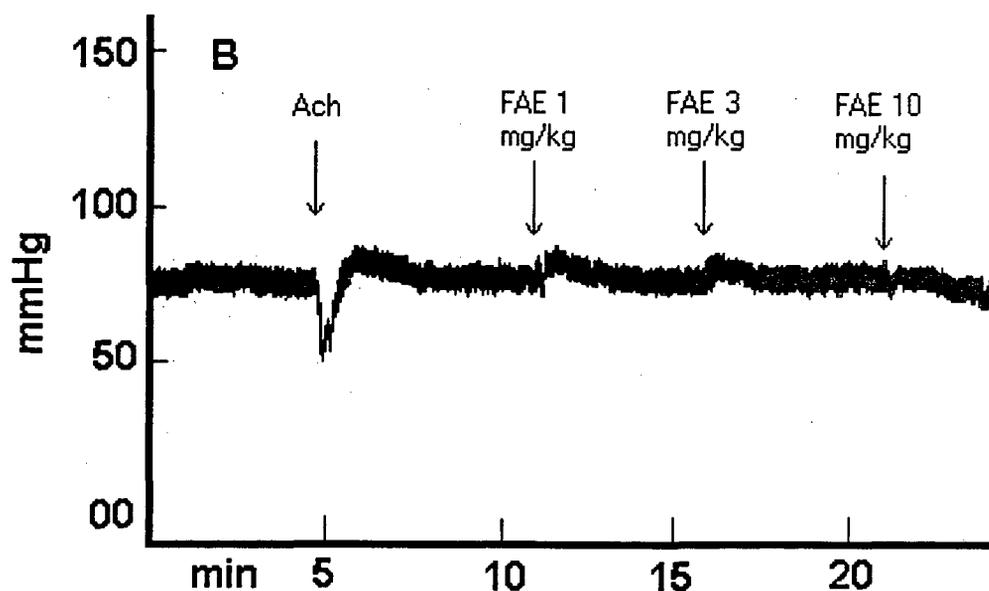
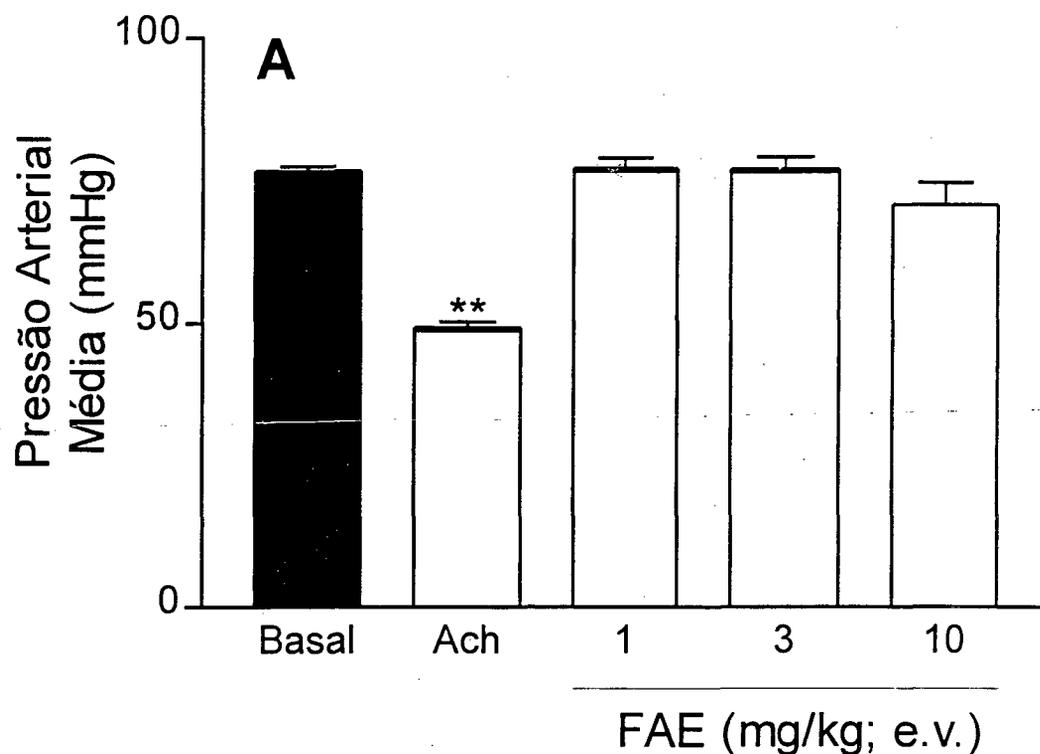


Figura 18 - Efeito da FAE da *Croton celtidifolius* nas doses de 1 - 10 mg/kg, administrado por via endovenosa, sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos anestesiados (A). Gráfico B representa o melhor registro típico da PAM de 1 entre 3 animais. Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M. da PAM de 3 animais, e diferem significativamente do grupo controle,  $**p < 0,01$ . (ANOVA, complementado por teste Dunnett)

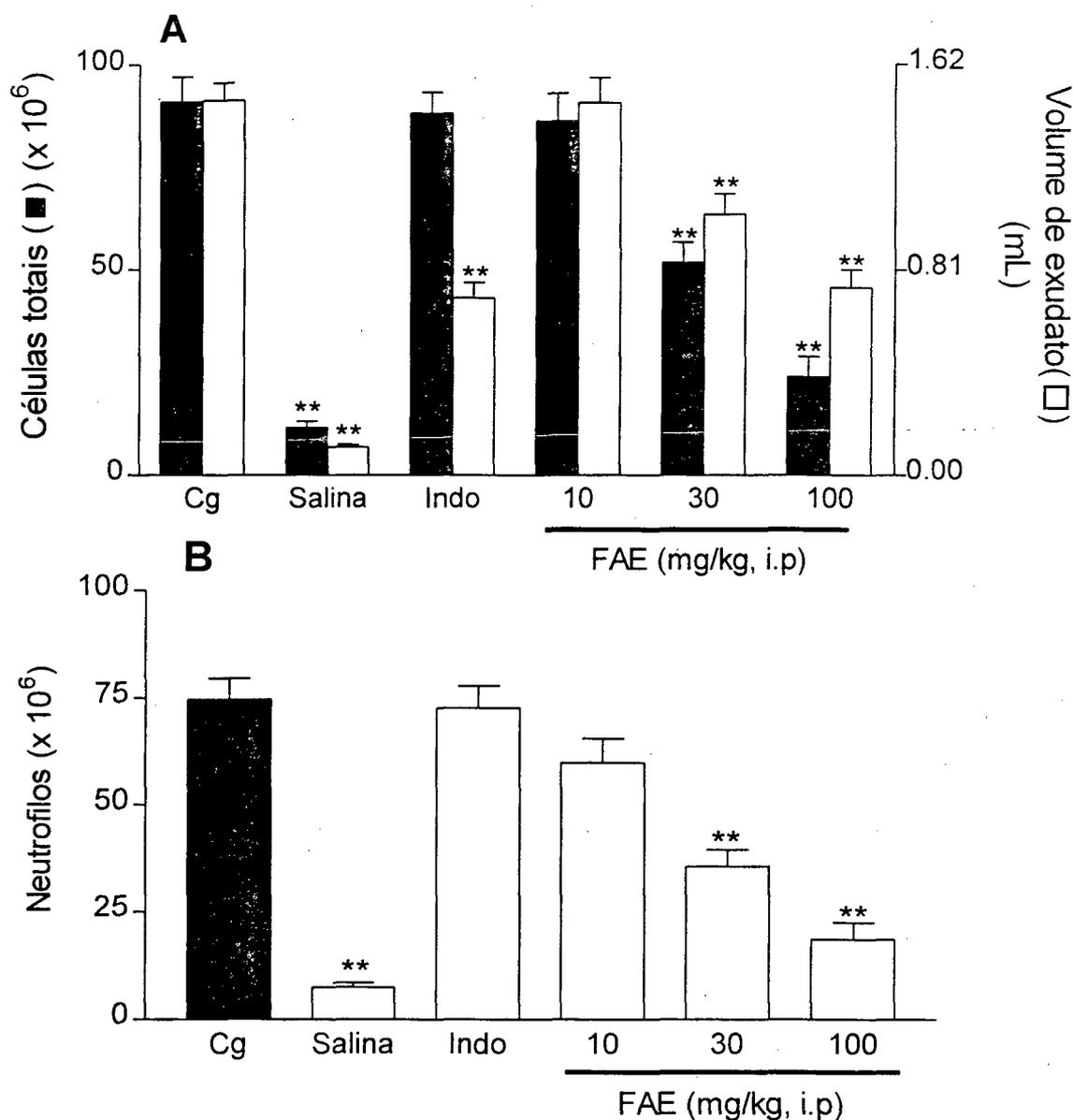
#### **4.2.5. Teste da Pleurisia Induzida pela Carragenina em Ratos.**

A injeção de carragenina 1% na cavidade pleural de ratos tratados com veículo (animais controle) promoveu aumento tanto no volume de exudato  $1,48 \pm 0,07$  mL, quanto na migração celular  $91,1 \pm 6,08 \cdot 10^6$  células por cavidade (fig. 19A e 20A e tab. 7), sendo  $74,7 \pm 4,9 \cdot 10^6$  polimorfonucleares por cavidade (fig. 19B e 20B).

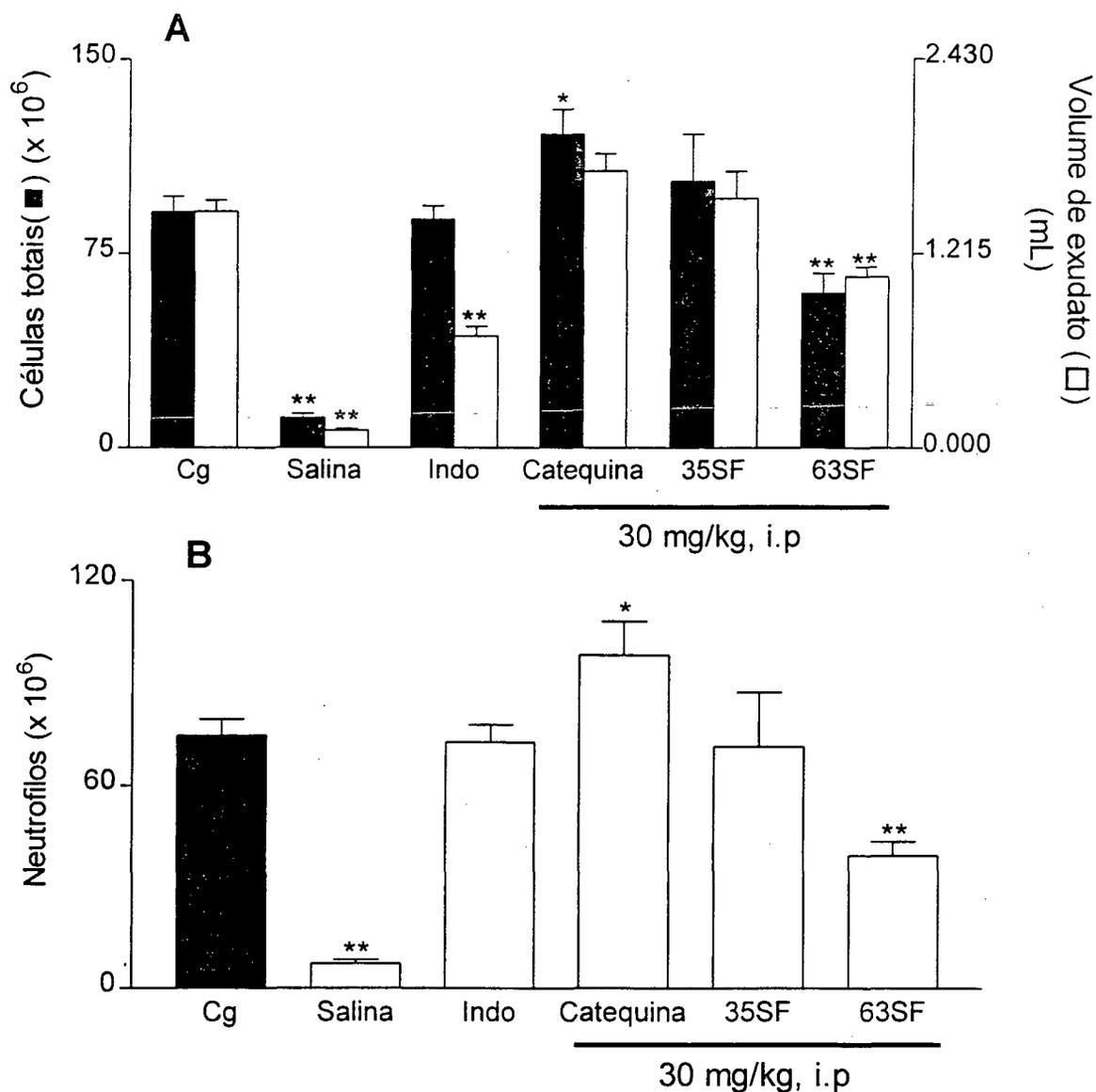
O tratamento prévio dos animais por via intraperitoneal com a FAE, 30 min antes do agente flogístico, inibiu, significativamente e de maneira dose dependente, tanto o aumento do volume de exudato quanto a migração celular, em relação ao grupo controle. (fig. 19A e tab. 7).

Em outro grupo experimental, os animais foram tratados com catequina, 35SF e 63SF, por via intraperitoneal na dose de 30 mg/kg, 30 min antes do agente flogístico. Apenas a 63SF inibiu significativamente a migração celular,  $59,8 \pm 7,5 \cdot 10^6$  células por cavidade e o aumento do volume de exudato da cavidade,  $1,07 \pm 0,06$  mL. A 35SF não reduziu a migração celular e nem o aumento do volume do exudato na cavidade peritoneal de ratos. A catequina promoveu um aumento da migração celular mas não alterou o volume do exudato (fig. 20A e tab. 7).

O tratamento com indometacina não reduziu a migração celular. No entanto provocou uma inibição significativa do aumento do volume de exudato  $0,7 \pm 0,06$  mL, em relação ao grupo controle (fig. 19A).



**Figura 19** - Efeito antiinflamatório da FAE da *Croton celtidifolius* administrada por via i.p., 30 min antes da pleurisia induzida pela carragenina 1%, em ratos. No gráfico A as barras fechadas (■) indicam as células totais ( $10^6$ ) e as barras abertas (□) o volume de exudato (mL). (Cg) carragenina, (Indo) Indometacina. O gráfico B demonstra os neutrófilos ( $10^6$ ). As colunas e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M das células totais, volume de exudato e neutrófilos de 4 – 8 animais por grupo experimental. Diferem significativamente do controle \*\* $p < 0,01$ . (ANOVA complementado por teste Dunnett).



**Figura 20** - Efeito da catequina, 35SF e 63SF da *Croton celtidifolius* administrada por via i.p., 30 min antes da pleurisia induzida pela carragenina 1% em ratos. No gráfico A as barras fechadas (■) indicam as células totais ( $10^6$ ) e as barras abertas (□) o volume de exudato (mL). (Cg) carragenina, (Indo) Indometacina. O gráfico B demonstra os neutrófilos ( $10^6$ ). As colunas e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M das células totais, volume de exudato e neutrófilos de 4 – 8 animais por grupo experimental. Diferem significativamente do controle  $**p < 0,01$ . (ANOVA complementado por teste Dunnett)

**Tabela 7** - Efeito antiinflamatório promovido pela administração intraperitoneal da FAE, 35SF e 63SF, catequina e indometacina na pleurisia induzida por carragenina em ratos.

| Grupos       | Dose (mg/kg) | Células Totais ( $\times 10^6$ ) | % de inibição | Volume de exudato (mL) | % de inibição |
|--------------|--------------|----------------------------------|---------------|------------------------|---------------|
| Controle     |              | 91,09 $\pm$ 6,08                 | -             | 1,48 $\pm$ 0,07        | -             |
| Salina       |              | 11,50 $\pm$ 1,66 **              | -             | 0,11 $\pm$ 0,01 **     | -             |
| FAE          | 10           | 86,32 $\pm$ 6,69                 | 5,23          | 1,47 $\pm$ 0,10        | 0             |
|              | 30           | 51,78 $\pm$ 4,89 **              | 43,1          | 1,03 $\pm$ 0,08 **     | 30,4          |
|              | 100          | 24,08 $\pm$ 4,84 **              | 73,6          | 0,74 $\pm$ 0,07 **     | 50,0          |
| Catequina    | 30           | 121,1 $\pm$ 9,60 *               | 0             | 1,73 $\pm$ 0,11        | 0             |
| 35SF         | 30           | 102,9 $\pm$ 18,3                 | 0             | 1,23 $\pm$ 0,17        | 16,9          |
| 63SF         | 30           | 59,80 $\pm$ 13,0 **              | 34,4          | 1,07 $\pm$ 0,06 **     | 27,7          |
| Indometacina | 30           | 88,10 $\pm$ 5,17                 | 3,28          | 0,70 $\pm$ 0,06 **     | 52,7          |

n = 4 – 8 animais por grupo experimental. ANOVA complementado por teste Dunnett.

