

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO
METANÓLICO DE *Schinus terebinthifolius* Raddi, DO
METIL GALATO E DE DERIVADOS CARBOHIDRAZIL
EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO EXPERIMENTAL**

EDNA KIYOMI KASSUYA IRIGUCHI

**DOURADOS MS
2012**

EDNA KIYOMI KASSUYA IRIGUCHI

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO
METANÓLICO DE *Schinus terebinthifolius* Raddi, DO METIL
GALATO E DE DERIVADOS CARBOHIDRAZIL EM MODELOS
DE INFLAMAÇÃO EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados – Faculdade de Ciências da Saúde, para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya

Co-orientador: Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Júnior

**DOURADOS MS
2012**

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela força e presença em todos os momentos, por me conceder serenidade e por tornar tudo possível colocando pessoas maravilhosas no meu convívio.

Aos meus pais Yoshio (*in memoriam*) e Ivako, pela minha vida e pelos conhecimentos passados.

Aos meus irmãos que sempre me apoiaram principalmente ao Roberto que me incentivou e sempre torceu por mim.

A minha família, que foi capaz de aceitar a minha ausência.

A Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade de fazer o mestrado.

Agradeço de forma especial, a minha orientadora Profa. Cândida Leite Aparecida Kassuya, pela confiança, paciência, amizade e por entender os meus limites e dificuldades.

Ao meu co-orientador Prof. Arquimedes Gasparotto Júnior e participantes da banca, por participar da concretização de mais uma etapa da minha formação profissional.

A Profa. Anelise Samara Nazari Formagio, pelo profissionalismo e competência na realização do projeto.

A Profa. Arielle Cristina Arena pela ajuda com os materiais e nos procedimentos experimentais realizados.

Aos professores, funcionários e colegas do Curso de Pós Graduação em Ciências da Saúde.

Ao Magaiver Andrade Silva, meu “irmãozinho” querido, um grande amigo que esteve sempre presente nos momentos que eu precisei, de aflições e alegrias. Sou muito grata a você.

Ao Antônio da Silva Novaes pela amizade e apoio durante as dificuldades.

Aos técnicos em geral, principalmente a Alexandra e Anália que foram essenciais na realização da minha pesquisa.

As alunas Isabella e Thaisa, pela valiosa contribuição na realização dos experimentos, por estar sempre dispostas a ajudar.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Dedicatória

Dedico essa conquista para a minha família, estrutura fundamental de apoio e amor, compartilhando comigo as alegrias e tristezas, incentivando-me a prosseguir.

Dedico a você Hiroshi, meu companheiro e dedicado marido que soube se doar em silêncio na minha ausência na criação de nossos filhos. Sei que não foi fácil, mas por confiar totalmente em você, entreguei essa responsabilidade.

Dedico a vocês, meus filhos Leandro Eiki e Giovanna Ayane, que são a minha alegria, o tesouro da minha vida. Agradeço por serem crianças maravilhosas e ter a oportunidade de ser a mãe de vocês.

Obrigada, família querida!

Sumário

Agradecimentos	iii
Dedicatória	iv
Listas de figuras	vii
Listas de abreviaturas e símbolos	viii
Resumo	xi
Abstract	xii
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 Aspectos gerais	03
2.1.1 <i>Família Anacardiaceae</i>	03
2.1.2 <i>Gênero Schinus</i>	03
2.1.3 <i>Schinus terebinthifolius</i>	03
2.2 Aspectos fitoquímicos	05
2.2.1 <i>Taninos/Polifenóis</i>	05
2.2.2 <i>Ácido gálico e derivados naturais ou sintéticos</i>	06
2.2.3 <i>Derivados de Carbohidrazida</i>	07
2.3 Propriedades farmacológicas	09
2.4 Inflamação	10
2.4.1 <i>Alterações vasculares e celulares do processo inflamatório</i>	10
2.4.2 <i>Indutores e resolução da inflamação</i>	12
2.4.3 <i>Mediadores do processo inflamatório</i>	13
2.4.3.1 <i>Aminas vasoativas (histamina e serotonina)</i>	13
2.4.3.2 <i>Eicosanóides: prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas</i>	14
2.4.3.3 <i>Citocinas e Quimiocinas</i>	16
2.5 Medicamentos anti-inflamatórios	18
3 OBJETIVO	21
3.1 <i>Objetivo geral</i>	21
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	21

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
5 ANEXOS.....	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Foto de <i>Schinus terebinthifolius</i>	04
Figura 2: Foto de folhas e frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i>	05
Figura 3: Estrutura do núcleo fundamental dos derivados 3,4,5- triidroxifenil	08