Difere significativamente do controle \*\* $p < 0,01$

### 4.3. RESULTADOS BIOQUIMICOS “ex vivo”.

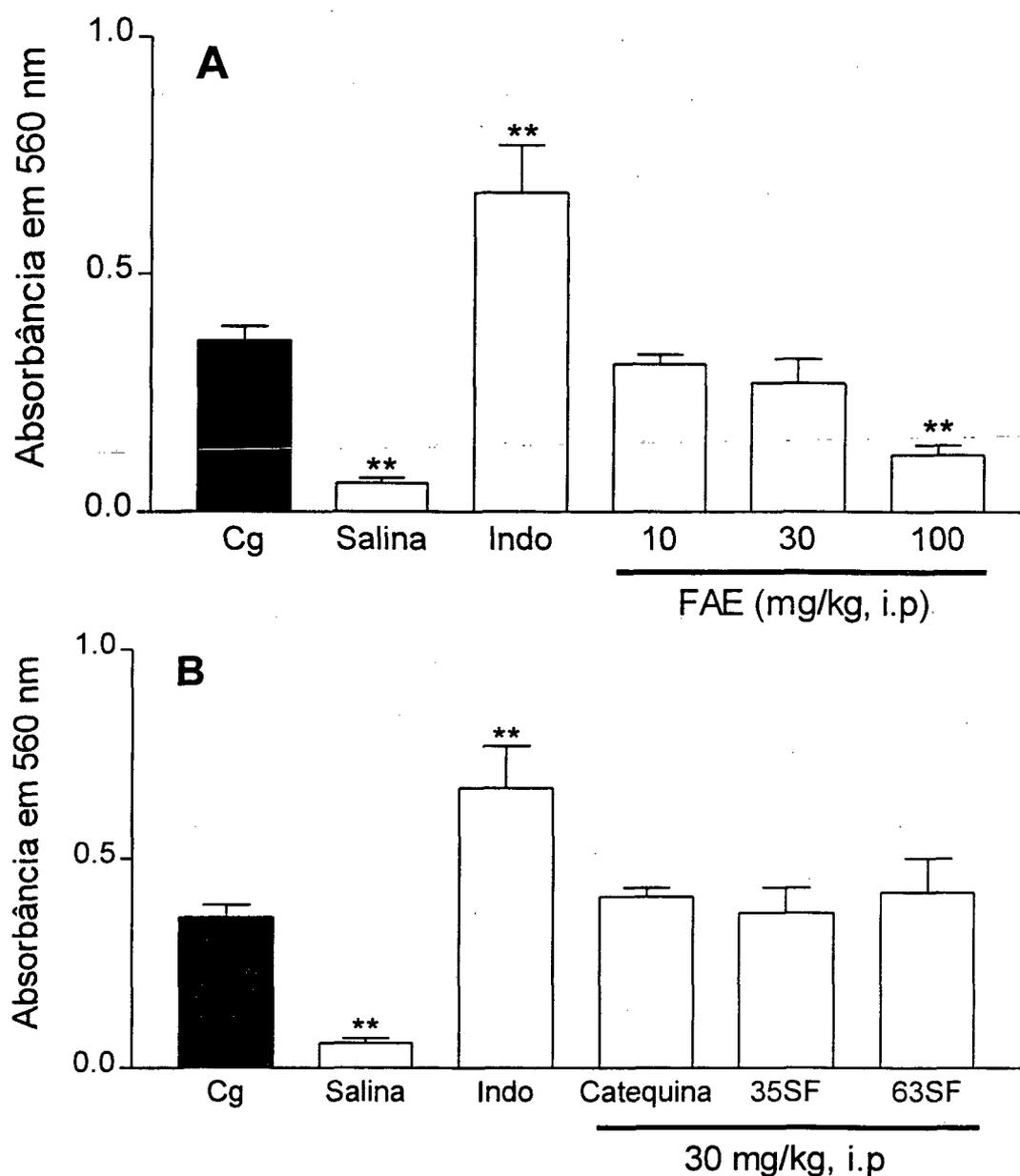
#### 4.3.1. Produção de Radical Ânion Superóxido por Células da Cavidade Pleural de Ratos Submetidos a Pleurisia.

Nos animais que receberam a injeção intrapleural de carragenina 1 % (animais controle), a incubação das células com NBT, promoveu a formação do produto reduzido do NBT o formazam, onde se obteve uma absorbância de  $0,360 \pm 0,03$  nm (fig. 21A e B).

Nas células dos animais tratados por via i.p. com FAE nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, ocorreu uma redução na absorbância de 13,8 %;  $0,31 \pm 0,02$  nm, 25,0 %;  $0,27 \pm 0,05$  nm e 66,7 %;  $0,12 \pm 0,02$  nm respectivamente (fig. 21A).

No grupo dos animais que receberam por via i.p. catequina, 35SF e 63SF, não ocorreu redução dos níveis de formazam. (fig. 21B).

Nas mesmas condições experimentais, nos animais que receberam indometacina 10 mg/kg por via i.p., a incubação das células isoladas da cavidade pleural, aumentou a absorbância em 83 %;  $0,670 \pm 0,1$  nm (fig. 21A e B).



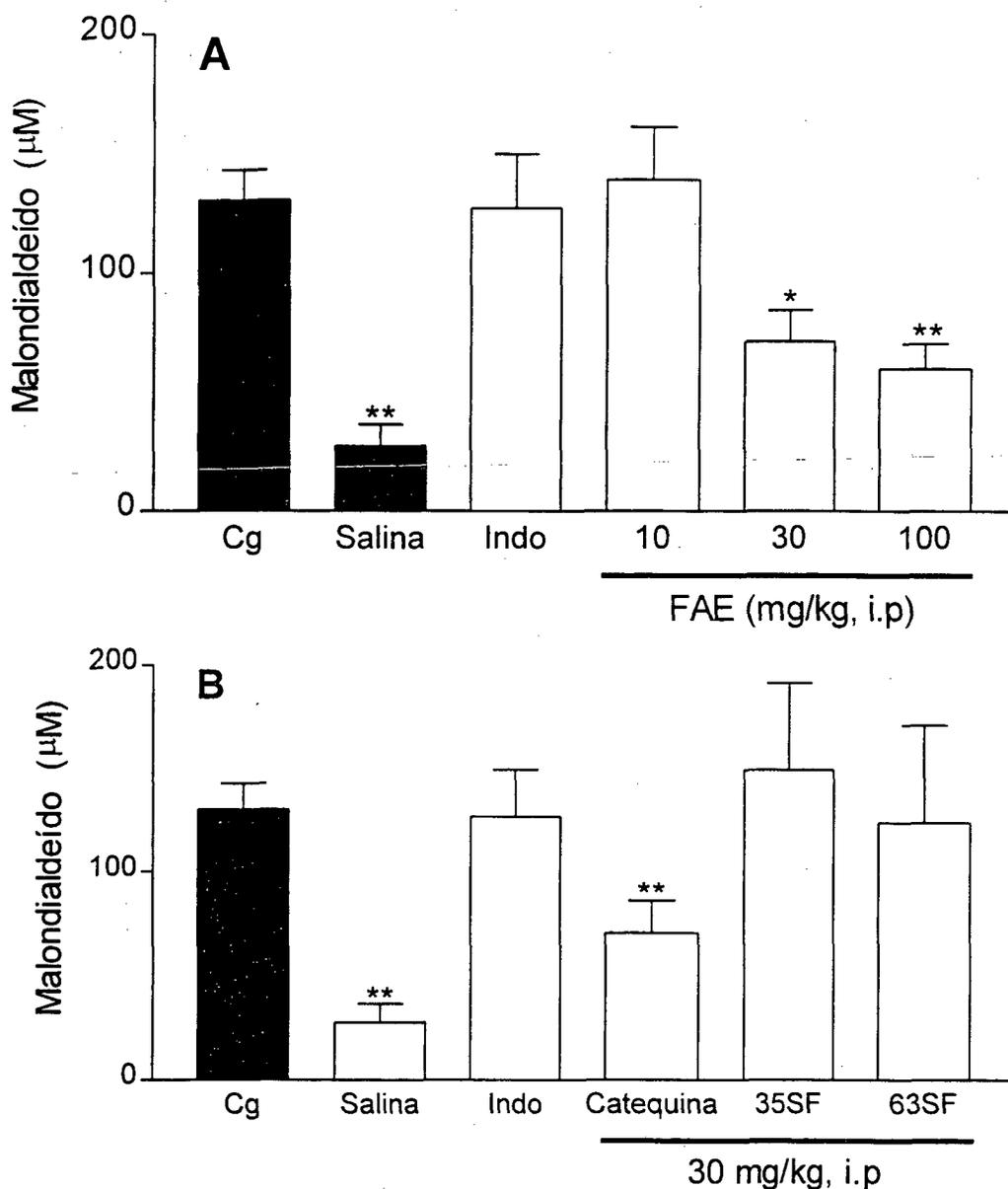
**Figura 21** - Efeito da FAE (A), catequina, 35SF e 63SF (B) da *Croton celtidifolius* administradas por via i.p. sobre a formação do produto reduzido do NBT pelo radical ânion superóxido, das células isoladas da cavidade pleural de ratos. (Cg) carragenina, (Indo) Indometacina. As colunas e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M da absorbância a 560 nm do formazam. 4 – 8 animais por grupo experimental que diferem significativamente do controle  $**p < 0,01$ . (ANOVA, complementado pelo teste Dunnett)

#### **4.3.2 – Índice de Peroxidação Lipídica nas Células Isoladas da Cavidade Pleural de Ratos Submetidos a Pleurisia.**

Após o isolamento e a preparação das células provenientes da cavidade pleural de ratos, as mesmas foram aliquotadas e submetidas ao teste da peroxidação lipídica. As células dos animais controle apresentaram um nível elevado de peroxidação, com um índice de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico, entre elas o malondialdeído, de  $130,6 \pm 12,5 \mu\text{M}$  (Figura 22A e B).

No grupos dos animais tratados com FAE ocorreu uma redução significativa dos níveis de lipoperoxidação nas doses de 30 e 100 mg/kg, i.p., que foi de 45,17% ( $71,6 \pm 12,9 \mu\text{M}$ ) e 54,13 % ( $59,9 \pm 10,6 \mu\text{M}$ ), respectivamente (fig. 22A). Do mesmo modo, o tratamento com catequina reduziu significativamente a peroxidação lipídica das células em 46,09 % ( $70,4 \pm 15,6 \mu\text{M}$ ) (fig. 22B).

Nos animais tratados com as sub-frações 35SF e 63SF 30 mg/kg i.p. e indometacina 10 mg/kg i.p. não foi observada redução dos níveis de peroxidação lipídica (fig. 22B).



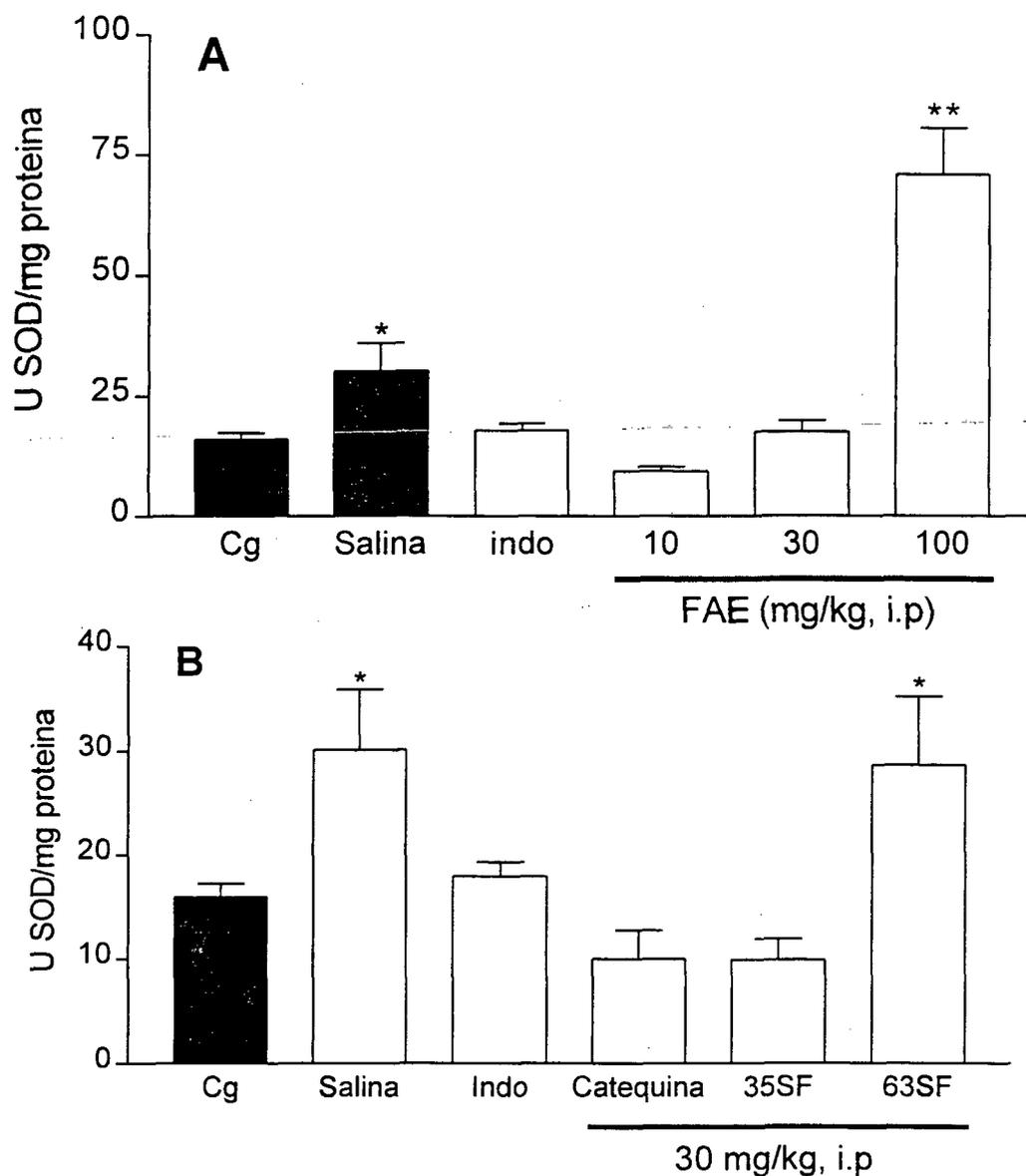
**Figura 22** – Níveis de malondialdeído, como índice de peroxidação lipídica, em células isoladas da cavidade pleural de ratos tratados por via i.p. com FAE (A), catequina, 35SF e 63SF (B) da *Croton celtidifolius*. (Cg) carragenina, (Indo) Indometacina. As colunas e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M da concentração molar de malondialdeído de 4 – 8 animais por grupo experimental que diferem significativamente do controle \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ . (ANOVA, complementado teste Dunnett).

#### **4.3.3. Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD) das Células Isoladas da Cavidade Pleural de Ratos Submetidos a Pleurisia.**

A medida da atividade da SOD se baseia na inibição da redução do citocromo C pelo  $O_2^{\bullet-}$ . A adição de uma amostra, promove uma inibição na velocidade de redução de citocromo C, uma vez que a SOD dismuta o  $O_2^{\bullet-}$  gerado no sistema e reduz a velocidade de redução do citocromo C. Uma unidade (U) de SOD é definida como a quantidade da enzima que promove 50 % de inibição na redução do citocromo c (Robak e Gryglewski, 1988).

Nas células dos animais controle a atividade da SOD foi de  $16,0 \pm 1,3$  U SOD/mg de proteína. O tratamento prévio dos animais com a FAE, na dose de 100 mg/kg i.p., e com 63SF na dose de 30 mg/kg i.p., provocou um aumento da atividade da enzima superóxido dismutase nas células isoladas da cavidade pleural de ratos em 443 % ( $70,7 \pm 9$  U SOD/mg de proteína) e 179% ( $28,6 \pm 6,5$  U SOD/mg de proteína), respectivamente, quando comparados com o controle.

Os grupos de animais tratados com 35SF e indometacina, não apresentaram diferenças significativas na atividade da SOD.