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA – ácido araquidônico

AAS - ácido acetilsalicílico

AINE – anti-inflamatório não esteroidal

AIE – anti-inflamatório esteroidal

ANOVA – análise de variância

AP-1 – proteína ativadora 1

CAMs – moléculas de adesão celular

Cg – carragenina

CHCl₃ – clorofórmio

¹³CNMR - ressonância magnética nuclear de carbono

COX – ciclooxigenase

ECM – matriz extracelular

ERO – espécies reativas de oxigênio

GCs - glicocorticóides

GR – receptor de glicocorticóide

¹HNMR - ressonância magnética nuclear de hidrogênio

ICAM-1 – molécula de adesão intercelular - 1

IκB – inibidor de kappa B

IκK – inibidor kappa B quinase

i.p. – intraperitoneal

i.pl. - intraplantar

IL – interleucina

LOX - lipooxigenase

LT – leucotrienos

LTB4 – leucotrieno B4

LTC4 – leucotrieno C4

LTD4 – leucotrieno D4

LTE4 – leucotrieno E4

mDO – mili densidade óptica

MeOH – metanol

mg/kg – miligramas por quilograma

mmol - milimol

MPO – mieloperoxidase

NF-kB – fator nuclear kappa B

nm – nanômetro

v.o. – via oral

PBS – tampão fosfato salina

PECAM-1 – molécula de adesão plaqueta/endotélio

PG – prostaglandinas

PGD2 – prostaglandina D2

PGE2 – prostaglandina E2

PGF2 – prostaglandina F2

PGG2 – prostaglandina G2

PGH2 – prostaglandina H2

PGHS – prostaglandina endoperóxido sintase

PGI2 – prostaciclina

PLA2 – fosfolipase A2

PMN – polimorfonucleares

RNA – ácido ribonucléico

s.c. – subcutânea

TLC - *layer chromatography* TLC

TNF- α – fator de necrose tumoral –alfa

TX – tromboxanos

TXA2 – tromboxano A2

TXA4 – tromboxano A4

TXB2 – tromboxano B2

μm – micrômetro

$\mu\text{g/paw}$ – microgramas/pata

VCAM-1 – molécula de adesão celular vascular – 1

Resumo

Inflamação é a resposta induzida por estímulos nocivos, com o objetivo principal de garantir a manutenção da homeostase e reparação à lesão tecidual. O metil galato é um importante componente encontrado em várias plantas medicinais, especialmente em *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), uma planta popularmente usada em doenças inflamatórias. No presente estudo, foram utilizados camundongos (n=5/grupo), para avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato metanólico e do metil galato (composto 2) obtidos de *Schinus terebinthifolius* (EMST). Uma série de derivados de 3,4,5-triidroxifenil com uma porção substituída de carbohidrazidas foram sintetizadas e quimicamente identificadas como radical carboidrazil ou 3,4,5-triidroxifenil-carboidrazida, 3,4,5-triidroxifenil-N[']-(4-metoxibenzilidene)-1-carboidrazida, 3,4,5-triidroxifenil-N[']-(4-N-dimetilaminobenzidene)-1-carboidrazida, 3,4,5-triidroxifenil-N[']-(4-nitrobenzilidene)-carboidrazida, 3,4,5-triidroxifenil-N[']-(benzilidene)- carboidrazida e avaliados quanto a sua atividade anti-inflamatória. A administração oral do EMST (100 e 300 mg/kg), do composto 2 (100 e 300mg/kg), dos compostos 3,4,5,e 6 (100 mg/kg), mas não do composto 7 (100 mg/kg), inibiram significativamente o edema induzido por carragenina na pata dos camundongos. Entretanto somente o composto 4 (100 mg/kg) inibiu a atividade da mieloperoxidase (MPO) induzida por carragenina (Cg). Quando foi aplicado localmente, o composto 2 (10 e 100 µg/pata), compostos 4, 5 e 6 (10 µg/pata) inibiram o edema induzido por carragenina e compostos 3, 4 e 6 (10 µg/pata) reduziram a atividade da MPO. Para avaliar se os derivados do metil galato apresentavam os efeitos anti-inflamatórios em outro modelo de inflamação experimental, os compostos 3 e 4 foram testados no modelo de pleurisia, induzindo inibição em parâmetros de migração de leucócitos e extravazamento de proteínas. As observações experimentais da atividade anti-inflamatória do extrato de *S. terebinthifolius* e metil galato guiaram o desenvolvimento de novos derivados de metil galato que apresentaram atividades anti-inflamatórias.

Palavras-chave: *Schinus terebinthifolius*, Anacardiaceae, camundongos, inflamação, metil galato, carbohidrazida

Abstract

Inflammation is response induced by noxious stimuli, with the main objective to provide maintenance of homeostasis and repairs the tissue injury. The methyl gallate is an important component found in several medicinal plants especially in *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) a plant popularly used against inflammatory diseases. In the present study, we used mice (n=5/group) to assess the anti-inflammatory effect of methanolic extract (MEST) and methyl gallate (compound 2) obtained from *S. terebinthifolius*. A series of 3,4,5-trihydroxyphenyl derivatives bearing a substituted carbonyl moiety were synthesized and chemically identified as radical carbonyl or 3,4,5-trihydroxyphenyl- carbonyl (compound 2), 3,4,5-trihydroxyphenyl-N'-(4-methoxybenzylidene)-1-carbonyl (compound 4) , 3,4,5-tri-hydroxyphenyl-N'-(4-N-dimethylaminobenzylidene)-1-carbonyl (compound 5), 3,4,5-tri-hydroxyphenyl-N'-(4-nitrobenzylidene)-carbonyl (compound 6), 3,4,5-tri-hydroxyphenyl-N'-(benzylidene)-carbonyl (compound 7) were evaluated for their anti-inflammatory activity. The oral administration of MEST (100 and 300 mg/kg), compound 2 (100 and 300 mg/kg), compound 3, 4, 5 and 6 (100 mg/kg), but not compound 7 (100 mg/kg), inhibited significantly the carrageenan-induced oedema in mice paw. Therefore, only compound 4 (100 mg/kg), reduced the carrageenan-increased of myeloperoxidase activity. When local application occur, compound 2 (10-100 µg/paw), 4, 5, and 6 (all at 10 µg/paw) inhibited the carrageenan-induced oedema and 3, 4, and 6 (10 µg/paw) decrease the MPO activity. To investigate if methyl gallate derivatives induced anti-inflammatory effects in another model of experimental inflammation, compound 3 and 4 were tested in pleurisy model inducing inhibition of inflammatory parameters like leukocyte migration and protein extravazation. The experimental observations from anti-inflammatory activities of *S. terebinthifolius* extracts and methyl gallate have been guiding for the development of new methyl gallate derivatives that possess anti-inflammatory activities.

Key-words: *Schinus terebinthifolius*, Anacardiaceae, mice, inflammation, methyl gallate, carbonyl

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são uma importante fonte para descoberta de novos fármacos e desempenham um papel fundamental no tratamento de doenças e têm sido empregadas com sucesso terapêutico por meio da história da humanidade [1-2]. A utilização de plantas medicinais corresponde a uma das formas mais antigas empregadas pelo homem no tratamento de vários tipos de enfermidades, objetivando a cura bem como a prevenção dos mesmos [3].

Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de produtos naturais: 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais [4]. Demonstrando assim que as plantas medicinais desempenham um papel importante para o desenvolvimento de novos medicamentos principalmente por fornecer moléculas com estrutura química inédita. Entre 1950-1970, aproximadamente 100 plantas foram utilizadas como base para desenvolvimento e descoberta de novas drogas introduzidas no mercado como a reserpina, vinblastina e vincristina. Entre 1971-1990 drogas como a artemisinina e ginkgolide foram desenvolvidas para o tratamento da malária [5].

Como exemplos clássicos de utilização de moléculas obtidas de plantas medicinais temos: i) a reserpina isolada da *Rauwolfia serpentina* utilizado para o tratamento da hipertensão arterial [6]; ii) a vinblastina e a vincristina obtidas de *Catharanthus roseus*, medicamentos utilizados no tratamento da leucemia aguda e doença de *Hodgkin* [7]; iii) a artemisinina utilizado no tratamento da malária é derivado da planta *Artemisia annua* [8-9].

No Brasil, o mercado de fitoterápicos representa 6,7% das vendas de medicamentos, movimentando em torno de quatrocentos milhões de dólares por ano [10]. Em relação a esses fitoterápicos, destaca-se o fato do extrato de *Ginkgo biloba* ser utilizado para tratar os sintomas da fase inicial da Doença de Alzheimer e demência vascular [11]. Dentre outros exemplos de medicamentos oriundos de plantas cita-se a digoxina extraído da *Digitalis sp* que é utilizada no tratamento de insuficiência cardíaca [12]; a quinina utilizada no tratamento da malária [13] e a quinidina indicada como um potente agente antiarrítmico, na terapia cardiovascular [14] ambos derivados de *Cinchona sp* [15]; a morfina, utilizada como potente analgésico; a codeína como antitussígeno, e a papaverina usada como vasodilatador derivados de *Papaver somniferum* [16].

Muitos produtos naturais podem ser encontrados no Brasil, haja vista estar nesse país a maior biodiversidade do planeta, com uma variedade de animais e plantas com moléculas bioativas em potencial para o desenvolvimento e exploração biotecnológica [17]. Ainda é um desafio para a indústria química farmacêutica desenvolver agentes mais eficazes e com menor toxicidade para tratar os sinais e sintomas da inflamação aguda, bem como para minimizar as consequências a longo prazo de doenças derivadas do processo da inflamação crônica [18].

Atualmente as plantas medicinais são utilizadas como fonte direta de agentes terapêuticos, como modelos para novos compostos sintéticos, ou como um marcador taxonômico para a descoberta de novos compostos, servindo como base de matéria-prima para a elaboração de mais semi-sintéticos compostos químicos [19].

Dentro dessa biodiversidade encontramos a planta *Schinus terebinthifolius* Raddi, da família Anacardiaceae conhecida popularmente como aroeira, aroeira-vermelha e aroeira-pimenteira. Essa planta é nativa da América do Sul e Central e é utilizada para o tratamento de inflamações [20]. Atualmente a indústria farmacêutica pesquisa e desenvolve medicamentos a partir de substâncias extraídas de *S. terebinthifolius* Raddi. Exemplo disso é o fitoterápico “Kronel”, um antimicrobiano com ação cicatrizante e anti-inflamatória para uso ginecológico, produzido pelo laboratório Pernambucano Hebron que lançou o produto no mercado nacional [21].

A síntese de análogos a partir de princípios ativos isolados de produtos vegetais tem contribuído para a obtenção de novos agentes terapêuticos. Ao isolar-se uma substância química biologicamente ativa pode-se promover modificações moleculares em sua estrutura com a finalidade de otimizar tal atividade, incorporando novos grupamentos, ou até mesmo, simplificando a molécula. Como consequência, estas ações podem modificar a potência, a duração e, também, a natureza do efeito farmacológico. A introdução de substituintes, por exemplo, pode alterar diversas propriedades físico-químicas de uma molécula como hidrofobicidade, conformação estrutural e consequentemente as suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas; além de elucidar a importância desses substituintes na sua atividade biológica [22].

Neste trabalho demonstramos a influência da introdução de diferentes substituintes na molécula do metil galato, isolado do extrato de *S. terebinthifolius*, frente à sua atividade anti-inflamatória em modelo animal.

2 Revisão da literatura

2.1 Aspectos gerais

2.1.1 Família Anacardiaceae

Schinus terebinthifolius Raddi pertence à família *Anacardiaceae*. Essa família apresenta cerca de 76 gêneros e 600 espécies [23], nas quais 15 gêneros e cerca de 70 espécies ocorrem no Brasil. Algumas plantas do mesmo gênero apresentam importância na alimentação como a castanha-de-caju (*Anacardium occidentale*), a manga (*Mangifera indica*), os cajás (*Spondias* spp), o umbu (*Spondias tuberosa*) e a seriguela (*Spondias purpurea*) entre outros [24]. Outro gênero da família *Anacardiaceae*, o *Rhus* a maior da família, com cerca de 200 espécies e estudos fitoquímicos têm demonstrado que as espécies deste gênero são ricas em flavonóides, apresentando atividade antimalárica, antiviral e citotóxica [23].

2.1.2 Gênero *Schinus*

O gênero *Schinus* apresenta 24 espécies [25]. Foi descrito pelo sueco naturalista Carolus Linnaeus em 1753 quando estabeleceu o gênero *Schinus* L., derivado de “aroeira”, nome latino dado para a árvore Mastic (*Pistacia lentiscus* L.) também da mesma família. *S. terebinthifolius* Raddi foi descrita pela primeira vez em 1820 pelo italiano Giuseppe Raddi (1770-1829). O nome *terebinthifolius* é derivado de “terebinthus”, nome em latim para a árvore Terebinto (*Pistacia terebinthus* L.) e “folium” de folhas em referências as folhas resinosas da espécie [26].

2.1.3 *Schinus terebinthifolius* Raddi

Schinus terebinthifolius é uma árvore de porte médio, entre 5-10 metros de altura, o tronco com 30-60 cm de diâmetro, revestido de casca grossa. As folhas são compostas de 3 a 10 pares de folíolos aromáticos, medindo de 3 a 5 cm de comprimento por 2 a 3 cm de largura (**Figura 1**). Os frutos são do tipo drupa, corpo globuloso ou ovóide, com cerca de 5 cm de diâmetro, aromático, adocicado, de cor vermelha e lustrosa [27]. As flores são amarelas pálidas, pequenas e dispostas em cachos piramidais [28].

A espécie *S. terebinthifolius* é uma árvore da América do Sul e Central [29], conhecida como aroeira-vermelha, aroeira-pimenteira e pimenta vermelha [30] entre outros. Como os frutos possuem a aparência de uma pimenta de coloração rosa-avermelhada é chamado também de pimenta rosa, “pink-pepper” (**Figura 2**). É comum ser encontrado entre rios e lagos e em formações florestais úmidas, mas pode crescer em qualquer tipo de solo [31], apresentando uma ampla distribuição geográfica [30]. Seus frutos são utilizados como condimento alimentar na cozinha nacional e internacional [32].

Outros nomes populares da *S. terebinthifolius* são citados como aguaráiba, aroeira, aroeira-branca, aroeira-do-brejo, aroeira-do-campo, aroeira-mansa, aroeira-negra, aroeira-vermelha, bálsamo, cabuí, coração-de-bugre, corneíba, fruto-de-raposa, fruto-de-sabiá, entre outros. Algumas sinónimas são *Sacortheca bahiensis* Turcz., *S. mellisii* Engl., *S. mucronulata* Mart., *S. terebinthifolia* Var. *damaziana* Beauverd, *S. terebinthifolia* var. *raddiana* Engl. [27].



Figura 1 – Foto de *Schinus terebinthifolius* Raddi. FONTE: Horto de Plantas Medicinais, Maria do Carmo Veira, agosto de 2011.



Figura 2 - Foto de folhas e frutos de *Schinus terebinthifolius*. FONTE: Horto de Plantas Medicinais, Maria do Carmo Veira, agosto de 2011.

2.2. Aspectos fitoquímicos

O perfil fitoquímico de *S. terebinthifolius* se caracteriza pela presença de derivados do ácido gálico, taninos, terpenos, flavonóides e saponinas. Dentre estes componentes acredita-se que as propriedades bioativos e em especial a antioxidante deve ser atribuída aos flavonóides [33-34]. No entanto a presença de taninos lhe confere a ação cicatrizante [35].

As atividades farmacológicas dos taninos, para tratar feridas, queimaduras e inflamações, podem ser explicadas por sua capacidade de precipitar as proteínas das células superficiais das mucosas e tecidos, formando uma capa protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre a pele ou local afetado, impedindo assim, o desenvolvimento de microrganismos [36].