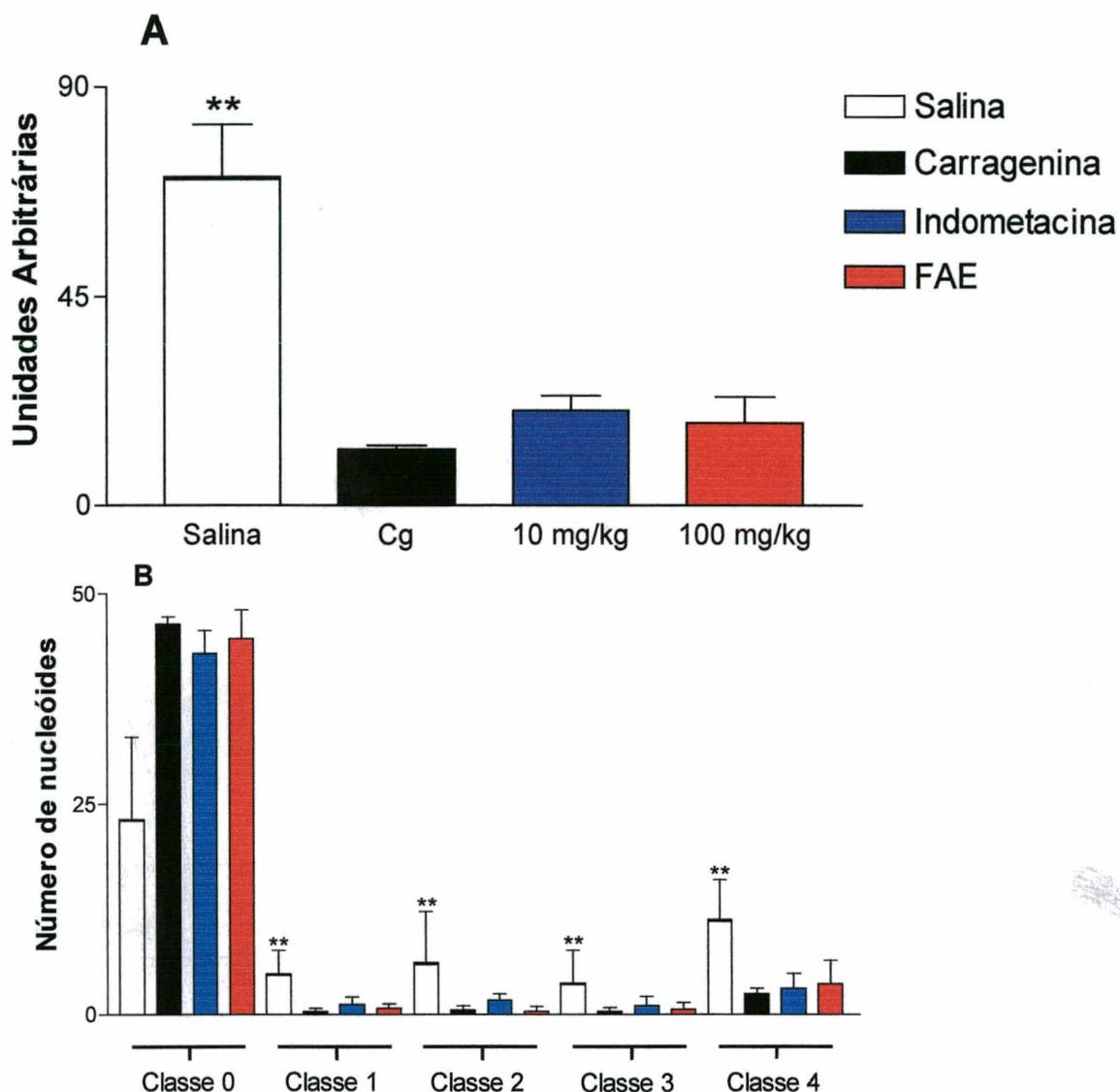


**Figura 23** – Efeito do tratamento por via i.p. da FAE (A), catequina, 35SF e 63SF (B) da *Croton celtidifolius*, na atividade da enzima SOD de células isoladas da cavidade pleural de ratos submetidos à pleurisia. (Cg) carragenina, (Indo) Indometacina. As colunas e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M de U SOD/mg de proteína. 4 – 8 animais por grupo experimental que diferem significativamente do controle \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ . (ANOVA complementado pelo teste Dunnett)

#### **4.3.4. Teste do Cometa em Células Isoladas da Cavidade Pleural de Ratos Submetidos a Pleurisia.**

A administração da FAE na dose de 100 mg/Kg e indometacina 10 mg/Kg, demonstra que as mesmas não foram capazes de induzir um aumento ou provocar uma redução dos danos totais ao DNA (fig. 24A) ou danos por classes individuais (fig. 24B), quando comparados com o grupo controle que foi de  $12,1 \pm 0,86$  unidades arbitrárias .

Entretanto, os animais do grupo salina apresentaram um aumento significativo de células com danos totais no DNA ( $70,6 \pm 11,3$  unidades arbitrárias) e um aumento de células com dano no DNA nas classes, I, II, III e aumento de células apoptóticas da classe IV comparado com o grupo controle (fig. 24A e B).



**Figura 24** – Efeito do tratamento por via i.p. da FAE, da *Croton celtidifolius*, nos danos no DNA (A) e na quantidade de nucleóides em cada classe de dano no DNA (B) de células isoladas da cavidade pleural de ratos submetidos à pleurisia. (Cg) carragenina. As colunas e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M de unidades arbitrárias e na quantidade de nucleóides em cada classe de 4 – 8 animais por grupo experimental que diferem significativamente do controle,  $**p < 0,01$ . (ANOVA, complementado pelo teste Dunnett).

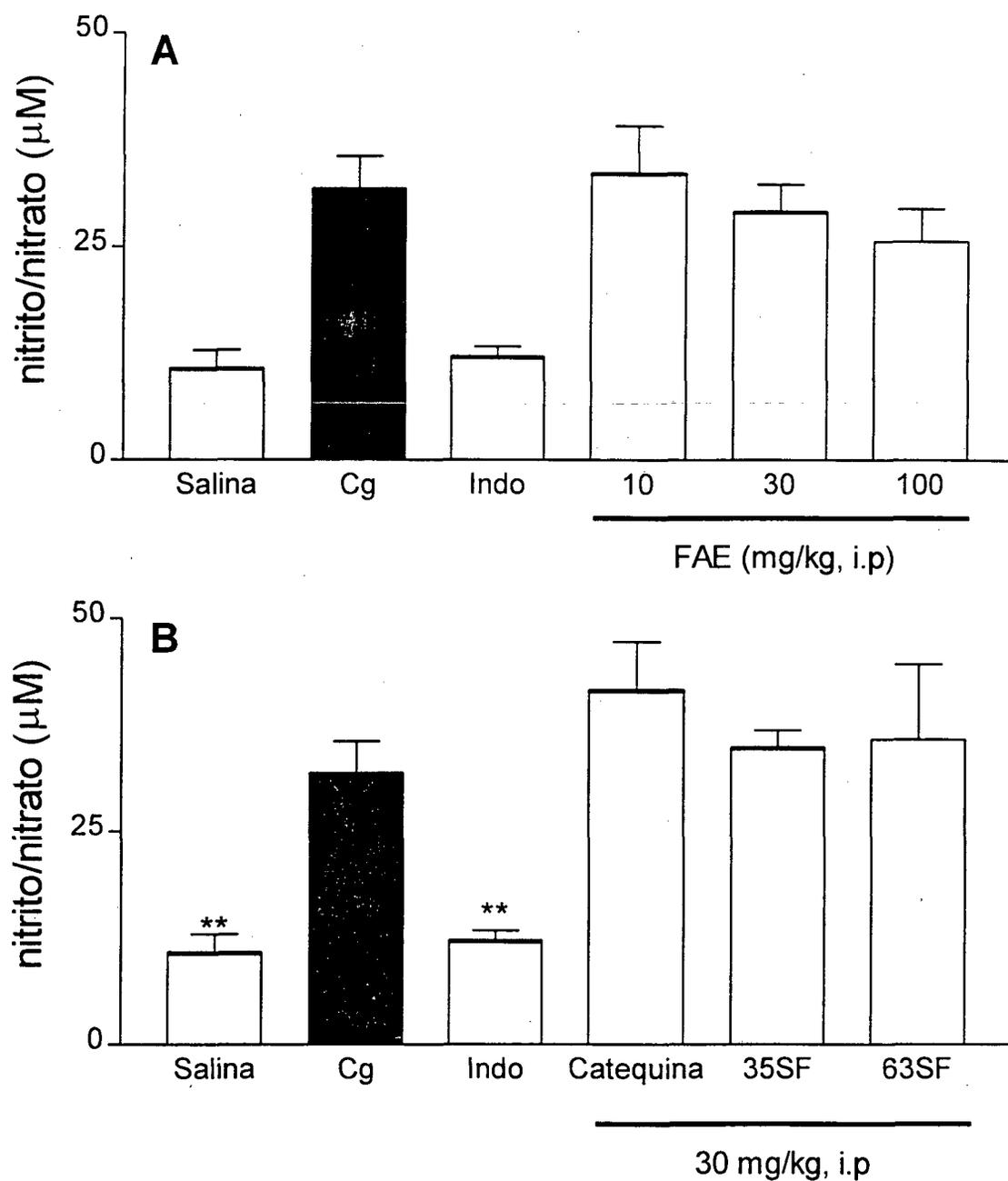
#### **4.3.5. Determinação dos Níveis de Nitrito/Nitrato no Exudato Pleural de Ratos Submetidos a Pleurisia.**

A determinação de nitrito+nitrato, como um indicador da síntese de NO, foi feita no sobrenadante do exudato pleural de ratos submetidos a pleurisia.

Nos animais controle, o processo inflamatório agudo induzido pela carragenina promoveu um aumento da quantidade de nitrito/nitrato no exudato pleural que após 4 h foi de  $31,9 \pm 3,7 \mu\text{M}$  (fig. 25A e B).

O tratamento prévio dos animais com FAE, catequina, 35SF e 63SF não alterou os níveis de nitrito/nitrato nos exudatos pleurais de ratos submetidos à pleurisia (fig. 25A e B).

Nos animais tratados com indometacina ocorreu uma redução significativa dos níveis de nitrito+nitrato de 61,8 % ( $12,2 \pm 1,1 \mu\text{M}$ ) no exudato pleural (fig. 25A e B).



**Figura 25** – Efeito do tratamento por via i.p. da FAE (A), catequina, 35SF e 63SF (B) da *Croton celtidifolius*, nos níveis de nitrito/nitrato do exudato da cavidade pleural de ratos submetidos à pleurisia. As colunas e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M dos níveis de nitrito/nitrato de 4 – 8 animais por grupo experimental que diferem significativamente do controle,  $**p < 0,01$ . (ANOVA complementado pelo teste Dunnett).

**Tabela 8** - Representa o efeito da FAE, catequina, 35SF, 63 SF e indometacina, na produção de nitrito+nitrato no exudato da cavidade pleural de ratos submetidos à pleurisia.

| Grupos       | Dose mg/kg i.p. | nitrito/nitrato ( $\mu$ M) | Inibição (%) |
|--------------|-----------------|----------------------------|--------------|
| Controle     |                 | 31,9 $\pm$ 3,7             | 0            |
| Salina       |                 | 10,8 $\pm$ 2,1             | -            |
| FAE          | 10              | 33,7 $\pm$ 5,5             | 0            |
|              | 30              | 29,2 $\pm$ 3,1             | 8,4          |
|              | 100             | 25,7 $\pm$ 3,8             | 19,4         |
| Catequina    | 30              | 41,6 $\pm$ 5,6             | 0            |
| 35SF         | 30              | 34,9 $\pm$ 2,0             | 0            |
| 63SF         | 30              | 35,8 $\pm$ 8,8             | 0            |
| Indometacina | 10              | 12,2 $\pm$ 1,1**           | 61,8         |

(n= 4 - 8 animais).

Difere significativamente em relação ao controle \*\*  $p < 0,01$  (ANOVA, complementado pelo teste Dunnett's).

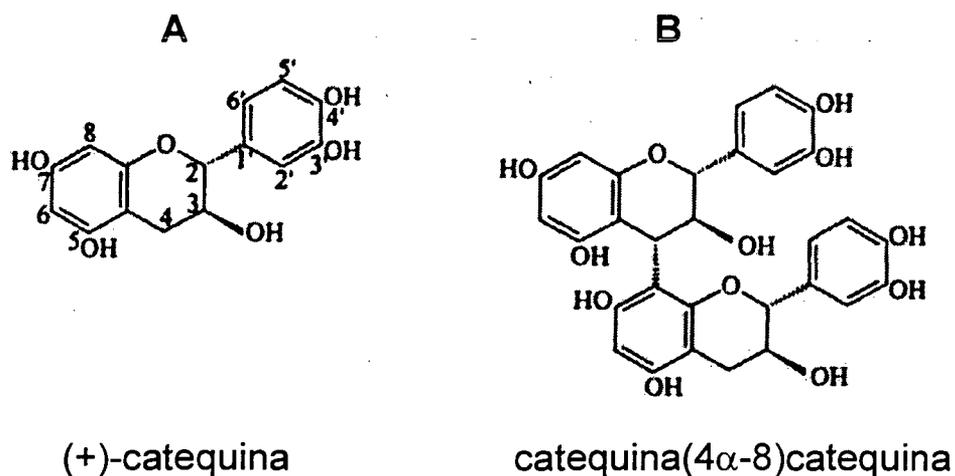
## DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que as substâncias encontradas na casca da *Croton celtidifolius* possuem atividade antioxidante, analgésica e antiinflamatória.

O estudo fitoquímico preliminar da *Croton celtidifolius* demonstrou a presença de grandes quantidades de flavonóides no seu extrato bruto, contendo principalmente catequinas, como a catequina e galocatequina, e uma mistura de proantocianidinas nas sub-frações 35SF e 63SF.

Proantocianidinas correspondem atualmente a designação que, até alguns anos, era dada aos taninos condensados ou mais comumente conhecidos como poliflavonóides. Em termos da estrutura química, estas moléculas são polímeros de flavonóides (fig. 26), estruturalmente relacionados com monómeros de catequina, cujas unidades fundamentais são estruturas monoméricas de 2-fenilbenzopiranos com uma estrutura em forma de  $C_6-C_3-C_6$  e estão presentes principalmente nas cascas das plantas, e além de muitos alimentos frutas, vinhos, etc. (De Bruyne *et al.*, 1999). Várias atividades biológicas desta classe de flavonóides têm sido descritas, como antioxidante (Teissedre *et al.*, 1995; Riedl *et al.*, 1998; Duarte, 1999),

vasoprotetora (Melzer *et al.*, 1991; Cheng *et al.*, 1993), anti-tumoral (Bomser *et al.*, 1993), anti-viral (Masquelier e Michaud, 1979; Takechi *et al.*, 1985), sequestradores de EROs (Ariga e Hamano, 1990; Ricardo da Silva *et al.*, 1991), moduladores da atividade de enzimas como a ciclooxigenase e a lipooxigenase (Bors e Saran, *et al.*, 1987; Kolodziej *et al.*, 1995).



**Figura 26** - Exemplo da estrutura da catequina (A) e de uma proantocianidina (B), dímero B<sub>3</sub>.

Neste estudo nós determinamos que as substâncias presentes no EB, nas frações, nas sub-frações e os compostos isolados da *Croton celtidifolius*, possuem atividade antioxidante *in vitro*, desde que são capazes de proteger a desoxirribose e o homogenato de fígado de rato de danos oxidativos, e ainda inibir a redução do NBT induzido por O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, quando presentes em baixa concentração em relação a um substrato oxidável, são capazes de retardar ou inibir a oxidação deste substrato (Halliwell e Gutteridge, 1989). Nesta classe de compostos podemos incluir os flavonóides. Suas ações antioxidantes são

associadas com seus efeitos antiateroscleróticos, pois previnem a oxidação do LDL (Steinbrecher, 1990). Seu consumo reduz o índice de doenças cardiovasculares (Hertog *et al.*, 1993), além de reduzir o risco de neoplasias (Knekt *et al.*, 1997) e a manutenção dos níveis de antioxidantes, pode atenuar o dano celular e a disfunção observada em algumas doenças inflamatórias (Conner *et al.*, 1996).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos e flavonóides encontrados em vegetais tem sido alvo de muitos estudos (Heinonen *et al.*, 1998; Yen and Hsieh, 1998; McDonald *et al.*, 2001). A capacidade de sequestro de radicais livres é o principal mecanismo da função antioxidante dos flavonóides, devido à sua capacidade de doar elétrons (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Os radicais  $\text{OH}^\bullet$  são as espécies mais reativas encontradas em meio biológico, reagem no próprio sítio onde foram gerados e são responsáveis por grande parte do danos celulares promovidos pelos EROs, causando quebras nas fitas do DNA, promovendo peroxidação lipídica, além de oxidar proteínas (Halliwell e Gutteridge, 1991; Grisham, 1992). Para se determinar se os compostos fenólicos da *Croton celtidifolius* poderiam de alguma forma afetar a produção ou os efeitos deste radical, utilizamos um sistema gerador de  $\text{OH}^\bullet$ , contendo  $\text{Fe}^{3+}$ -NTA e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O radical  $\text{OH}^\bullet$  gerado no sistema, reage com a desoxirribose e os produtos desta oxidação podem ser determinados fotolorimetricamente.