A análise do óleo essencial extraído do fruto maduro demonstrou a presença de 18 compostos identificados com predominância de monoterpenos, sendo β -pineno o constituinte majoritário (22,56%). Já são verificadas nos frutos secos quantidades elevadas de limoneno (23,80%) [37]. Outro estudo do óleo essencial de frutos de *S. terebinthifolius*, α -pineno foi o composto majoritário (29,39%), seguido pelo limoneno (18,15%) [37].

2.2.1 Taninos/Polifenóis

Taninos são compostos fenólicos solúveis em água que tem a propriedade de precipitar alcalóides, gelatinas e outras proteínas. São classificados em taninos hidrolisáveis e taninos condensados [39]. Os taninos hidrolisáveis por hidrólise ácida liberam ácidos fenólicos tais como ácido gálico, caféico, elágico e glicose [40]. Os taninos condensados são mais complexos, são polímeros dos flavonóides [40] formados por unidades de catequinas e estão presentes em maior quantidade nos alimentos [41].

Algumas pesquisas relatam a atividade biológica dos taninos para o tratamento de diarreias, hipertensão, feridas, queimaduras, problemas renais, gástricos e inflamatórios [36].

2.2.2 *Ácido gálico e derivados naturais ou sintéticos*

O ácido gálico (3,4,5-triidroxibenzóico) é um composto que consiste em uma estrutura fenólica tri-hidroxilada e encontra aplicações em vários campos. Pode ser produzido por hidrólise de ácido tânico ou pela enzima tanino acil hidrolase conhecida como tanase. Sua principal aplicação é para a fabricação de um agente antibacteriano, utilizado com sulfonamida [42-46]. É amplamente utilizado em curtumes, corantes de tinta e na fabricação de papel [47].

Um grande número de plantas são fontes ricas de ácido gálico. O ácido gálico puro é um pó cristalino e incolor, existe em duas formas, como molécula livre e como parte de taninos. Está presente no chá, vinho tinto, frutas, bebidas e várias plantas medicinais [48-49].

O ácido gálico apresenta uma vasta gama de atividades biológicas incluindo ação antioxidante, atividades anti-inflamatórias, antimicrobiana, anticâncer [50-52], antimutagênica [53] antidiabética [54] e antialérgica [55]. Atua como agente anti-apoptótica protegendo células humanas contra danos oxidativos [56]. O ácido gálico mostrou atividade citotóxica contra as células cancerosas sem danificar as células normais [57]. Um dos mecanismos demonstrados de ação do ácido gálico é a inibição da ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) via inibição de kappa α /B quinases (I κ K α / β), levando a redução da I κ B degradação, NF- κ B translocação e ligação NF- κ B/DNA [58].

Tanto os derivados naturais como os sintéticos do ácido gálico apresentam importante atividade biológica em vários estudos. O metil galato isolado de *S.*

terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae), demonstrou boa atividade contra a inibição da liberação de histamina [59]. Duas substâncias isoladas da *Casearia sylvestris*, o éter de isobutil galato-3,5-dimetil e éter de metil galato-3,5-dimetil apresentam potencial contra tumor de Ehrlich e câncer pulmonar [60]. Além disso, dois monoterpenos conjugados com ácido gálico, globulusina A e eucaglobulina isolados de *Eucalyptus globulus* apresentaram atividade anti-inflamatória e anti-melanogênica [61]. Foi demonstrado também que o lauril, metil, propil galato induz apoptose em linhagens celulares e inibem proliferação linfocítica [62].

A abordagem com modificação estrutural de compostos de origem natural para obtenção de novas moléculas é muito útil em casos de adequação do composto às necessidades tanto do ponto de vista farmacológico quanto farmacotécnico [63]. Um exemplo clássico é do ácido salicílico, isolado da *Filipendula ulmaria* (*Spirae ulmaria* (Rosaceae) e da *Salix alba* que eram comercializado como analgésico e causava frequentes problemas gástricos. A acetilação da hidroxila fenólica, produzindo o ácido acetilsalicílico (aspirina), amenizou estes efeitos colaterais e sua comercialização foi iniciada em 1899 [63].

2.2.3 Derivados Carbohidrazidas

Devido ao amplo espectro de propriedades biológicas e, principalmente, a sua aplicação como fármacos na química medicinal, várias sínteses de compostos carbohidrazidas foram desenvolvidas nestes últimos anos. O nosso principal objetivo com a avaliação farmacológica de derivados 3,4,5-triidroxifenil contendo na posição -1 a unidade carbohidrazida (**Figura 3**) é de contribuir na obtenção de novos agentes terapêuticos.

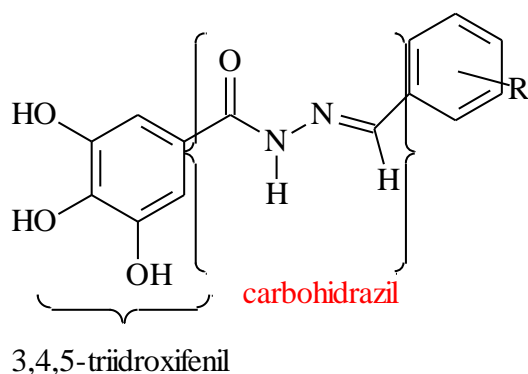
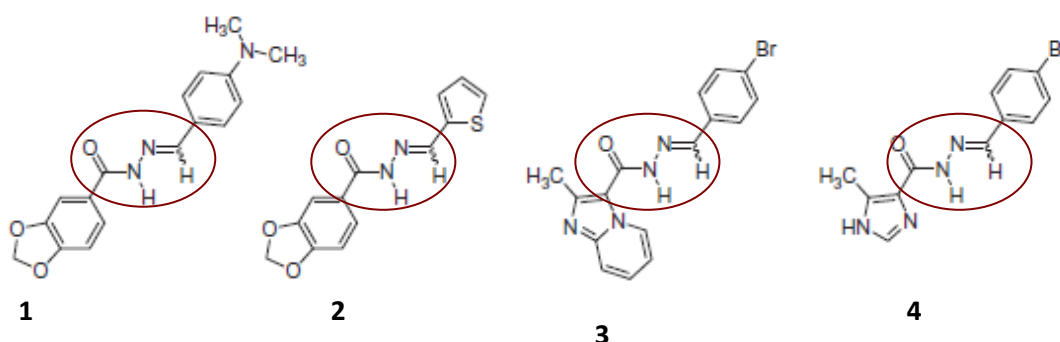


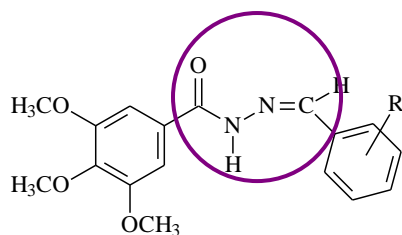
Figura 3: Estrutura do núcleo fundamental dos derivados 3,4,5-triidroxifenil contendo na posição -1 a unidade carbohidrazida, foco do nosso trabalho.