O EB, as frações, as sub-frações e os compostos isolados possuem atividade antioxidante neste sistema, pois foram capazes de inibir a degradação da desoxirribose de maneira dependente da concentração. A ordem de potência em relação aos valores de  $\text{Cl}_{50}$  da degradação da desoxirribose foi seguinte, catequina > galocatequina > FAE > 35SF > 26SF > FBuOH > 51SF > 19SF > EB > FAq > 63SF. A maioria dos compostos foi capaz de inibir a degradação da desoxirribose em

concentrações tão baixas quanto 1 µg/mL e a catequina por, sua vez, inibiu a degradação na concentração mais baixa utilizada 0,1 µg/mL. Podemos sugerir ainda, que a presença de flavonóides, como a catequina e galocatequina na FAE, pode caracterizar a potente atividade antioxidante desta fração em relação as demais frações.

Muitos flavonóides e outros compostos fenólicos são considerados antioxidantes, não somente pela sua capacidade de sequestrar radicais livres (Cotelle *et al.*, 1996; Cos *et al.*, 1998), mas também porque a estrutura polifenólica comum de muitos flavonóides é capaz de quelar metais, contribuindo para o aumento da capacidade antioxidante (Rice-Evans *et al.*, 1996; Moini *et al.*, 1999). O efeito do EB, das frações, das sub-frações e dos compostos isolados, pode ser devido não só as suas propriedades de sequestrar radicais, mas também as suas habilidades de quelar o ferro utilizado no sistema. A propriedade de quelar metais pode prevenir as reações do tipo Fenton, que podem gerar radicais OH<sup>•</sup> altamente reativos (Croft, 1998). Tem sido demonstrado que a capacidade de quelar metais é intimamente ligado a efeitos citoprotetores de flavonóides. A ordem de potência de quelar metais de alguns flavonóides é a seguinte, catequina > quercetina > diosmetina e foi observado que estes flavonóides reduzem os efeitos citotóxicos provocados por EROs em hepatócitos na mesma ordem de potência de sua atividade quelante (Morel *et al.*, 1993).

A produção excessiva de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> em sistemas biológicos está intimamente ligada com outros efeitos deletérios, incluindo dano de células endoteliais, aumento da permeabilidade vascular (Droy-Lefaix *et al.*, 1991), peroxidação lipídica e danos ao DNA (Dix *et al.*, 1996). Deste modo, substâncias antioxidantes, que reduzam a

quantidade de  $O_2^{\bullet-}$  nos sistemas biológicos, podem contribuir para o bom funcionamento do organismo.

Foi avaliada a capacidade do EB, das frações, das sub-frações e dos compostos isolados em sequestrar o  $O_2^{\bullet-}$  gerado pelo sistema NADH-fenazina-metasulfato. A sua capacidade de sequestro foi evidente somente na concentração mais alta de 100  $\mu\text{g/mL}$ , onde todos os compostos testados apresentaram esta atividade. Os resultados estão de acordo com a literatura, somente a falta de atividade significativa da catequina neste sistema é contraditória, já que um estudo utilizando um sistema não enzimático de geração de  $O_2^{\bullet-}$ , (Hanasaki *et al.*, 1994) demonstrou que flavonóides, incluindo epicatequina, miricetina, rutina, catequina, epigalocatequina, galagina e morina, são capazes de sequestrar  $O_2^{\bullet-}$ .

Utilizando um sistema lipídico, nossos resultados demonstraram que o EB, a FAE, a FBuOH, a 19SF, a 26SF, a 35SF, a 51SF, a catequina e a galocatequina, reduziram a oxidação do homogenato de fígado de rato induzida por peróxido *t*-butila somente na maior dose utilizada (100  $\mu\text{g/mL}$ ). Nosso estudo vai ao encontro de relatos na literatura, onde se observa efeitos inibitórios das catequinas e outros flavonóides sobre a peroxidação lipídica *in vitro* (Videla *et al.*, 1981; Younes e Siegers; 1981).

No entanto, nem a FAq e nem a sub-fração 63SF, apresentaram atividade neste sistema. Tem se observado que os efeitos inibitórios dos compostos fenólicos em sistemas lipídicos é dependente do tempo, da concentração da amostra e do pró-oxidante utilizado, e certos compostos que tem uma potente atividade antioxidante em um ensaio, não tem demonstrado resultados significativos em outros testes (Yamanaka *et al.*, 1997; Bourne e Rice-Evans, 1997; Croft, 1998; Kondo *et al.*, 1999). Quimicamente, o sistema lipídico utilizado em nossos

experimentos é considerado bifásico onde existe uma fase aquosa e uma fase lipídica. Desta forma, compostos com muitos grupos hidroxilas aparentes exercem grande atividade antioxidante em fase aquosa (Castelluccio *et al.*, 1995; Rice-Evans e Miler, 1996). O fato de que FAq e na 63SF contém compostos mais polares pode explicar a falta de efeitos antioxidantes significativos em um sistema lipídico.

De um modo geral, os resultados demonstraram uma correlação satisfatória entre a presença de compostos fenólicos e atividade antioxidante *in vitro*, e são compatíveis com a presença de catequinas, como a catequina e a galocatequina, proantocianidinas e outros compostos fenólicos, e que a ação antioxidante de substâncias encontradas em plantas é relacionada com a presença destes compostos (Yen e Hsieh, 1998; McDonald *et al.*, 2001).

Visando caracterizar as atividades preconizadas pelo uso popular da *Croton*, foram utilizados dois testes para se determinar a atividade antinociceptiva da planta, o teste de contorções abdominais e o teste de formalina em camundongos.

O teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, é um teste rápido, prático muito utilizado, na triagem de drogas com atividade analgésica (Castro, 2000). Este tem como característica promover um efeito irritativo, após a injeção intraperitoneal deste ácido, resultando em contrações abdominais que são contabilizadas cumulativamente durante um período determinado (Chau, 1989). Esta irritação provoca a liberação de mediadores algicos como bradicinina, prostaglandinas, histamina e serotonina (Whittle, 1964). Deste modo, este ensaio é sensível tanto a antiinflamatórios não-esteroidais quanto a analgésicos de ação central, como a morfina (Siegmund *et al.*, 1957)

Podemos afirmar que o EB da *Croton celtidifolius* possui substâncias com atividade antinociceptiva, uma vez que o EB reduziu significativamente as

contorções abdominais induzidas pelo ácido acético de maneira dose-dependente. Este efeito foi evidente já nos primeiros 30 min da administração, perdurando por até 4 h. Existem, portanto, evidências de que as substâncias com atividade antinociceptiva contidas no EB, são absorvidas por via oral, tem atividade prolongada e que a metabolização pré-sistêmica não é impedimento para sua atividade. Do mesmo modo a administração de AAS reduziu significativamente as contorções, e estes dados estão de acordo com os publicados anteriormente (Peters, 1997).

Pela falta de especificidade deste teste, é comum que resultados positivos neste modelo sejam analisados com outros testes. Deste modo, escolheu-se o teste de formalina, um teste mais específico, onde é possível evidenciar dois tipos distintos de nocicepção.

A injeção intraplantar de formalina induziu um quadro nociceptivo intenso, caracterizado pelo comportamento do animal em lambar vigorosamente a pata injetada. Este teste apresenta duas fases distintas de reatividade, a primeira que se observa de 0 a 5 min, é dor de origem neurogênica, correspondente a estimulação das fibras C aferentes (Duboisson e Dennis, 1977; Hunskaar *et al.*, 1985) associada à liberação de mediadores como substância P, glutamato e bradicinina (Hunskaar e Hole, 1987). Este quadro é seguido de um período de refratariedade que se estende por 10 minutos, e logo após inicia-se uma segunda fase de reatividade que se desenvolve por 30 a 45 minutos, na qual ocorre a liberação de vários mediadores inflamatórios como prostaglandinas, serotonina, bradicinina e histamina, caracterizando uma dor de origem inflamatória (Hunskaar e Hole, 1987; Shibata *et al.*, 1989; Corrêa e Calixto, 1993).

Em nossos experimentos ficou demonstrado que a administração prévia de indometacina reduz apenas a segunda fase da nocicepção. Estes resultados vão de encontro a outras publicações (Peters, 1997). O EB, administrado por via oral reduziu somente a segunda fase da dor. No entanto, esse efeito foi 3,5 e 1,4 vezes menos potente que o observado com a FAE e a FBUOH, respectivamente. Nossa suposição é a de que as substâncias responsáveis pela atividade analgésica encontram-se em menor concentração no EB, e mais concentradas na FAE e na FBUOH. Estes dados reforçam os resultados encontrados no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, isto é, que a *Croton celtidifolius* possui substâncias com atividade antinociceptiva e que são absorvidas pelo trato-gastrointestinal.

Com relação a FAE, esta demonstrou reduzir tanto a primeira quanto a segunda fase de nocicepção, sendo que por via oral na primeira fase foi 3 vezes, e na segunda fase 3,5 vezes menos potente que por via i.p. A 63SF, uma sub-fração da FAE, foi a única que demonstrou reduzir a nocicepção em ambas as fases da nocicepção, indicando que o efeito antinociceptivo da FAE é devido as proantocianidinas, que estão presentes nesta sub-fração. A este respeito, já foram relatados efeitos antinociceptivos desta classe de substâncias (De Oliveira *et al.*, 1975; Subarnas e Wagner, 2000).

O fato de não observarmos uma redução da primeira fase de dor nos animais tratados com o EB, pode ser devido as doses utilizadas. Nossa suposição é que na FAE estas proantocianidinas estariam mais concentradas do que no EB, e um aumento da dose do EB, poderia revelar seu efeito, reduzindo a reatividade na primeira fase.

A FBUOH, por v.o e via i.p., e a FAq, por via i.p., foram efetivas apenas na segunda fase. Os resultados positivos encontrados nas diferentes frações, nos levam a sugerir que não uma mas várias substâncias distribuídas entre as frações são responsáveis pela sua ação antinociceptiva da *Croton celtidifolius*.

Se analisarmos o modo de ação dos antiinflamatórios não-esteroidais inibidores das ciclooxigenases, como a indometacina, observamos que estas drogas reduzem apenas a segunda fase da dor e parcialmente o edema associado à injeção de formalina, e que os analgésicos opióides agindo tanto na primeira quanto na segunda fase (Hunskaar e Hole, 1987). Sendo assim, nossa hipótese é que existem substâncias com mecanismos antinociceptivos distintos nas frações da *Croton celtidifolius*, já que a FBUOH e a FAq, reduzem apenas a segunda fase, característica dos antiinflamatórios não-esteroidais, e a FAE além de reduzir a fase inflamatória, interfere possivelmente com algum componente responsável pela inibição da dor neurogênica.

Procurando ainda validar o uso popular da *Croton celtidifolius*, como antiinflamatório, utilizamos o teste do edema de pata induzido por carragenina em camundongos.

Este teste se caracteriza pela injeção intraplantar de um polissacarídeo de origem marinha, a carragenina, que gera um quadro de inflamação aguda e é caracterizado pela liberação seqüencial de mediadores inflamatórios. Durante a primeira hora, o edema gerado pela carragenina é mediado por histamina e serotonina e, após este período, o aumento de permeabilidade vascular é mantida por cininas como a bradicinina. Em torno de duas horas os processos edematogênicos são mediados pelas prostaglandinas, associados com a migração de leucócitos à região inflamada (Willis, 1969; Di Rosa *et al.*, 1971). É um modelo útil

para se identificar e caracterizar drogas como os anti-inflamatórios esteroidais e não-esteroidais.

Este método foi originalmente descrito em ratos (Winter *et al.*, 1962), no entanto, tem se observado um perfil semelhante de atividade de antiinflamatórios na resposta em camundongos (Sugishita *et al.*, 1981).

Nossos resultados demonstram que a administração oral do EB, reduz o edema de pata de maneira dose-dependente. Com relação a FAE, a FBuOH e a FAq, observa-se que em todas as doses testadas por via oral ou por via i.p, ocorreu a mesma redução percentual do edema. Estes dados se somam aos resultados observados na formalina, de que várias substâncias distribuídas nas frações são responsáveis tanto pela atividade antinociceptiva, quanto pela ação anti-edematogênica. Além disso, os resultados observados na formalina para a FBuOH e a FAq podem ser devidos à presença de substâncias que atuam como os anti-inflamatórios não-esteroidais.

Com relação à FAE, além de possuir substâncias que reduzem a dor neurogênica (primeira fase da formalina), possui compostos com atividade antiedematogênica. Podemos sugerir então, que parte do efeito antiedematogênico da FAE é devido à presença de proantocianidinas presentes na 63SF, uma vez que esta sub-fração, também reduziu o edema. Alguns trabalhos têm demonstrado que a atividade antiedematogênica das proantocianidinas, está relacionada com a redução de NO, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e PGE<sub>2</sub> (Subarnas e Wagner, 2000; Li *et al.*, 2001).

Do mesmo modo, a 35SF e a catequina reduziram o edema, possivelmente por um mecanismo distinto da 63SF, já que a 35SF e a catequina não reduziram nenhuma das fases da nocicepção induzida por formalina. Com relação a catequina, seu efeito antiedematogênico parece não ser resultado da redução de metabólitos

da via do ácido araquidônico, uma vez que os dados da literatura mostram que a catequina tem um efeito inibitório muito reduzido sobre as ciclooxigenases (Noreen, 1998a e 1998b).

Tem sido postulado que extratos de plantas com atividade vasoconstritora, podem fornecer resultados falso-positivos no teste do edema de pata (Souccar e Lapa, 1997), e como muitas proantocianidinas possuem propriedades vasoativas (Calixto *et al.*, 1986; Pattichis *et al.*, 1993), testamos o efeito da FAE, a fração que demonstrou os melhores efeitos tanto nos modelos *in vitro* e *in vivo*, sobre a pressão arterial de ratos anestesiados. A administração endovenosa da FAE não alterou os níveis pressóricos basais de ratos, demonstrando que o efeito antiedematogênico da FAE no modelo do edema de pata não é resultado de atividade vasoconstritora.

O edema de pata, por sua vez, nos fornece dados apenas sobre o extravasamento plasmático, sem demonstrar os eventos celulares que ocorrem no processo inflamatório. Assim, foi utilizado o teste da pleurisia induzida pela carragenina em ratos, onde há um acúmulo gradual de células e exudato na cavidade pleural (De Brito, 1989).

A administração de carragenina na cavidade pleural promove um aumento da migração celular, principalmente polimorfonucleares, no sítio inflamatório, e de exudato, onde se observa a presença de vários mediadores inflamatórios (Horakova *et al.*, 1980; De Brito, 1989). Dentre estes mediadores podemos destacar a histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, tromboxano (Horakova *et al.*, 1980; Katori *et al.*, 1980; Harada *et al.*, 1982). Além destes mediadores, EROs tem demonstrado modular uma série de fatores responsáveis pelo aumento da exudação plasmática e influxo de células nos sítios inflamatórios. A expressão de citocinas quimiotáticas como IL-8 e IL-1 (Fuchs, 2000), a formação de LTB<sub>4</sub> (Fantone e Ward,

1982; Xia *et al.*, 1995), a indução da expressão de moléculas de adesão, como selectinas E, ICAM-1 e VCAM-1 (Pober *et al.*, 1990; Bäuerle, *et al.*, 1994), o aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de neutrófilos ao sítio inflamatório (Droy-Lafaix *et al.*, 1991; Boughton-Smith *et al.*, 1993; Salvemini *et al.*, 1999).

Nossos resultados demonstram que o tratamento prévio dos animais com a FAE por via i.p., reduz de maneira dose-dependente o extravasamento plasmático e a migração celular, principalmente de polimorfonucleares no sítio inflamatório.

No entanto, a sub-fração 35SF e a catequina, não reduziram o extravasamento plasmático, e o influxo de polimorfonucleares, ocorrendo ainda um aumento da migração celular nos animais tratados com catequina, desta forma descartando a possibilidade de que um efeito antiinflamatório é responsável pela atividade antiedematogênica demonstrada por esta sub-fração e o composto isolado.

Mais uma vez, os resultados da 63SF confirmam a presença de proantocianidinas antiinflamatórias, pois esta sub-fração demonstrou reduzir o influxo de células e os níveis de exudato pleural. Ainda em relação a FAE, pode-se afirmar que os efeitos da proantocianidinas, em reduzir parâmetros inflamatórios, se sobrepõe aos da catequina em aumentar a celularidade, pois o tratamento com a FAE, demonstra uma redução significativa tanto na celularidade, quanto na exudação.

A indometacina demonstrou reduzir apenas o extravasamento plasmático, não alterando os níveis de celularidade na cavidade pleural. Os dados encontrados na literatura são contraditórios, Vários trabalhos tem demonstrado que a indometacina reduz tanto a migração celular como o exudato (Utsunomiya, *et al.*, 1994; Fröde, 2000). Mas, por outro lado, alguns autores relatam a indometacina

reduzindo apenas a exudação sem alterar os níveis de células que migram para a cavidade. Isto pode ser explicado pelo fato de que a indometacina reduz apenas os níveis de  $PGE_2$ , sem no entanto diminuir os níveis de  $LTB_4$ , na cavidade pleural (Santana *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1995).