Assim, devido à inexistência de dados da literatura sobre estudos de compostos 3,4,5-triidroxifenil, contendo o grupo carbohidrazil mostraremos alguns exemplos gerais de compostos com atividade biológica, contendo este grupo.

Trabalhos da literatura têm demonstrado que a subunidade N-acilhidrazona (ou carbohidrazida), possui potente atividade antinociceptiva [61-62], anti-inflamatória [63] e estimulante cardíaca [64-65]. Protótipos ativos como os derivados **1-3** apresentaram potente atividade analgésica, no modelo de contorções abdominal induzido por ácido acético em camundongos e efeito cardioativo. O derivado **4** apresentou importante ação antinociceptiva e anti-inflamatória [66].



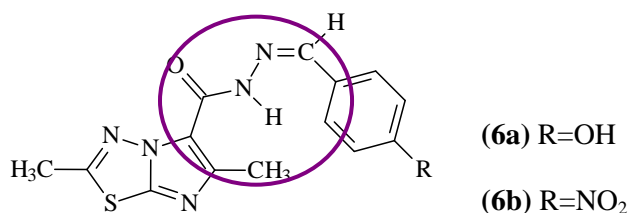
As carbohidrazidas (**5a-d**) apresentaram potente atividade antitumoral frente às células cervical e pulmão [67].



(5a) R=2-F **(5b)** R=3-F;

(5c) R=4-F **(5d)** R=4-CF₃

Em outro trabalho, foi realizada a síntese e avaliação da atividade antitumoral de vários derivados tiodiazolínicos, tendo como substituinte o grupo carbohidrazida, e os compostos que melhor apresentaram atividade foram os derivados **(6a)** e **(6b)** [68].



2.3 Propriedades farmacológicas

Schinus terebinthifolius apresenta potencialidades medicinais, auxiliando nos tratamentos de diversos males [72]. Na medicina popular é utilizado como anti-inflamatório, analgésico, depurativo, para tratar doenças do sistema urogenital [59], infecções respiratórias [73].

Extrato liofilizado da casca de *S.terebinthifolius* na dose de 440 mg/kg com tratamento oral e intraperitoneal apresentou um efeito de proteção à mucosa gástrica contra ulcerações em ratos [74]. O extrato etanólico das folhas de *S. terebinthifolius* apresentou potencial atividade antifúngica contra espécies de levedura de *Candida glabrata* e *Sporothrix schenckii* [75]. Outro estudo utilizando o óleo essencial de folhas apresentou atividade contra *Aspergillus flavus* com inibição de 58% do crescimento, *C. albicans* com inibição de 49,8% do crescimento e *Aspergillus niger* com inibição de 48,7% do

crescimento [76]. Outro estudo utilizando o óleo essencial extraído das folhas de *S. terebinthifolius* no tratamento de otites em cães por via otológica, apresentou efeito inibitório do crescimento frente a alguns agentes antibacterianos contra *Staphylococcus* spp. , *Malassezia* sp. e *Proteus* sp. [77]. Em relação à atividade cicatrizante estudos demonstraram efeito no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos tratados via intraperitoneal com extrato hidroalcoólico de *S. terebinthifolius* na dose de 100 mg/kg [78-80].

O óleo essencial extraído da casca de *S. terebinthifolius* mostrou atividade antioxidante e anticâncer [81].

Resultados demonstraram que α -pineno substância encontrada no fruto da *S. terebinthifolius* foi capaz de induzir a apoptose em modelo murino de melanoma metastático [82].

Estudos realizados por nosso grupo demonstraram (Anexo II) que a administração oral do óleo essencial do fruto inibiu em 58% o edema de pata em ratos induzido por carragenina, inibição de 91% nos parâmetros inflamatórios do modelo de bolsa de ar administrados na dose de 100 mg/kg via oral e causou inibição de 33% na inflamação induzida por adjuvante completo de Freund (CFA) na dose de 200 mg/kg [37].

2.4 Inflamação

A inflamação é uma resposta essencial que permite a sobrevivência durante a infecção ou lesão contribuindo para a manutenção da homeostase do tecido sob uma variedade de condições nocivas [83]. Mas em excesso pode levar a necrose tecidual, desequilíbrio fisiológico, fibrose, falência de órgãos e morte [84].

Os marcadores do processo inflamatório foram descritas a mais de 2.000 anos por Cornelius Celsius: calor, rubor, edema e dor [85]. Outro sinal clínico, o quinto sinal cardinal - a perda da função, foi descrito posteriormente por Virchow [86], completando os cinco sinais cardinais da inflamação aguda [87].

2.4.1 Alterações vasculares e celulares do processo inflamatório

A reação inflamatória aguda é caracterizada por uma série de eventos inter-relacionados, dentre os quais cita-se: a vasodilatação arteriolar, devido ao aumento no

fluxo sanguíneo, o aumento localizado da permeabilidade microvascular na região afetada ocasionando o edema, a dor localizada, a migração celular, o acúmulo de leucócitos inflamatórios que migram dentro do tecido, a formação de tecido de granulação e o reparo tecidual [88]. As fontes vasculares e celulares das inflamações são mediadas por várias moléculas derivadas do plasma ou de células denominadas de mediadores químicos da inflamação [89].

As alterações vasculares da inflamação aguda consistem em alterações no fluxo de sangue e na permeabilidade dos vasos. Essas mudanças no fluxo e no calibre se iniciam rapidamente, logo após a lesão e se desenvolvem em diferentes graus dependendo da sua gravidade. A vasodilatação, com ou sem vasoconstrição causa aumento no fluxo sanguíneo pela ação dos mediadores histamina e óxido nítrico (NO), aumentando a pressão hidrostática causando o calor e a vermelhidão no local da inflamação. Com o aumento da permeabilidade vascular ocorre um extravasamento de plasma rico em proteínas para os tecidos extravasculares, diminuindo a pressão osmótica do plasma intravascular acarretando a saída de líquido e formação do edema [90].

O aumento da permeabilidade vascular pode ser induzido por vários mecanismos, sendo o mais comum a contração das células endoteliais resultando em abertura das fendas intercelulares, permitindo o extravasamento plasmático. Outros mecanismos envolvidos incluem a lesão endotelial direta mediada por leucócitos (p.ex. queimaduras) causando necrose, extravasamento retardado prolongado (p.ex. queimadura de sol), lesão endotelial mediada por leucócitos, extravasamento através de novos capilares (angiogênese) e por transcitose que por determinados fatores induzem o extravasamento vascular [89].