Após a observação de que a FAE poderia reduzir os índices inflamatórios na pleurisia, resolvemos então verificar se esta fração poderia modular parâmetros oxidativos nas células que migraram para a cavidade pleural.

Uma das características da inflamação, é a ativação de células epiteliais e macrófagos residentes, além do recrutamento e ativação de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos. Uma das principais fontes de EROs é ativação de um sistema NADPH-oxidase, presente nos fagócitos e células epiteliais, que resulta na redução monoelétrica do  $O_2$  a  $O_2^{\bullet-}$ . Este ânion, como já vimos anteriormente, participa de uma série de efeitos deletérios em sistemas biológicos (Eiserich *et al.*, 1998; Walsh, 1999; Wu *et al.*, 2000; MacPherson *et al.*, 2001).

Nós mostramos que as células isoladas da cavidade pleural de ratos tratados com a FAE, tinham inibido a produção de  $O_2^{\bullet-}$ , somente com a dose de 100 mg/kg por via i.p. No entanto, as subfrações 35SF e 63SF e a catequina não apresentaram o mesmo efeito, talvez porque a dose de 30 mg/kg não seja capaz de reduzir de forma significativa a produção de  $O_2^{\bullet-}$  como na FAE, ou porque esta inibição seja devido a um sinergismo dos compostos que estão distribuídos entre as sub-frações.

Os dados apresentados acima, devem ser analisados com cautela, pois a quantidade de células utilizadas na incubação não era a mesma em todos os grupos experimentais, o número de células incubadas, variava de acordo com a quantidade de células presentes no exudato por volume. Portanto, grupos de animais como os controles que apresentavam uma quantidade de células maior por volume de

exudato, tinham mais células sendo incubadas com NBT, e grupos de animais que apresentavam uma quantidade de células reduzidas por volume, como os tratados com FAE, tinham menos células sendo incubadas com NBT. Esta colocação poderia explicar a redução significativa da produção de  $O_2^{\bullet-}$  nos animais tratados com FAE.

No entanto se observarmos que grande parte dos danos causados por EROs, depende da quantidade destes radicais produzidos, (Halliwell e Gutteridge, 1990; Harman, 1992; Gutteridge, 1994; Spector, 1995), podemos sugerir que a redução do influxo de células inflamatórias ao sítio inflamatório promovido pela FAE, reduz a quantidade de EROs na cavidade pleural, como mostrado pela redução da quantidade de  $O_2^{\bullet-}$  produzido por estas células, e conseqüentemente, reduz seus efeitos deletérios sobre sistemas biológicos, como mostrado pela redução da peroxidação lipídica nestas células. Alguns flavonóides têm mostrado inibir a liberação de EROs pelos neutrófilos e também inibir a ativação do sistema NADPH-oxidase (Tauber *et al.*, 1984; Hart, *et al.*, 1990).

Observou-se, no entanto, um aumento da produção  $O_2^{\bullet-}$  nas células da cavidade pleural de animais tratados com indometacina. Relatos da literatura demonstram que, em animais tratados com indometacina, ocorre um aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 na cavidade pleural (Utsunomiya, *et al.*, 1994). Estas citocinas aumentam significativamente a produção de EROs (Adamson e Billings, 1992; Goucherot-Pocidal e Revillard, 1993; Lo *et al.*, 1998) o que poderia explicar, em parte o aumento da produção de  $O_2^{\bullet-}$  pela indometacina nas células da cavidade pleural.

Um alvo importante das EROs, são as membranas fosfolipídicas e, como apresentado anteriormente, a geração de EROs nestas membranas promove reações de oxidação em cadeia, aumentando a permeabilidade a íons, promovendo

inativação de receptores de membrana e a produção de metabólitos tóxicos (Macnee, 2001). O processo de peroxidação lipídica está ligado a uma série de processos patológicos envolvendo EROs, como inflamação (Middleton *et al.*, 2000).

Nossos resultados também demonstram que a FAE, reduz a peroxidação lipídica nas células da cavidade pleural. No entanto, as sub-frações 35SF e 63SF não produziram resultados significativos, sendo que somente a catequina reduziu a peroxidação. Se a lipoperoxidação é o primeiro evento produzido pelo estresse oxidativo, podemos afirmar que os flavonóides presentes na FAE, como a catequina, podem reduzir este processo, impedindo assim, o dano celular e a produção de metabólitos tóxicos derivados deste processo. Estes dados vão ao encontro dos relatos da literatura, pois tem sido descritos efeitos de flavonóides, como a catequina e a quercetina, em reduzir a peroxidação lipídica (Videla *et al.*, 1981; Muller e Sies, 1982).

Após a observação de que a FAE e alguns de seus constituintes tinham mostrado reduzir a produção de  $O_2^{\bullet-}$ , e a peroxidação lipídica, procuramos investigar, se este efeito era devido a alguma alteração na atividade da enzima SOD nas células isoladas da cavidade pleural de ratos.

A SOD é uma metaloproteinase que dismuta  $O_2^{\bullet-}$  para uma espécie menos reativa o  $H_2O_2$ . Esta reação envolve uma série de transferências mono e bi-eletrônicas sem requerer energia da célula. (Klug-Roth *et al.*, 1973; Waldo e Penner-Hahn, 1995). Os trabalhos mais atuais tem demonstrado a influência da SOD no processo inflamatório. A administração da enzima SOD nativa, associada com polietilenoglicol, reduziu o edema quando administrada 30 min antes, ou 2 h após a indução do edema com carragenina, demonstrando o papel das EROs sobre os efeitos dos metabólitos do ácido araquidônico (Boughton-Smith *et al.*, 1993). O

MK40403, um análogo da SOD, que também cataliza seletivamente a redução do  $O_2^{\bullet-}$  para uma espécie menos reativa o  $H_2O_2$ , reduziu a migração celular, o extravasamento plasmático e os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, mesmo com a manutenção dos níveis de NO e PGE $_2$  no modelo da pleurisia (Salvemini *et al.*, 2001).

Nossos resultados mostram que a FAE (100 mg/kg) e a sub-fração 63SF (30 mg/kg), aumentam a atividade da SOD nas células do exudato pleural de ratos. No entanto, a 35SF, a catequina e a indometacina, não reproduziram o mesmo efeito. Este dado poderia explicar em parte a redução da produção de  $O_2^{\bullet-}$  pela FAE na dose de 100 mg/kg, já que a SOD cataliza a remoção do  $O_2^{\bullet-}$ .

Alguns produtos naturais tem demonstrado aumentar a atividade desta enzima: a aplicação tópica do extrato de *Ginkgo biloba* induz um aumento na atividade da SOD e CAT e que a sua administração sistêmica aumenta a atividade de ambas as enzimas no fígado, coração e rins de ratos (Lin e Chang, 1997). A incubação *in vitro* com o flavonóide antioxidante silimarina, aumentou a expressão da SOD em linfócitos e sua atividade em linfócitos e eritrócitos (Lang *et al.*, 1993).

Por estes dados apresentados na literatura de que compostos derivados de plantas e flavonóides podem aumentar a atividade da SOD e que a remoção específica do  $O_2^{\bullet-}$  por substâncias sintéticas, reduz parâmetros inflamatórios, podemos sugerir que o aumento da atividade da SOD promovido pela FAE e pela sub-fração 63SF, pode contribuir para a redução da migração celular e do extravassamento plasmático observados na pleurisia. Este aumento da atividade da SOD, parece ser promovido principalmente pelas proantocianidinas contidas na 63SF.

No entanto, reações mediadas pelas EROs, podem causar alterações estruturais no DNA, como deleções, rearranjos e inserções. Além da produção mitocondrial, EROs, são gerados em quadros patológicos que possibilitem a sua formação através de reações do tipo Fenton (Cuzzocrea, *et al.*, 2000). Como visto anteriormente, antioxidantes podem reduzir estas reações e pelo fato de que compostos utilizados neste estudo apresentam esta atividade, resolvemos investigar se a FAE poderia reduzir danos no DNA em células da cavidade pleural de ratos submetidos a pleurisia, através do teste do cometa.

O ensaio do cometa é um ensaio de genotoxicidade recente, porém tem sido muito utilizado devido a sua sensibilidade e aplicabilidade, unido técnicas citogenéticas e bioquímicas para detecção de danos ao DNA (Anderson *et al.*, 1997). Este teste fornece resultados ao nível de células individuais, sendo necessárias amostras celulares extremamente pequenas. Tem aplicação potencialmente ampla em testes de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* e em estudos de dano e reparo no DNA, inclusive danos oxidativos (Hartmann e Speit 1995; Tuo, 1996). Uma das vantagens do teste do Cometa é que pode ser usado para mensurar quebras de DNA em quaisquer tipos de células eucariotas, não necessariamente em proliferação, sendo necessária apenas uma boa suspensão celular (Kasamatsu *et al.*, 1996). É crescente a utilização do teste em animais *in vivo* (Kreja, 1996; Sasaki *et al.*, 1997). Através da identificação dos diferentes níveis de dano ao DNA sofridos pelas células, pode-se obter informações sobre eventuais diferenças nas intensidades de danos, sofridos por subpopulações celulares (Sasaki *et al.*, 1997).

Nossos resultados demonstram que o tratamento prévio dos animais com a FAE, não apresentou qualquer efeito sobre os danos no DNA de células isoladas da cavidade pleural de ratos submetidos a pleurisia. E observa-se ainda uma grande

quantidade de células sem dano (Classe 0). Os resultados foram similares nos animais controle e tratados com indometacina.

As células utilizadas neste ensaio eram predominantemente neutrófilos, como observado nos resultados da pleurisia, estas células geram grande quantidade de  $O_2^{\bullet-}$ , que está implicado com a apoptose de vários tipos celulares (Buttke e Sandstrom, 1994), e toda a população de neutrófilos sofrem apoptose em torno de 72 horas (Savill *et al.*, 1989), o que poderia ser facilmente detectado por um aumento no número de células na classe IV.

No entanto tem se demonstrado que os danos no DNA promovidos por EROs ativam mecanismos de reparo, catalizados por uma série de enzimas, que removem as bases danificadas (Demple e Harrison, 1994). Algumas observações demonstram que estas enzimas trabalham em um limite, para remover as bases modificadas por danos (Ames, 1989; Bashir *et al.*, 1993; Jaruga *et al.*, 1994; Adachi *et al.*, 1995), baseado nisto que um aumento no tempo de exposição as EROs, pode aumentar significativamente os danos no DNA, pela incapacidade das enzimas reparar os danos em tempo hábil.

Podemos sugerir, então, que o índice reduzido de dano no DNA nas células utilizadas neste ensaio é devido a exposição a um período de tempo muito curto as EROs geradas no processo inflamatório e que talvez os mecanismos de reparo do DNA sejam efetivos no tempo de quatro horas da pleurisia em reparar estes danos. Este fato poderia ser confirmado aumentando o tempo antes da coleta do exudato, por exemplo com 8, 12 ou 24 h, onde a exposição as EROs seria mais prolongada ou utilizando outro tipo celular, como as células do pulmão.

Isto gerou a impossibilidade de analisarmos se a FAE poderia reduzir os danos promovidos por EROs nos polimorfonucleares da cavidade pleural,

justamente por não termos a certeza de que as EROs geradas no período de quatro horas da pleurisia podem danificar o DNA das células que migraram para a cavidade pleural dos ratos.

O aumento da quantidade de danos no DNA encontrados nos animais que receberam apenas salina na cavidade pleural, pode ser devido à presença de células residentes como os macrófagos, no final de sua vida útil e muitas em processo apoptótico, já que o aumento do escore se deve principalmente a quantidade de células com dano na classe classe 4.

Como descrito anteriormente, o NO é um mediador sintetizado por uma família de enzimas as NOS exerce vários efeitos fisiológicos, como relaxamento do músculo liso vascular e não vascular, inibição da aderência e agregação plaquetária, inibição da quimiotaxia de neutrófilos e a transdução de sinal no sistema nervoso central e periférico (Ignarro, 1991; Moncada *et al.*, 1991; Dusting, 1995). No entanto a ativação da NOS<sub>i</sub>, que não é expressa em condições fisiológicas e é estimulada por citocinas, oxidantes, endotoxinas de bactérias Gram-negativas, resulta na geração de quantidades muito maiores de NO, em comparação com aquelas produzidas pela NOS<sub>c</sub> (Fröde, 2000). Este aumento na produção de NO, resulta em efeitos citotóxicos, como a inibição de enzimas mitocondriais (Nathan, 1992), a ativação da ciclooxigenase (Salvemini e Masferrer, 1996) entre outros efeitos. Muitas condições inflamatórias estão relacionadas com a produção de grandes quantidades de NO.

Deste modo, resolvemos determinar se a FAE, as sub-frações 35SF e 63SF e a catequina poderiam reduzir os níveis de nitrito/nitrato, metabólitos do NO (Green *et al.*, 1982) no exudato pleural de ratos submetidos a pleurisia.

Nossos resultados demonstram que nem a FAE, a 35SF, a 63SF e a catequina, reduziram os níveis de nitrito/nitrato no exudato pleural de ratos, assim, seu efeito antiinflamatório pode não ser resultado da inibição das enzimas que catalizam a formação de NO.

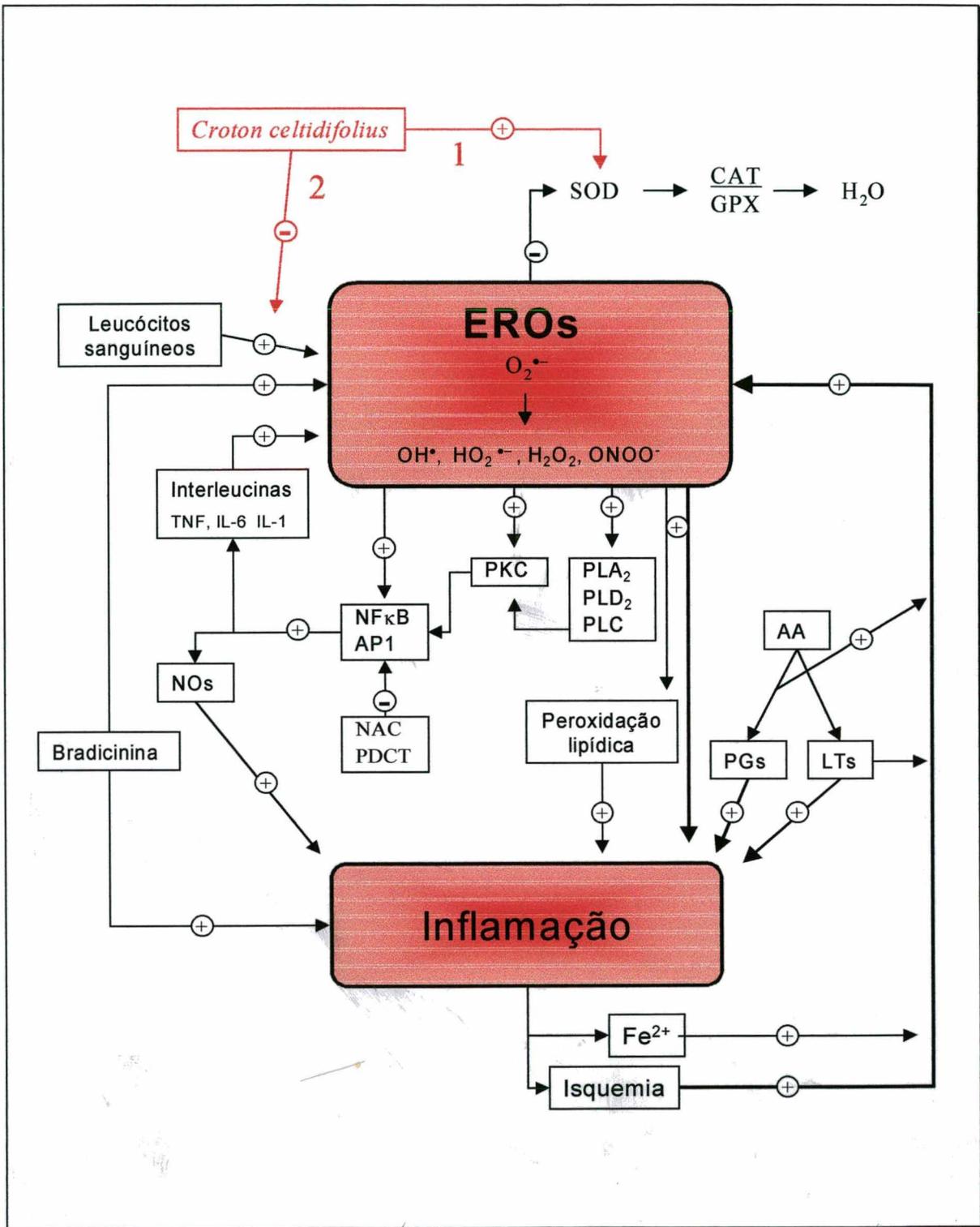
No entanto, se observarmos que a FAE reduz a produção de  $O_2^{\bullet-}$  pelas células que migram para o sítio inflamatório, podemos supor que esteja ocorrendo a formação reduzida de um dos metabólitos tóxicos do NO o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), pela redução de um dos substratos da reação o  $O_2^{\bullet-}$ , já que geração simultânea de NO e  $O_2^{\bullet-}$  favorece a produção deste produto tóxico (Beckman *et al.*, 1990). Esta suposição não foi confirmada em nossos experimentos, mas tem sido determinado a produção de  $ONOO^-$ , na pleurisia induzida pela carragenina (Salvemini *et al.*, 2001).