O recrutamento de leucócitos no sangue é fundamental na reação inflamatória. Leucócitos, células de defesa do organismo, são derivados da medula óssea, circulam em estado inativo e são rapidamente ativados por patógenos invasores e outros estímulos. Contribui para a resposta inflamatória secretando compostos citotóxicos como espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enzimas proteolíticas presente em seus grânulos para atividade fagocítica sobre os agentes estranhos. São recrutados para o tecido inflamado por uma sequência de interações entre os leucócitos e o endotélio, que são mediadas por moléculas de adesão (CAMs) e diferentes subconjuntos de CAMs que são responsáveis pelos diferentes passos do extravasamento na superfície da célula [91-94].

Em decorrência das alterações vasculares, as células sanguíneas como as polimorfonucleares (PMNS) passam a circular mais próximas do endotélio vascular. A

migração dos PMNS da corrente sanguínea para o local da inflamação é denominada de extravasamento e pode ser dividida em várias etapas sequenciais, incluindo: marginação, rolamento transitório provocando a ativação das integrinas, aderência estável e diapedese/transmigração para o endotélio [95].

Esses eventos celulares são produzidas por proteínas expressas na membrana celular endotelial e também nos leucócitos, conhecidas como moléculas de adesão. A expressão dessas moléculas de adesão é regulada pelos vários mediadores inflamatórios e podem ser agrupados em três famílias: i) as selectinas; ii) as integrinas e; iii) as imunoglobulinas. As selectinas são compostas pela E-selectina expressa no endotélio, P-selectina, expressa em plaquetas e células endoteliais e L-selectina expressa em leucócitos [96].

As integrinas são heterodímeros formados pela associação não covalente de subunidade α e β , ambas proteínas com segmentos extracelulares sendo 18 sub-unidades- α e 8- β totalizando 24 tipos de integrinas que já foram descritas [97-98]. Essas moléculas que estão expressas na superfície dos neutrófilos, interagem com ligantes tais como colágenos, fibronectina, fibrinogênio e com as imunoglobulinas, como ICAM-1, VCAM-1 e outras. Integrinas são receptores de adesão transmembrana que facilitam a adesão celular por meio da ligação extra-celular que proporciona uma ligação mecânica entre uma célula e a matriz extracelular (ECM) [99].

Os ligantes de integrina envolvidos na adesão de leucócitos, pertencem a superfamília das imunoglobulinas e incluem moléculas de adesão intercelular ICAM (1-5) e VCAM -1, que são moléculas de adesão que agem entre as células vasculares. O receptor das imunoglobulinas envolvidos no recrutamento de leucócitos são as moléculas de adesão de plaquetas/célula endotelial (PECAM-1), que auxiliam durante a diapedese [96, 100].

2.4.2 Indutores e resolução da inflamação

Os indutores da inflamação podem ser agentes exógenos ou endógenos. Os indutores exógenos são classificados em dois grupos: microbianos e não microbianos. Existem duas classes de indução microbiana. A primeira classe associados a padrões moleculares (PAMPs) os quais são detectados diretamente por receptores específicos. A segunda classe compreende uma variedade de fatores de virulência, restrito aos agentes patogênicos. Os indutores exógenos que são de origem não microbiana incluem corpos

estranhos, alérgenos, irritantes e compostos tóxicos [101] dentre outros como calor e frio intenso.

Os indutores endógenos são sinais que se iniciam a partir da resposta inflamatória, ativando sensores especializados dando início à produção de mediadores específicos, esses sinais são produzidos devido ao estresse de tecidos danificados e células mortas ocasionando um desequilíbrio, desencadeando um processo inflamatório [101].

Os agentes indutores geram o processo inflamatório a partir da produção de vários tipos de substâncias mediadoras, alterando o funcionamento de tecidos e órgãos [102]. A lesão tecidual induzida por esse trauma resulta na liberação de mediadores inflamatórios, incluindo as citocinas, o fator de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina-1 (IL-1) a partir de leucócitos, monócitos e macrófagos [103].

A resolução completa de uma resposta inflamatória aguda e o retorno do corpo à homeostasia é necessário para a saúde [104]. Caso isso não aconteça alguns exemplos de falhas no processo de resolução são descritos como aterosclerose, obesidade, artrite reumatóide, fibrose pulmonar, câncer, esclerose múltipla, doença neurodegenerativa [105] como a doença de Alzheimer [106], dentre outras.

A resolução da inflamação aguda é um processo ativo e bem coordenado por mediadores endógenos denominados de pró-resolutivos (ex. prostaglandinas, ciclopentenonas, lipoxinas/resolvinas, NF- κ B, anexina-1 e indutores da apoptose que tem a função de reverter a vasodilatação e permeabilidade vascular, fazendo com que haja a eliminação segura de leucócitos inflamatórios, exsudato e fibrina, conduzindo assim à restauração do tecido inflamado. A resolução bem sucedida irá limitar a lesão tecidual excessiva, dando pouca oportunidade para o desenvolvimento da inflamação crônica [107]. Aliado a isso, existe a formação de mediadores pró-inflamatórios como aminas vasoativas (histamina e serotonina), metabólitos do ácido araquidônico (AA), citocinas (TNF- α , IL-1 e várias outras), quimiocinas, fator ativador de plaquetas (PAF), sistema completo, sistema de coagulação e das cininas e outros.

2.4.3 Mediadores do processo inflamatório

2.4.3.1 Aminas vasoativas (histamina e serotonina)

Histamina e serotonina são as principais aminas vasoativas, sendo denominadas desse modo porque tem importantes ações nos vasos sanguíneos. A histamina (2-[4-imidazolil]etilamina) é sintetizada a partir do aminoácido L-histidina descarboxilase, uma enzima expressa nas células do corpo, incluindo neurônios centrais do sistema nervoso, células da mucosa parietal gástrica, mastócitos e basófilos. A histamina é liberada em resposta a uma variedade de estímulos. São mediadas pela ligação com quatro subtipos de receptores, pertencentes à família dos receptores acoplados a proteína G (*G protein-coupled receptors*), tais como H₁, H₂, H₃, H₄ [90, 108-110]. A histamina é considerada o principal mediador da fase transitória, causando dilatação das arteríolas e aumento da permeabilidade das vênulas [90].

Outra amina biologicamente ativa é a serotonina conhecida como 5-hidroxitriptamina (5-HT). Esta além de ser encontrada nas terminações nervosas é encontrada também nas células neuroendócrinas, células do estômago e plaquetas. A biossíntese da serotonina acontece nos neurônios pré-sinápticos pela descarboxilação e hidroxilação do aminoácido L-triptofano [111].

A atividade biológica da serotonina é mediada por meio de interações com sete famílias de receptores diferentes (5-HT₁₋₇), composto por 14 subtipos diferentes [112]. Todos são acoplados a receptores da proteína G, com exceção do receptor 5-HT₃. O receptor 5-HT_{2A} é o mais conhecido [113]. A histamina induz a contração do músculo liso, atuando no aumento da permeabilidade vascular [114].