Em resumo, podemos concluir que a *Croton celtidifolius*, possui substâncias antioxidantes, analgésicas e antiinflamatórias, relacionado principalmente com a presença de proantocianinas e que parte do mecanismo antiinflamatório se deve a redução da peroxidação lipídica pelos flavonóides, como a catequina, e a um aumento da atividade da enzima antioxidante SOD.

Entretanto, deve-se ter cuidado em afirmar que a modulação destes parâmetros inflamatórios é exclusivamente devido às propriedades antioxidantes dos compostos que constituem a planta, já que, segundo Winyard and Blacke, (1997), muitos compostos antioxidantes com atividade anti-inflamatória, parecem ter seus efeitos, mais por agirem em sistemas de sinalização celular, do que diretamente na prevenção do dano celular mediado por EROs em biomoléculas como lipídios e proteínas. E que muitas drogas anti-inflamatórias, como o nimesulide e aminosalicilatos, também tem mostrado atividade antioxidante (Facino *et al.*, 1993; Miles e Grisham, 1994).

Mas é inegável, que além da atividade antiinflamatória demonstrada pelas proantocianidinas na FAE, também a presença de flavonóides como a catequina, com suas propriedades antioxidantes e de quelar metais, auxiliam na atividade antiinflamatória pela redução da peroxidação lipídica. O mais provável é que um efeito sinérgico destas substâncias seja responsável pela modulação dos parâmetros inflamatórios analisados.

Estudos em nosso laboratório estão sendo feitos, para se determinar quais são especificamente as proantocianidinas responsáveis pelos efeitos analgésicos e antiinflamatórios e seu respectivo mecanismo de ação.



**Esquema 2** - Possível mecanismo de ação da *Croton celtidifolius*. Inibindo a produção de EROs pelos leucócitos (1) e aumentando a atividade da enzima SOD (2).

## CONCLUSÕES

Em conjunto os resultados indicam que as substâncias encontradas na casca da *Croton celtidifolius* possuem atividade antioxidante, uma vez que:

1. O EB, as frações, as sub-frações e os compostos isolados foram capazes de inibir a degradação da desoxirribose de maneira dependente da concentração. A ordem de potência em relação aos valores de  $CI_{50}$  da degradação da desoxirribose foi seguinte, catequina > galocatequina > FAE > 35SF > 26SF > FBuOH > 51SF > 19SF > EB > FAq > 63SF.
2. O EB, as frações, as sub-frações e os compostos isolados sequestraram o  $O_2^{\bullet-}$  gerado pelo sistema NADH-fenazina-metasulfato na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Somente a catequina não demonstrou atividade significativa da neste sistema.
3. Em um sistema lipídico, nossos resultados demonstraram que o EB, a FAE, a FBuOH, a 19SF, a 26SF, a 35SF, a 51SF, a catequina e a galocatequina, reduziram a oxidação do homogenato de fígado de rato induzida por peróxido *t*-butila na dose de 100  $\mu\text{g/mL}$ . No entanto, nem a FAq e nem a sub-fração 63SF, apresentaram atividade neste sistema.

Podemos afirmar ainda que O EB, as fracções, as sub-fracções da *Croton celtidifolius*, possuem atividade analgésica uma vez que:

4. O EB reduziu significativamente as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético de maneira dose-dependente.
5. O EB, administrado por via oral reduziu a segunda fase da dor induzida por formalina. No entanto, esse efeito foi 3,5 e 1,4 vezes menos potente que o observado com a FAE e FBuOH, respectivamente.
6. A FAE, esta demonstrou reduzir tanto a primeira quanto a segunda fase de nocicepção, sendo que por via oral na primeira fase foi 3 vezes, e na segunda fase 3,5 vezes menos potente que por via i.p. A 63SF, uma sub-fracção da FAE, foi a única que demonstrou reduzir a nocicepção em ambas as fases, indicando que o efeito antinociceptivo da FAE é devido as proantocianidinas, que estão presentes nesta sub-fracção. A FBuOH, por v.o e via i.p., e FAq, por via i.p., foram efetivas apenas na segunda fase do teste de formalina.

Podemos afirmar ainda que O EB, as fracções, as sub-fracções da *Croton celtidifolius*, possuem atividade antiinflamatória uma vez que:

7. A administração oral do EB, reduz o edema de pata induzido pela carragenina de maneira dose-dependente. Com relação a FAE, FBuOH e FAq, observa-se que em todas as doses testadas por via oral ou por via i.p, ocorreu a mesma redução percentual do edema. Podemos sugerir que parte do efeito antiedematogênico da FAE é devido à presença de proantocianidinas presentes na 63SF, uma vez que esta sub-fracção, também reduziu o edema. Do mesmo modo, a 35SF e a

catequina reduziram o edema, possivelmente por um mecanismo distinto da 63SF

8. A administração endovenosa da FAE não alterou os níveis pressóricos basais de ratos, demonstrando que o efeito antiedematogênico da FAE no modelo do edema de pata não é resultado de atividade vasoconstritora.
9. Nossos resultados demonstram que o tratamento prévio dos animais com FAE por via i.p., reduz de maneira dose-dependente o extravasamento plasmático e a migração celular, principalmente de polimorfonucleares no sítio inflamatório. No entanto, a sub-fração 35SF e a catequina, não reduziram o extravasamento plasmático, e o influxo de polimorfonucleares, ocorrendo ainda um aumento da migração celular nos animais tratados com catequina, desta forma descartando a possibilidade de que um efeito antiinflamatório é responsável pela atividade antiedematogênica demonstrada por esta sub-fração e o composto isolado.

Podemos afirmar mais uma vez que parte do mecanismo de ação antiinflamatório da *Croton celtidifolius*, está relacionado com a modulação de parâmetros oxidativos, uma vez que:

10. As células isoladas da cavidade pleural de ratos tratados com FAE, inibiram a produção de  $O_2^{\bullet-}$ , com a dose de 100 mg/kg por via i.p. No entanto, as subfrações 35SF e 63SF e a catequina não apresentaram o mesmo efeito
11. Nossos resultados também demonstram que a FAE, reduz a peroxidação lipídica nas células da cavidade pleural. No entanto, as sub-frações 35SF e 63SF não produziram resultados significativos, sendo que somente a catequina reduziu a peroxidação.

12. Nossos resultados mostram que a FAE (100 mg/kg) e a sub-fração 63SF (30 mg/kg), aumentam a atividade da SOD nas células do exudato pleural de ratos. No entanto, a 35SF, a catequina e a indometacina, não reproduziram o mesmo efeito.
13. Os resultados demonstram que o tratamento prévio dos animais com a FAE, não apresentou qualquer efeito sobre os danos no DNA de células isoladas da cavidade pleural de ratos submetidos a pleurisia.
14. Nossos resultados demonstram que nem a FAE, a 35SF, a 63SF e a catequina, reduziram os níveis de nitrito/nitrato no exudato pleural de ratos, assim, seu efeito antiinflamatório pode não ser resultado da inibição das enzimas que catalizam a formação de NO.

Em resumo, podemos concluir que a *Croton celtidifolius*, possui substâncias antioxidantes, analgésicas e antiinflamatórias, relacionado principalmente com a presença de proantocianinas e que parte do mecanismo antiinflamatório se deve a redução da peroxidação lipídica pelos flavonóides, como a catequina, e a um aumento da atividade da enzima antioxidante SOD.

# REFERÊNCIAS

## BIBLIOGRÁFICAS

- Abo KA, Ogunleye VO, Ashidi JS. Antimicrobial potential of *Spondias mombin*, *Croton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*. *Phytother Res* 1999;13: 494-497.
- Abu-Amsha R, Croft KD, Puddey IB, Proudfoot JM, Beilin LJ. Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and low-density lipoprotein oxidation in vitro: identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine. *Clin Sci* 1996; 91: 449-458.
- Adachi S, Zeisig M, Moller L. Improvements in the analytical method for 8-hydroxydeoxyguanosine in nuclear DNA. *Carcinogenesis* 1995;16:253-258
- Adamson GM, Billings RE. Tumor necrosis factor induced oxidative stress in isolated mouse hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 1992; 294: 223-229.
- Agner AR, Maciel MA, Pinto AC, Colus JM. Antigenotoxicity of trans-Dehydrocrotonin, a Clerodane Diterpene from *Croton cajucara*. *Planta Med* 2001; 67: 815-819.
- Agrawal, P.K., (1989) Carbon-13 NMR of Flavonoids, Chapter 6; Elsevier, 432-496.
- Allport JR, Ding HT, Ager A, Steeber DA, Tedder TF, Luscinckas FW. L-selectin shedding does not regulate human neutrophil attachment, rolling, or transmigration across human vascular endothelium in vitro. *J Immunol* 1997; 158: 4365-4372.

- Alzugaray D, Alzugaray C, (1983) Plantas que curam, ed Três Livros e Fascículos, 1; 8-14.
- Amaral ACF, Barnes RA. Alkaloids of *Croton celtidifolius*. *Planta Medica* 1997; 63: 485.
- Ames BN. Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Radic Res Commun* 1989; 7: 121-128.
- Anderson D, Yu TW, Browne MA. The use of the same image analysis system to detect genetic damage in human lymphocytes treated with doxorubicin in the Comet and fluorescence in situ hybridisation (FISH) assays. *Mutat Res* 1997; 390: 69-77.
- Anderson D, Yu T-W, Phillips BJ, Schmezer P. The effect of various antioxidants and the other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. *Mutation Research* 1994; 307: 261-271.
- Ariga TE, Hamano M. Radical scavenging action and its mode in procyanidins B1 and B3 from azuki beans to peroxy radicals. *Agric Biol Chem* 1990; 54: 2499-2504.
- Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994;12:141-179.
- Banerjee KK, Sen A. Purification and properties of a lectin from the seeds of *Croton tiglium* with hemolytic activity toward rabbit red cells. *Arch Biochem Biophys* 1981; 212: 740-53.
- Barnes R A, Soeiro O M, Lopes J A M. The alkaloids of *Croton salutaris* and *Croton celtidifolius*. *An Acad Bras Cienc* 1980; 52: 187-187.
- Bashir S, Harris G, Denman MA, Blake DR, Winyard PG. Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 1993; 52: 659-566.

- Battistoni A, Folcarelli S, Cervoni L, et al. Role of the dimeric structure in Cu, Zn superoxide dismutase pH-Dependent, reversible denaturation of the monomeric enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1998; 273: 5655-5661.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87:1620-1624.
- Benavente-Garcia O, Castillo J, Marin FR, Ortuno A, Del Rio J. Uses and properties of citrus flavonoids. *J Agric Food Chem* 1997; 45: 4505-4515.
- Beutler B, Cerami A. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 1986; 320: 584-588.
- Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 1993;11:767-804.
- Bighetti EJ, Hiruma-Lima CA, Gracioso JS, Brito AR. Anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents of the essential oil of *Croton cajucara* Benth. *J Pharm Pharmacol* 1999; 51:1447-1453.
- Blake DR, Winyard PG, Marok R. The contribution of hypoxia-reperfusion injury to inflammatory synovitis: the influence of reactive oxygen intermediates on the transcriptional control of inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 723:308-317.
- Blakely WF, Fuciarelli AF, Wegher BJ, Dizdaroglu M. Hydrogen peroxide-induced base damage in deoxyribonucleic acid. *Radiat Res* 1990; 121: 338-43.
- Block G. The data support a role for antioxidants in reducing cancer risk. *Nutr Rev* 1992; 50:207-213.
- Bomser J. In vitro anticancer activity of fruit extracts from *Vaccinium* species. *Planta Medica* 1993; 62: 212-216.
- Bors W, Saran M. Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Radic Res Commun* 1987; 2: 289-294.

- Boughton-Smith NK, Deakin AM, Follenfant RL, Whittle BJ, Garland LG. Role of oxygen radicals and arachidonic acid metabolites in the reverse passive Arthus reaction and carrageenin paw oedema in the rat. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 896-902.
- Bourne LC, Rice-Evans CA. The effect of the phenolic antioxidant ferulic acid on the oxidation of low density lipoprotein depends on the pro-oxidant used. *Free Radical Research* 1997; 27: 337-344.
- Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* 1995;18:1033-1077.
- Bruneton J. Composés Phénoliques. In: pharmacognosie. Lavoisier. New York:1993 p.200-291.
- Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991; 67:1033-1036.
- Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994; 15: 7-10.
- Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 1989; 58: 79-110.
- Calixto JB, Nicolau M, Rae GA. Pharmacological actions of tannic acid. I. Effects on isolated smooth and cardiac muscles and on blood pressure. *Planta Med* 1986; 1: 32-35.
- Carvalho JC, Silva MF, Maciel MA, Pinto AC, Nunes DS, Lima RM, Bastos JK, Sarti SJ. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of trans-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. Part 1. *Planta Med* 1996; 62:402-404.
- Castelluccio C, Paganga G, Melikian N, Bolwell GP, Pridham J, Sampson J, Rice-Evans C. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Letters* 1995; 368: 188-192.
- Castro L, Rodriguez M, Radl R. Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J Biol Chem* 1994; 269: 29409-29415

- Castro MAS. Mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do 3-O-glicosil-dihidrocanferol, flavonóide extraído dos rizomas de *Cochlospermum regium* ("algodãozinho"). Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo p 1-155, São Paulo, Brasil, Tese de doutorado, 2000.
- Cerutti PA. Oxidant stress and carcinogenesis. *Eur J Clin Invest* 1991; 21: 1-5
- Chau TT. Analgesic testing in animals models. *Pharmacol. Meth. Control Inflamm* 1989; 5: 195-212.
- Chen ZP, Cai Y, Phillipson JD. Studies on the anti-tumour, anti-bacterial, and wound-healing properties of dragon's blood. *Planta Med* 1994; 60: 541-545.
- Cheng JT. Antihypertensive principles from the leaves of *Melastoma candidum*. *Planta Medica* 1993; 59: 405-407.
- Cho S, Urata Y, Iida T, Goto S, Yamaguchi M, Sumikawa K, Kondo T. Glutathione downregulates the phosphorylation of I kappa B: autoloop regulation of the NF-kappa B-mediated expression of NF-kappa B subunits by TNF-alpha in mouse vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253:104-108.
- Conner EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals and antioxidants. *Nutrition* 1996; 12: 274-277.
- Corrêa CR, Calixto JB. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 193-198.
- Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Poel BV, Pieters L, Vlietinck AJ, Bergue DV. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod* 1998; 61: 71-76.
- Cotelle N, Bernier JL, Catteau JP, Wallet JC, Gaydan EM. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Rad Biol Med*. 1996; 20: 35-43.
- Croft KD. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 20: 435-442.

- Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. **Pharmacol Rev** 2001; 53: 135-159.
- Davies KJA. Oxidative stress: The paradox of aerobic life. **Biochem Soc Sympo** 1994; 61: 1-31.
- De Albuquerque MM, Lyra FD, De Mello JF, De Lima OG, Monache FD, Diu e Laurinete Costa MB. Antimicrobial substances of superior plants. 44. Isolation of diterpene acid from *Croton* aff. *argyrophyloides* Muell. arg. (Euphorbiaceae) **Rev Inst Antibiot (Recife)** 1974; 14: 83-89.
- De Brito FD. Pleurisy and pouch models of acute inflammation. In: Liss, AAR (ed.), Pharmacological methods in control of inflammation. Degenham: Rhone Poulenc LTD., pp. 173-228, 1989.
- De Bruyne T, Pieters L, Deelstra H, Vlietinck A. Condensed vegetable tanins: Biodiversity in structure and biological activities. **Biochem Syst Ecology** 1999; 27: 445-459.
- De Oliveira MM, Santos M, Coni AC. Analgesic activity of dimeric proanthocyanidins Preliminary experiments. **Arq Inst Biol (São Paulo)** 1975; 42: 145-50.
- DeForge LE, Preston AM, Takeuchi E, Kenney J, Boxer LA, Remick DG. Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. **J Biol Chem** 1993; 268: 25568-25576.
- Demple B, Harrison L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. **Annu Rev Biochem** 1994; 63: 915-948.
- Desmarchelier C, Witting Schaus F, Coussio J, Cicca G. Effects of Sangre de Drago from *Croton lechleri* Muell-Arg on the production of active oxygen radicals. **J Ethnopharmacol** 1997; 58: 103-8.
- Di Rosa M, Giroud JP, Willoughby DA. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J Pathol** 1971; 104: 15-29.