2.4.3.2 Eicosanóides : prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas

Os eicosanóides são produtos de oxidação de ácidos graxos insaturados e sua reação de síntese é iniciada pela liberação de ácido araquidônico (AA). O ácido araquidônico o mais importante dos precursores dos eicosanóides é um ácido graxo de 20 carbonos que é liberado a partir da hidrólise dos fosfolipídios da membrana, por meio da enzima fosfolipase A2 (PLA2) que está presente em leucócitos e plaquetas sendo ativada por citocinas inflamatórias como a IL-1 [115-116] e por outros agentes.

O AA é metabolizado em diferentes famílias dos eicosanóides por vários sistemas enzimáticos. As duas vias principais são as ciclooxigenases COX-1 e COX-2, que determinam a produção das prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs), e a via das

lipoxigenases (LOXs) que levam à síntese dos leucotrienos (LTs) e lipoxinas (5-LOX, 12-LOX e 15-LOX) uma outra via é a P450 epoxigenase [117].

Esses mediadores lipídicos biologicamente ativos servem como sinais intra ou extracelulares, incluindo a regulação da função renal, cardiovascular, gastrintestinal, inflamatória e da hemostasia [90, 118].

Os produtos da via COX como as prostaglandinas, o tromboxano e a prostaciclina coletivamente são chamados de prostanóides [116].

A COX ou prostaglandina endoperóxido sintase (PGHS) (COX-1 e COX-2) é a enzima que cataliza a conversão do ácido araquidônico em prostaglandina G₂ (PGG₂), convertendo a PGG₂ em H₂ (PGH₂). A PGH₂ intermediária é convertida por uma variedade de enzimas em PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂, PGI₂ (prostaciclina) e em tromboxanos TXA₂ [119].

A COX-1 é conhecida por ser uma enzima constitutiva presente em quase todos os tipos de células, enquanto que a COX-2 pode ser induzida por citocinas ou fatores de crescimento inflamatórios, tais como macrófagos e monócitos [120-121]. Existe outra classe denominada de COX-3, que segundo alguns estudos poderiam ser mais efetivas em cães do que em humanos ou roedores determinando possivelmente a diminuição da atenção sobre a COX-3 [122].

As prostaglandinas atuam de maneira autócrina e parácrina, implicando numa grande variedade de funções biológicas tais como vasoconstrição, vasodilatação, agregação, quimiotaxia, febre, resposta a dor e asma [123-124]. Nesta família incluem PGE₂, PGD₂ e PGF₂. O PGE₂ é um modulador implicado nas condições inflamatórias, tais como vasodilatação, dor, febre, relaxamento dos músculos lisos, função neuronal e inibição da liberação de noradrenalina a partir de terminações nervosas [124]. Os receptores de prostaglandinas pertencem a três grupos, dentro de uma subfamília distinta do receptor acoplado a proteína G. Existem quatro subtipos de receptores que se ligam a PGH₂ (EP1-EP4), dois que se ligam a PGD₂ (DP1 e DP2) e outros receptores que se ligam em PGF_{2α}, PGI₂ e TXA₂ são FP, IP e TP, respectivamente [123].

A PGH₂ é metabolizada em dois compostos altamente instáveis e biologicamente ativos com estruturas diferentes das prostaglandinas primárias, o tromboxano A₂ e a prostaciclina ou prostaglandina I₂. O tromboxano A₂, é sintetizado principalmente pelas plaquetas, causa efeitos contrários como a vasoconstrição e agregação plaquetária, tem meia-vida curta de aproximadamente 30 segundos sendo convertido não enzimaticamente em tromboxano B₂ (TXB₂), um composto estável e relativamente inativo. A PGI₂

predomina principalmente no endotélio vascular, é responsável por vasodilatação e pela inibição da adesividade plaquetária, tem meia-vida aproximadamente de três minutos sendo convertida em um composto com menor atividade, a $PGF\alpha$ [125-126].

As enzimas lipoxigenases são responsáveis pela produção dos leucotrienos, que são secretados principalmente pelos leucócitos apresentando efeitos vasculares. Existem três tipos de lipoxigenases 5-, 12- 15-lipoxigenases (LOX). A enzima converte o AA a ácido 5-hidroxi-eicosatetraenóico que é precursor dos leucotrienos [87, 90]. Pela via da lipoxigenase gera-se os quatro tipos de leucotrienos: LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 e LTE_4 [87].

O LTB_4 é um potente agente quimiotático e ativador de neutrófilos, causando agregação e adesão das células do endotélio vascular, geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e liberação de enzimas lisossômicas [90].

O leucotrieno C_4 é submetido a um metabolismo extracelular, formando LTD_4 e LTE_4 . Esses três leucotrienos (LTC_4 , LTD_4 e LTE_4) são chamados de cisteínicos, por apresentarem cisteinil na sua estrutura e são responsáveis por causar intensa vasoconstricção, broncoespasmo e permeabilidade vascular [90, 122].

Em relação as lipoxinas (LXs), essas compõem uma classe do ácido aracídico com propriedades anti-inflamatórias e imunorreguladoras. As lipoxinas são produzidos por meio da cooperação entre 5- e 12-lipoxigenase, ou durante interações celulares de 15-LO. Elas apresentam ações opostas exercidas pelas prostaglandinas e leucotrienos e as principais representantes são a LXA_4 e a LXB_4 [127]. Essas atuam como mediadores anti-inflamatórios por inibição da infiltração de neutrófilos e transmigração em locais da inflamação, por meio da indução da produção do óxido nítrico para suprimir leucócitos endoteliais e para inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, por meio de fatores de transcrição NF- κ B e proteína ativadora-1(AP-1) [128].

2.4.3.3 Citocinas e quimiocinas

As citocinas pertencem a uma família de moléculas de sinalização polipeptídicas que são liberadas por várias células em resposta a inúmeros estímulos. São proteínas regulatórias de baixo peso molecular ou glicoproteínas que se ligam a receptores específicos de uma maneira autócrina, parácrina e / ou endócrina [87, 129]. São produzidos principalmente por linfócitos ativados, macrófagos, células endoteliais, epiteliais e do tecido conjuntivo [130]. Iniciam a sua ação por meio da ligação a receptores específicos

provocando alteração da síntese do RNA e de proteínas de diferentes células do organismo [131].

Entre os reguladores mais importantes desse processo destacam-se o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina 1 (IL-1), as quais são produzidas principalmente por macrófagos.

A interleucina 1 (IL-1) como o próprio nome diz, foi a primeira a ser descrita na década de 70. Atualmente existem 11 membros da família IL-1: IL-1 α , IL-1 β , antagonista de receptor IL-1 (IL-1Ra), IL-1F5–IL-1F10, IL-18 (também conhecida como IL-1F4), IL-33 (também conhecida como IL-1F11) [132]. A IL- α e IL- β apresentam uma mínima homologia, mas possuem propriedades biológicas similares. Enquanto a IL- α é uma forma biologicamente ativa, a IL- β não tem atividade biológica até ser processado pela enzima caspase-1, mas ligam-se ao mesmo receptor IL-1R, podendo a IL- β também se ligar no receptor IL-2R [87, 133].