- Diaz-Gonzalez F, Sanchez-Madrid F. Inhibition of leukocyte adhesion: an alternative mechanism of action for anti-inflammatory drugs. *Immunol today* 1998; 19: 169-172.
- Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM. New concepts on the pathogenesis of fever. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 168-89.
- Dix TA, Hess KM, Medina MA, Sullivan RW, Tilly SL, Webb TL. Mechanism of site-selective DNA nicking by the hydrodioxy (perhydroxyl) radical. *Biochemistry* 1996; 35: 4578-4583
- Dray A, Bevan S. Inflammation and hyperalgesia: highlighting the team effort. *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14:287-290.
- Dray A, Perkins M. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci* 1993;16: 99-104.
- Dray A, Urban L, Dickenson A. Pharmacology of chronic pain. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15: 190-197.
- Droy-Lefaix MT, Drouet Y, Geraud G, Hosford D, Braquet P. Superoxide dismutase (SOD) and the PAF-antagonist (BN 52021) reduce small intestinal damage induced by ischemia-reperfusion. *Free Radic Res Commun* 1991; 2: 725-735.
- Duarte NM. Contribuição para o estudo do pó de cortiça e da cortiça: Extração de proantocianidinas. Tese de Mestrado em Química Farmacêutica, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. 1999.
- Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977; 4: 161-174.
- Dusting GJ. Nitric oxide in cardiovascular disorders. *J Vasc Res* 1995; 32: 143-161.
- Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 1998; 391: 393-397.

- El-Mekkawy S, Meselhy MR, Nakamura N, Hattori M, Kawahata T, Otake T. Anti-HIV-1 phorbol esters from the seeds of *Croton tiglium*. *Phytochemistry* 2000; 53: 457-464
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 341-390.
- Facino RM, Carini M, Aldini G. Antioxidant activity of nimesulide and its main metabolites. *Drugs* 1993; 46: 15-21.
- Fantone JC, Ward PA. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 1982; 107: 395-418.
- Farber JL. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Environ Health Perspect* 1994; 102 Suppl 10: 17-24.
- Farias RA, Rao VS, Viana GS, Silveira ER, Maciel MA, Pinto AC. Hypoglycemic effect of trans-dehydrocrotonin, a nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. *Planta Med* 1997; 63: 558-560.
- Farnsworth N R, Blomster R N, Messmer W M. A phytochemical and biological review of genus *Croton*. *LLOYDIA* 1969; 32: 1-28.
- Fontone JC. Mechanisms of chemotactic factors stimulation of polymorphonuclear leukocytes modulation by prostaglandins. In: Inflammatory mediators. Eds. Higgs GA, Williams TJ, p. 127-148, New York: Macmillan, 1985.
- Forman HJ, Thomas MJ. Oxidant production and bactericidal activity of phagocytes. *Annu Rev Physiol* 1986; 48: 669-80
- Freeman BA, Topolosky MK, Crapo JD. Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lung homogenates. *Arch Biochem Biophys* 1982; 216: 477-484.
- Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 97-112.

Fröde, Tânia. Mediadores e mecanismos envolvidos na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. Florianópolis 2000. 176p. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Curso de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Geller DA, Billiar TR. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev* 1998; 17: 7-23

Geppetti P. Sensory neuropeptide release by bradykinin: mechanisms and pathophysiological implications. *Regul Pept* 1993; 47: 1-23.

Ghosh S, Baltimore D. Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. *Nature* 1990; 344: 678-82.

Gopalakrishna R, Anderson WB. Ca<sup>2+</sup>- and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 6758-6762.

Goucherot-Pocidaló MA and Revillard JP. Oxidative stress cytokines and lymphocyte activation. In: Fuchs J, Packer L, Eds. Oxidative stress in dermatology. New York: Marcel Dekker Inc. 1993:187-205

Grazioli V, Schiavo R, Casari E, Marzatico F, Rodriguez y Baena R, Gaetani P. Antioxidant enzymatic activities and lipid peroxidation in cultured human chondrocytes from vertebral plate cartilage. *FEBS Lett* 1998; 431: 149-53

Green IC, Wagner DA, Glowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SB. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126: 131-138.

Grisham MB, Reactive oxygen metabolism. In: Grisham MB, ed. Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine. Austin: R. G. Landers Company, 1992; 39.

Grynberg NF, Echevarria A, Lima JE, Pamplona SS, Pinto AC, Maciel MA. Anti-tumour activity of two 19-nor-clerodane diterpenes, trans-dehydrocrotonin and trans-crotonin, from *Croton cajucara*. *Planta Med* 1999; 65: 687-689.

- Guerrero MF, Carron R, Martin ML, San Roman L, Reguero MT. Antihypertensive and vasorelaxant effects of aqueous extract from *Croton schiedeanus* Schlecht in rats. *J Ethnopharmacol* 2001; 75: 33-36.
- Gurgel LA, Silva RM, Santos FA, Martins DT, Mattos PO, Rao VS. Studies on the antidiarrhoeal effect of dragon's blood from *Croton urucurana*. *Phytother Res* 2001; 15: 319-322.
- Gutteridge JM. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact* 1994; 91: 133-140.
- Gutteridge JM. Hydroxyl radicals, iron, oxidative stress, and neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738: 201-213.
- Haaven C and Vermes I. Apoptosis and inflammation. In: mediators of Inflammation. Eds. Haaven, C Vermes I., 4:5-15, Oxford, London: Rapid communication of Oxford Ltda, 1995.
- Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 1991; 281: 9-19.
- Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 715S-725S.
- Halliwell B, Gutteridge J M C. Free radicals in biology and medicine. 2 ed. Oxford University Press, 1989. p.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990; 186: 1-85.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Formation of thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts. *FEBS Letters* 1981; 128: 347-352.
- Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91: 14-22.
- Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Rad Biol Med* 1994; 16: 845-850.

- Hancock JT, Maly FE, Jones OT. Properties of the superoxide-generating oxidase of B-lymphocyte cell lines. Determination of Michaelis parameters. *Biochem J* 1989; 262: 373-375.
- Harada Y, Tanaka K, Uchida Y, Ueno A, Oh-Ishi S, Yamashita K, Ishibashi M, Miyazaki H, Katori M. Changes in the levels of prostaglandins and thromboxane and their roles in the accumulation of exudate in rat carrageenin-induced pleurisy-- a profile analysis using gas chromatography-mass spectrometry. *Prostaglandins* 1982; 23: 881-895.
- Harman D. Free radical theory of aging. *Mutat Res* 1992; 275: 257-266.
- Hart BA, Ram T, Vai Ching IP, Van Di H, Labodie RP. How flavonoids inhibit the generation of luminol-dependent chemiluminescence by activated human neutrophils. *Chem Biol Interact* 1990; 73: 323-335.
- Hartmann A, Speit G. Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the single cells gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test. *Environ Mol Mutagen* 1994; 23: 299-305.
- Heinonen MI, Meyer AS, Frankel E. Antioxidant Activity of Berry Phenolics on Human Low-Density Lipoprotein and Liposome Oxidation. *J Agr Food Chem* 1998; 46: 4107-4112.
- Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993; 342: 1007-1011.
- Hiruma-Lima CA, Gracioso JS, Rodriguez JA, Haun M, Nunes DS, Souza Brito AR. Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol* 2000; 69: 229-234.
- Hiruma-Lima CA, Spadari-Bratfisch RC, Grassi-Kassisse DM, Brito AR. Antiulcerogenic mechanisms of dehydrocrotonin, a diterpene lactone obtained from *Croton cajucara*. *Planta Med* 1999; 65: 325-330.

- Holiand JA, Pritchard KA, Pappolla MA, Wolin MS, Rogers NJ, Stemerman MB. Bradykinin induces superoxide anion release from human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1990; 143: 21-25.
- Horakova Z, Bayer BM, Almeida AP, Beaven MA. Evidence that histamine does not participate in carrageenan-induced pleurisy in rat. *Eur J Pharmacol* 1980; 62: 17-25.
- Hsie AW, Recio L, Katz DS, Lee CQ, Wagner M, Schenley RL. Evidence for reactive oxygen species inducing mutations in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83: 9616-9620.
- Hua XY. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide in relation to peripheral functions of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986; 551: 1-45.
- Hunskar S, Farmer OB, Hole K. Formalin test in mice, a usefui technique for evaluating mild analgesic. *J Neurosci Meth* 1985; 14: 69-76.
- Hunskar S, Hole K. The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and non-inflammarorypain. *Pain* 1987; 30: 103-114.
- Ichihara Y, Takeya K, Hitotsuyanagi Y, Morita H, Okuyama S, Sukanuma M, Fujiki H, Motidome M, Itokawa H. Cajucarinolide and isocajucarinolide: anti-inflammatory diterpenes from *Croton cajucara*. *Planta Med* 1992; 58: 549-551.
- Ignarro LJ. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem Pharmacol* 1991; 41: 485-490.
- Ischiropouios H, Zhu L, Beckman JS. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298: 446-451.
- Jaeschke H. Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 209: 104-111.
- Jaruga P, Zastawny TH, Skokowski J, Dizdaroglu M, Olinski R. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. *FEBS Lett* 1994; 341: 59-64.

- Jernstrom B, Morgenstern R, Moldeus P. Protective role of glutathione, thiols, and analogues in mutagenesis and carcinogenesis. *Basic Life Sci* 1993; 61: 137-147.
- Ji LL. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Rad Biol Med* 1995; 18: 1079-1086.
- Jialal I, Devaraj S. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clin Chem* 1996; 42: 498-506.
- Kaltschimidt C, Kaltschimidt B, Lanes-Vieira J, Kreutzberg GW, Wekerle H Bacuerle PA and Gehrmann J. Transcription factor NFkB is activated in microglia during experimental autoimmune encephalomyelites. *J Neuroimmunol* 1994; 55: 99-106.
- Kaneko M, Hayashi J, Saito I, Miyasaka N. Probucol downregulates E-selectin expression on cultured human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 1047-1051.
- Kasamatsu T, Kohda K, Kawazoe Y. Comparison of chemically induced DNA breakage in cellular and subcellular systems using the comet assay. *Mutat Res* 1996; 369: 1-6.
- Katori M, Harada Y, Tanaka K, Miyazaki H, Ishibashi M, Yamashita Y. Changes of prostaglandin and thromboxane levels in pleural fluid of rat carrageenin-induced pleurisy. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* 1980; 8: 1733-1737.
- Khatsenko OG, Gross SS, Rifkind AB, Vane JR. Nitric oxide is a mediator of the decrease in cytochrome P450-dependent metabolism caused by immunostimulants. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 11147-11151.
- King PA, Anderson VE, Edwards JO, Gustafson G, Plumb RC and Suggs JW. A stable solid that generates hydroxyl radical upon dissolution in aqueous solutions: reaction with proteins and nucleic acid. *J Am Chem Soc* 114: 5430.
- Kitazawa E, Sato A, Takahashi S, Kuwano H, Ogiso A. Novel diterpenelactones with anti-peptic ulcer activity from *Croton sublyratus*. *Chem Pharm Buli* 1980; 28: 227-234.

- Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnström G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research* 1996; 363: 89-96.
- Klug-Roth D, Fridovich I, Rabani J. Pulse radiolytic investigations of superoxide catalyzed disproportionation. Mechanism for bovine superoxide dismutase. *J Am Chem Soc* 1973; 95: 2786-2790.
- Kolodziej H, Haberland C, Woerdenbag HJ, Konings AWT. Moderate cytotoxicity of proanthocyanidins to human tumor cell lines. *Phytother Res* 1995; 9: 410-415.
- Kondo K, Kurihara M, Miyata N, Suzuki T, Toyoda M. Mechanistic studies of catechins as antioxidants against radical oxidation. *Arch Biochem Biophys* 1999; 362: 79-86.
- Kreja L, Selig C, Nothdurft W. Assessment of DNA damage in canine peripheral blood and bone marrow after total body irradiation using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat Res* 1996; 359: 63-70.
- Kupchan SM, Hemingway RJ, Smith RM. Tumor inhibitors. XLV. Crotepoxyde, a novel cyclohexane diepoxide tumor inhibitor from *Croton macrostachys*. *J Org Chem* 1969; 34: 3898-3902.
- Lang I, Deak G, Muzes G, Pronai L, Feher. Effect of the natural bioflavonoid antioxidant silymarin on superoxide dismutase (SOD) activity and expression in vitro. *J. Biotechnol Ther* 1993; 4: 263-270.
- Larson RA. The antioxidants of higher plants. *Biochemistry* 1988; 27: 969-978.
- Leah RB, Casareno DW, Gitlin JD. The copper chaperone CCS directly interacts with copper/Zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1998; 273: 23635-23638.
- Lewis JE, Jensen PJ, Wheelock MJ. Cadherin function is required for human keratinocytes to assemble desmosomes and stratify in response to calcium. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 870-877.
- Li WG, Zhang XY, Wu YJ, Tian X. Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds. *Acta Pharmacol Sin* 2001; 22: 1117-1120.

- Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 1995;11: 376-381.
- Lin SY, Chang HP. Induction of superoxide dismutase and catalase activity in different rat tissues and protection from UVB irradiation after topical application of *Ginkgo biloba* extracts. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1997; 19: 367-371.
- Liu JP. Protein kinase C and its substrates. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 116: 1-29.
- Lo YY, Conquer JA, Grinstein S, Cruz TF. Interleukin-1 beta induction of c-fos and collagenase expression in articular chondrocytes: involvement of reactive oxygen species. *J Cell Biochem* 1998; 69:19-29.
- Lum H, Gibbs L, Lai L, Malik AB. CD18 integrin-dependent endothelial injury: effects of opsonized zymosan and phorbol ester activation. *J Leukoc Biol* 1994 ; 55: 58-63.
- MacMillan-Crow LA, Crow JP, Thompson JA. Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* 1998; 37: 1613-1622.
- MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol* 2001; 429: 195-207.
- MacPherson JC, Comhair SA, Erzurum SC, Klein DF, Lipscomb MF, Kavuru MS, Samoszuk MK, Hazen SL. Eosinophils are a major source of nitric oxide-derived oxidants in severe asthma: characterization of pathways available to eosinophils for generating reactive nitrogen species. *J Immunol* 2001; 166: 5763-5772.
- Martins AP, Salgueiro LR, Goncalves MJ, Vila R, Tomi F, Adzet T, da Cunha AP, Canigüeral S, Casanova J. Antimicrobial activity and chemical composition of the bark oil of *Croton stellulifer*, an endemic species from S. Tome e Principe. *Planta Med* 2000; 66: 647-650.
- Masquelier J, Michaud J. Action bactéricide et antivirale du vin. C.R. 104e Congrès National des Sociétés Savantes, Bourdeaux Sciences, 1979; Fasc. II: 447-457

- Matés JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32: 595-603.
- Matsubara T, Ziff M. Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J Immunol* 1986; 137: 3295-3298.
- McChesney JD, Clark AM, Silveira ER. Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus*. II. ent-Beyer-15-en-18-oic acid. *Pharm Res* 1991; 8: 1243-1247.
- McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312: 159-63.
- McCord JM. The superoxide free radical: its biochemistry and pathophysiology. *Surgery* 1983; 94: 412-414.
- McDonald S, Prenzler PD, Antolovich M, Robards K. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry* 2001; 73: 73-84.
- McKay IA, Winyard P, Leigh IM, Bustin SA. Nuclear transcription factors: potential targets for new modes of intervention in skin disease. *Br J Dermatol* 1994; 5: 591-597.
- Meier B, Scherk C, Schmidt M, Parak F. pH-dependent inhibition by azide and fluoride of the iron superoxide dismutase from *Propionibacterium shermanii*. *Biochem J* 1998; 331: 403-407.
- Melzer R, Fricke U, Holz J. Vasoactive properties of procyanidins from *Hypericum perforatum* L. in isolated porcine coronary arteries. *Arzneimittelforschung* 1991; 41: 481-483.
- Merry P, Winyard PG, Morris CJ, Grootveld M, Blake DR. Oxygen free radicals, inflammation, and synovitis: the current status. *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 864-870.
- Middleton Jr E, Kandaswami C, Theoharides TC. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 673-751,

- Miles AM, Grisham MB. Antioxidant properties of aminosalicylates. *Methods Enzymol* 1994; 234: 555-72
- Moini H, Arroyo A, Vaya J, Packer L. Bioflavonoids effects on the mitochondrial respiratory electron transport chain and cytochrome c redox state. *Redox Report* 1999; 4: 35-41.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.
- Moran JF, Klucas RV, Grayer RJ, Abian J, Becana M. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 861-870.
- Morel I, Lescoat G, Cogrel P, Sergent O, Padeloup M, Brissot P, Cillard P, Cillard J. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem Pharmacol* 1993; 43: 13-19.
- Mukherjee R, Ayr E M. Cicitols from *Croton celtidifolius*. *Phytochemistry* 1984; 23: 2682-2684.
- Muller A and Sies H. Role of alcohol dehydrogenase activity and of acetaldehyde in ethane and pentane production by isolated perfused rat liver. *Biochem J* 1982; 206: 153-156.
- Murray CW, Porreca F, Cowan A. A methodological refinements to the mouse paw formalin test. *J. Pharmacol. Methods* 1988; 20: 175-186.
- Naqui A, Chance B. Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Annl Rev Biochem* 1986; 55:137-166.
- Natarajan V. Oxidants and signal transduction in vascular endothelium. *Lab Clin Med* 1995; 125: 26-37.
- Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6: 3051-3064.

- Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB. Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem* 1986; 55: 69-102.
- Niki E. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 1119S-1124S.
- Nishida Y, Yoshizawa K, Akamatsu T. Preparation of iron (III) complex with nitrilotriacetic acid and origin of its unique reactivity. *Chemistry Letters* 1991: 1521-1524.
- Noreen Y, Ringbom T, Perera P, Danielson H, Bohlin L. Development of a radiochemical cyclooxygenase-1 and -2 in vitro assay for identification of natural products as inhibitors of prostaglandin biosynthesis. *J Nat Prod* 1998a; 61: 2-7.
- Noreen Y, Serrano G, Perera P, Bohlin L. Flavan-3-ols isolated from some medicinal plants inhibiting COX-1 and COX-2 catalysed prostaglandin biosynthesis. *Planta Med* 1998b; 64: 520-524.
- Oliveira AC, Leal-Cardoso JH, Santos CF, Morais SM, Coelho-De-Souza AN. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34: 1471-1474.
- OMS, 1978 in: Alzugaray D, Alzugaray C, (1983) Plantas que curam, ed Três Livros e Fascículos, 1; 8-14.
- OMS, Organización Mundial de La Salud. Situación regulamentaria de los medicamentos: una reseña mundial. Traducción del inglés: Organización Panamericana de la Salud. Washington: OPAS, 2000. 62p.
- Patel KD, Zimmerman GA, Prescott SM, McEver RP, McIntyre TM. Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils. *J Cell Biol* 1991; 112: 749-759.
- Pattichis K, Louca LL, Jarman J, Sandler M, Glover V. Phenolic substances in red wine and release of platelet 5-hydroxytryptamine. *Lancet* 1993; 341: 1104.
- Perdue GP, Blomster RN, Blake DA, Farnsworth NR. South American plants II: taspine isolation and anti-inflammatory activity. *J Pharm Sci* 1979; 68: 124-126.

- Peters RR, Avaliação da atividades antinociceptivas e antiinflamatórias de extrato bruto, frações, sub-frações e compostos isolados de *Wilbrandia ebracteata* COGN. Florianópolis, 1997, 136f. Dissertação (mestrado em Farmacologia), Curso de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.
- Pieters L, de Bruyne T, Claeys M, Vlietinck A, Calomme M, vanden Berghe D. Isolation of a dihydrobenzofuran lignan from South American dragon's blood (*Croton* spp.) as an inhibitor of cell proliferation. *J Nat Prod* 1993; 56: 899-906.
- Pober JS, Cotran RS. Cytokine and endothelial cell biology. *Physiol. Rev.* 1990; 70: 427-451.
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991; 288: 481-487.
- Ricardo-da-Silva JM, Darmon N, Fernandez Y, Mitjavila S. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *J Agric. Food Chem* 1991; 39: 1549-1552.
- Rice-Evans CA, Miller NJ. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 790-795.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 933-956.
- Riedl KM, Hagerman AE, Jones GA, Sovik KN, Richard NT, Riechel TL, Hartzfeld PW. Tannins as biological antioxidants. Third Tannin Conference, Bend, Oregon, USA, 1998: 169-170.
- Rikans LE, Hornbrook KR. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1362: 116-27.
- Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology* 1988; 37: 837-841.

- Robinson EE, Maxwell SR, Thorpe GH. An investigation of the antioxidant activity of black tea using enhanced chemiluminescence. *Free Radic Res* 1997; 26: 291-302.
- Rocha e Silva MO. Brief story of inflammation In: Handbook of experimental pharmacology. Eds. Vane JR, Ferreira SH, p. 6-25. New York:Springer-verlag, 1978.
- Roengsumran S, Petsom A, Kuptiyanuwat N, Vilaivan T, Ngamrojnavanich N, Chaichantipyuth C, Phuthong S. Cytotoxic labdane diterpenoids from *Croton oblongifolius*. *Phytochemistry* 2001; 56: 103-7.
- Salvemini D, Masferrer JL. Interactions of nitric oxide with cyclooxygenase: *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* studies. *Methods Enzymol* 1996; 269: 12-25.
- Salvemini D, Mazzon E, Dugo L, Riley DP, Serraino I, Caputi AP, Cuzzocrea S. Pharmacological manipulation of the inflammatory cascade by the superoxide dismutase mimetic, M40403. *Br J Pharmacol* 2001; 132: 815-827.
- Saivemini D, Riley DP, Lennon PJ, Wang ZQ, Currie MG, Macarthur H, Misko TP. Protective effects of a superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite decomposition catalysts in endotoxin-induced intestinal damage. *Br J Pharmacol* 1999;127: 685-692.
- Salvemini D, Wang ZQ, Bourdon DM, Stern MK, Currie MG, Manning PT. Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan-induced rat paw edema. *Eur J Pharmacol* 1996; 303: 217-220.
- Sanchez-Mateos P, Cabanas C, Sanchez-Madrid F. Regulation of integrin function. *Semin Cancer Biol* 1996; 7: 99-109.
- Sandalio LM, Lopez-Huertas E, Bueno P, Del Rio LA. Immunocytochemical localization of copper, zinc superoxide dismutase in peroxisomes from watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.) cotyledons. *Free Radic Res* 1997; 26: 187-194.

- Sandstrom J, Nilsson P, Karlsson K, Marklund SL. 10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *J Biol Chem* 1994; 269: 19163-19166
- Santana AC, Hyslop S, Antunes E, De Nucci G, Bakhle YS. Anti-inflammatory activities of Ph CL28A in rats in vivo. *Eur J Pharmacol* 1993; 231: 237-242.
- Saran M, Bors W. Oxygen radicals acting as chemical messengers: a hypothesis. *Free Radic Res Commun* 1989; 7: 213-220.
- Sasaki YF, Nishidate E, Izumiyama F, Matsusaka N, Tsuda S. Simple detection of chemical mutagens by the alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow). *Mutat Res* 1997; 391: 215-231.
- Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 1989; 83: 865-875.
- Schraufstatter I, Hyslop PA, Jackson JH, Cochrane CG. Oxidant-induced DNA damage of target cells. *J Clin Invest* 1988; 82: 1040-1050.
- Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun* 1992;17: 221-37.
- Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991; 10: 2247-2258.
- Scott DT, Lam FY, Ferrell WR. Acute joint inflammation--mechanisms and mediators. *Gen Pharmacol* 1994; 25: 1285-1296.
- Segal AW. Components of the microbicidal oxidase of phagocytes. *Biochem Soc Trans* 1991;19: 49-50.

- Shaman Pharmaceuticals, 2002, site oficial da Shaman Pharmaceutical  
[www.shaman.com](http://www.shaman.com)
- Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 1989; 38: 347-52.
- Shimada T, Watanabe N, Hiraishi H, Terano A. Redox regulation of interleukin-8 expression in MKN28 cells. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 266-73.
- Siegmund E, Cadmus, R. Lu G. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesic. *Proc. Soc Exp Biol Med* 1957; 95: 729-731.
- Silva RM, Santos FA, Maciel MA, Pinto AC, Rao VS. Effect of trans-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara* on experimental hypertriglyceridaemia and hypercholesterolaemia induced by Triton WR 1339 (tyloxapol) in mice. *Planta Med* 2001; 67: 763-765.
- Smith (1988). Flora ilustrada catarinense, 1988.
- Snyder SH. Nitric oxide. No endothelial NO. *Nature* 1995; 377: 196-7.
- Souccar C, Lapa AJ, Analgesic and anti-inflammatory screening of two Brazilian medicinal plants: A positive and false positive result. *Ciencia e Cultura* 1997 49:416-421.
- Spector A Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action. *FASEB J* 1995; 9:1173-1182.
- Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-314
- Starvic B. Role of chemopreventers in human diet. *Clin Biochem* 1994; 27: 319-332.
- Steinbrecher UP, Zhang HF, Loughheed M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 1990; 9:155-168.
- Stich HF. The beneficial and hazardous effects of simple phenolic compounds. *Mutat Res* 1991; 259: 307-324.

- Stirpe F, Pession-Brizzi A, Lorenzoni E, Strocchi P, Montanaro L, Sperti S. Studies on the proteins from the seeds of *Croton tiglium* and of *Jatropha curcas*. Toxic properties and inhibition of protein synthesis in vitro. **Biochem J** 1976; 156: 1-6.
- Storey KB. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Braz J Med Biol Res** 1996; 29: 1715-1733.
- Stralin P, Marklund SL. Effects of oxidative stress on expression of extracellular superoxide dismutase, CuZn-superoxide dismutase and Mn-superoxide dismutase in human dermal fibroblasts. **Biochem J** 1994 ; 298: 347-352.
- Stroppolo ME, Sette M, O'Neill P, Poiizio F, Cambria MT, Desideri A. Cu,Zn superoxide dismutase from *Photobacterium leiognathi* is an hyperefficient enzyme. **Biochemistry** 1998; 37: 12287-12292.
- Stuehr DJ. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 1997; 37: 339-359.
- Subarnas A, Wagner H. Analgesic and anti-inflammatory activity of the proanthocyanidin shelleagueain A from *Polypodium feei* METT. **Phytomedicine** 2000; 7: 401-405.
- Sugishita E, Amagaya S, Ogihara Y. Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. **J Pharmacobiodyn** 1981; 4: 565-575.
- Sun E, Xu H, Liu Q, Zhou J, Zuo P, Wang J. The mechanism for the effect of selenium supplementation on immunity. **Biol Trace Elem Res** 1995; 48: 231-238.
- Susin MF. Avaliação do potencial antioxidante, pró-oxidante e genotóxico de compostos fenólicos: estudos *in vivo* e *in vitro*. Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Santa Catarina p 1-75. Florianópolis, Brasil, Trabalho de conclusão da graduação em Ciências Biológicas. 1999
- Szabo C, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman AL . DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. **Proc Natl Acad Sci** 1996; 93: 1753-1758.

- Taher MM, Garcia JG, Natarajan V. Hydroperoxide-induced diacylglycerol formation and protein kinase C activation in vascular endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 1993; 303: 260-266.
- Takecki M, Tanaka T, Takehara M, Nonaka GI, Nishioka I. Structure and antileherpetic activity among the tannins. *Phytochemistry* 1985; 24: 2245-2250.
- Tappel AL. Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Methods Enzymol* 1978; 52: 506-513.
- Tauber AI, Brettler DB, Kennington EA, Blumberg PM. Relation of human neutrophil phorbol ester receptor occupancy and NADPH-oxidase activity. *Blood* 1982; 60: 333-339.
- Tauber AI, Fay JR and Marletta MA. Flavonoid inhibition of the human neutrophil NADPH-oxidase. *Biochem Pharmacol* 1984; 33: 1367-1369.
- Teissedre PL, Waterhouse AL, Frankel EN. Principal phytochemicals in French Syrah and Grenache Rhône wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low density lipoproteins. *J Int Sci Vigne Vin* 1995; 12: 1-8.
- Teixeira HD, Schumacher RI, Meneghini R Lower intracellular hydrogen peroxide levels in cells overexpressing CuZn-superoxide dismutase *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 7872-7875.
- Torres SRR. Estudo da atividade antiinflamatória dos ligantes do receptor periférico dos benzodiazepínicos: PK11195 e Ro5-4864. Departamento de farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina p1-136, Florianópolis, Brasil, Dissertação de mestrado, 2000.
- Traenckner EB, Wilk S, Baeuerle PA. A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B. *EMBO J* 1994; 13: 5433-5441.
- Tuo J, Loft S, Thomsen MS, Poulsen HE. Benzene-induced genotoxicity in mice *in vivo* detected by the alkaline comet assay: reduction by CYP2E1 inhibition. *Mutat Res* 1996; 368: 213-219.

- Ursini F, Maiorino M, Morazzoni P, Roveri A, Pifferi G. A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radic Biol Med* 1994; 16: 547-553.
- Utsunomiya I, Nagai S, Oh-ishi S. Differential effects of indomethacin and dexamethasone on cytokine production in carrageenin-induced rat pleurisy. *Eur J Pharmacol* 1994; 252: 213-218.
- Vacher PJ, Duchéne-Marullaz P, Barbot P. A propos de quelques produits usuels-comparaison de deux méthodes d'étude des analgésiques. *Med Exp* 1964; 11: 51-58.
- Vaisberg AJ, Milla M, Planas MC, Cordova JL, de Agusti ER, Ferreyra R, Mustiga MC, Carlin L, Hammond GB Taspine is the cicatrizant principle in Sangre de Grado extracted from *Croton lechleri*. *Planta Med* 1989; 55: 140-143.
- Van der Vliet A, Smith D, O'Neill CA, Kaur H, Darley-Usmar V, Cross CE, Halliwell B. Interactions of peroxynitrite with human plasma and its constituents: oxidative damage and antioxidant depletion. *Biochem J* 1994; 303: 295-301.
- Vanderlinde, FA. Mecanismos envolvidos com a atividade antinociceptiva do extrato aquoso, de um fração purificada e compósitos terpenóides obtidos das cascas do *Croton cajucara* Benth (sacaca). Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Pós graduação em Farmacologia, Tese de Doutorado, 117 p. 1999.
- Videla LA, Fernandez V, Valenzuela A, Ugarte G. Effect of (1)-cianidanol-3 on the changes in liver glutathione content and lipoperoxidation induced by acute ethanol administration in the rat. *Pharmacology* 1981; 22: 343-348.
- Vinson JA, Jang J, Dabbagh YA, Serry, MM and Cai, S. Plant polyphenols exhibit lipoprotein-bound antioxidant activity using an *in vitro* oxidation model for heart disease. *J Agr Food Chem* 1995; 43: 2797-2798.
- Walcheck B, Kahn J, Fisher JM et al. Neutrophil rolling altered by inhibition of L-selectin shedding in vitro. *Nature* 1996; 380: 720-723.

- Waldo GS, Penner-Hahn JE. Mechanism of manganese catalase peroxide disproportionation: determination of manganese oxidation states during turnover. *Biochemistry* 1995; 34: 1507-1512.
- Walsh GM. Advances in the immunobiology of eosinophils and their role in disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1999; 36: 453-496.
- Wang H, Cao G, Prior R. Total antioxidant capacity of fruits. *J Agr Food Chem* 1996; 44: 701-5.
- Wang JP, Ho TF, Chang LC, Chen CC. Anti-inflammatory effect of magnolol, isolated from *Magnolia officinalis*, on A23187-induced pleurisy in mice. *J Pharm Pharmacol* 1995; 47: 857-860.
- Whittle, BA. Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. *Int J Neuropharmacol* 1964; 3: 369-378.
- Williams RJP. The necessary desirable production of radicals in biology. *Phil Trans Roy Soc Lond B* 311, 593-603
- Willis, AL. (1969) Release of histamine, kinin and prostaglandin during carrageenan-induced inflammation in the rat. In *Prostaglandins, peptides and amines*, ed. by P. Mantegazza and E. W. Horton, London and New York, p.31.
- Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs 1962 544-547.
- Winyard PG, Blake DR. Antioxidants, redox-regulated transcription factors, and inflammation. *Advances in pharmacology*, Academic press. Inc. London, UK. 1997; 38:403-421.
- Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996; 313: 17-29.
- Wiseman SA, Mathot JN, de Fouw NJ, Tijburg LB. Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits. *Atherosclerosis* 1996; 120: 15-23.

- Wolfe SL and Horrocks LA. In: ***Basis neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects***. Eds. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB, et al. P. 475-498, New York; Raven press Ltda, 1994.
- Wu W, Samoszuk MK, Comhair SA, Thomassen MJ, Farver CF, Dweik RA, Kavuru MS, Erzurum SC, Hazen SL. Eosinophils generate brominating oxidants in allergen-induced asthma. ***J Clin Invest*** 2000; 105: 1455-1463.
- Xia ZF, Hollyoak M, Barrow RE, He F, Muller MJ, Herndon DN. Superoxide dismutase and leupeptin prevent delayed reperfusion injury in the rat small intestine during burn shock. ***J Burn Care Rehabil*** 1995; 16: 111-117.
- Yamanaka N, Oda O, Nagao S. Green tea catechins such (-)-epicatechin and (-)-epigallocatechin accelerate Cu<sup>2+</sup>-induced low density lipoprotein oxidation in propagation phase. ***FEBS Letters*** 1997; 401: 230-234.
- Yamashina K, Miller BE, Heppner GH. Macrophage-mediated induction of drug-resistant variants in a mouse mammary tumor cell line. ***Cancer Res*** 1986; 46: 2396-2401.
- Yen G, Hsieh C. Antioxidant activity of Extracts from Du-zhong (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models in vitro. ***J Agr Food Chem*** 1998; 46: 3952-3957.
- Younes M and Siegers CP. Inhibitory action of some flavonoids on enhanced spontaneous lipid peroxidation following glutathione depletion. ***Planta Med*** 1981; 43: 240-244.