A IL- α está geralmente associada com a membrana plasmática e age localmente. É expressa por queratinócitos e células endoteliais, enquanto que a IL- β é secretada e circula sistemicamente sendo produzida por monócitos e macrófagos [132].

A IL-1 é uma potente citocina pró-inflamatória que atua como um pirógeno endógeno. Depois de se ligar ao receptor IL-1R, a IL-1 induz a produção de um amplo espectro de citocinas e quimiocinas, bem como a expressão de moléculas de adesão sobre as células endoteliais, levando assim ao recrutamento de células inflamatórias. Além disso, a IL-1 contribui para o desenvolvimento de dano vascular, estimulando a proliferação e diferenciação celular. O antagonista de IL-1R (IL-1Ra) é um homólogo estrutural de IL-1 que se liga a IL-1R, mas não induz qualquer resposta celular e é, por conseguinte, um inibidor natural da atividade de IL-1 [134].

O TNF- α é uma citocina multifuncional que tem papel importante na inflamação aguda e crônica, nas respostas anti-tumorais infecciosas [135]. O TNF- α pode ser produzido por macrófagos ativados, linfócitos ou monócitos, se ligam a receptores específicos denominados (TNF-R) I e II. O principal efeito fisiológico do TNF- α é promover a resposta imune e a inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de ativá-los, provocando uma série de efeitos no organismo [136].

Em relação à quimiocinas são citocinas quimiotáticas que recrutam populações específicas de leucócitos provocando o movimento destes para dentro de vários sítios

teciduais, induzindo a aderência dessas células ao endotélio vascular, onde estão envolvidas em muitos processos inflamatórios crônicos [87, 137]. É uma família de pequenas proteínas, das quais 50 quimiocinas diferentes já foram identificadas, sendo classificadas com base no número e na localização dos resíduos das cisteínas [138]. Esses quimioatraentes agem principalmente sobre neutrófilos, monócitos, linfócitos e eosinófilos [139]. As quimiocinas se ligam as moléculas por meio de receptores associados à proteína G e são classificadas em receptores CXCR, CCR, CR e CX3CR [140].

2.5. Medicamentos anti-inflamatórios

Existem vários fármacos anti-inflamatórios, mas os mais utilizados na prática clínica são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) não seletivos da COX, os AINEs seletivos da COX-2 e os anti-inflamatórios esteroidais (AIES). Outros fármacos anti-inflamatórios utilizados terapêuticamente, por exemplo, no tratamento da artrite reumatóide tem seu mecanismo de ação baseado no antagonismo de receptor para interleucina-6, antagonismo de receptor para interleucina-1, inibição da ação do TNF- α . Apesar destas classes de substâncias (AINEs e AIES) apresentarem excelentes propriedades anti-inflamatórias e serem utilizados na terapêutica clínica, seu uso produz importantes efeitos colaterais.

Em 1893 foi introduzida na medicina a primeira molécula com atividade analgésica, chamado de ácido acetilsalicílico (AAS) ou aspirina criada pelo Laboratório Bayer onde o químico alemão Felix Hoffman motivado pela preocupação com seu pai devido à artrite reumatóide, sintetizou o AAS a partir do ácido salicílico. Os AINEs, compostos anti-inflamatórios não esteróides são conhecidos pela humanidade há cerca de 100 anos e estão entre os agentes farmacológicos mais utilizados na prática médica, apresentando indicações terapêuticas como analgesia, anti-inflamação, antipirese e profilaxia contra doenças cardiovasculares [141].

Os AINEs inibem a enzima COX de ácidos graxos, deste modo há inibição da produção de PGs e TXs. As isoformas mais conhecidas são COX-1 (constitucional ou fisiológica) e COX-2 (induzida ou inflamatória), com características químicas e fisiológicas definidas apesar de existirem outras isoformas [142-143]. As COX-1 e COX-2 desempenham um papel chave no metabolismo do AA e na regulação de eicosanóides [144].

Um dos principais efeitos dos AINEs é a inibição específica da COX e consequentemente a redução da conversão do AA em PGs. A ciclooxigenase é a primeira enzima da síntese das PGs, que tem o papel de converter o AA nas PGs intermediárias instáveis que são a PGG₂, que sob a ação da peroxidase forma PGH₂, que são convertidas em PGs, PG₁₂ e TXs e as lipoxigenases transformam o AA em leucotrienos e outros compostos [93, 145]. A terapia anti-inflamatória decorre da necessidade de controlar os sinais cardinais da inflamação [146].

Os AINEs tradicionais como naproxeno, ibuprofeno, diclofenaco, indometacina, flurbiprofeno, nabumeton e aspirina inibem ambas as isoformas de COX, classificados como anti-inflamatórios não seletivos. Por atuarem nas duas isoformas, reduz a inflamação por inibir a COX-2 que é altamente seletiva, mas causa efeitos secundários gastrointestinais por inibirem a COX-1. Isto parece ser explicado pelo envolvimento de ambas isoformas na produção de prostanoídes associados com proteção gástrica, pois estudos mostram que tanto COX-1 e COX-2 apresentam-se em humanos e animais na mucosa gástrica [147].

Com a descoberta da isoforma COX-2 durante o processo inflamatório, surgiu novas perspectivas terapêuticas para o desenvolvimento de drogas com menos efeitos adversos, denominados de Coxibes ou inibidores seletivos da COX-2 [148]. Alguns exemplos de coxibes são celocoxibe, parecoxibe, valdecoxibe, etoricoxibe e rofecoxibe [143]. Em 2004 e 2005 o medicamento rofecoxibe e valdecoxibe foram retirados do mercado por causar problemas cardiovasculares e celecoxibe foi recomendado a colocação de tarja preta por apresentar risco cardiovascular [149].

Em relação aos GCs conhecidos como anti-inflamatórios esteroidais ou hormonais são bastante prescritos pois são utilizados em protocolos de tratamento de uma ampla variedade de doenças inflamatórias e autoimunes, como a artrite reumatóide, por exemplo [150]. São classificados de acordo com sua meia-vida, sua potência e sua duração de ação. Alguns exemplos são: a cortisona e a hidrocortisona (ação curta), prednisona, prednisolona, metilprednisolona e a triancinolona (ação intermediária), dexametasona e betametasona (ação longa) [151]. Os esteróides farmacêuticos são normalmente sintetizados a partir do ácido cólico, obtido do gado bovino ou de sapogeninas esteroides encontradas em plantas [116].

Depois de entrarem nas células, os GCs se ligam a receptores protéicos específicos- receptores de GC (RCG). O receptor ativado interage com a zona de regulação, atuando

com fator de transcrição, induzem a sua mudança e um sinal de translocação é exposto, ligando se ao DNA cromossômico, alterando a expressão do gene alvo em resposta a um sinal hormonal específico [150-152]. Esta ligação desencadeia ou inibe a transcrição do gene, num mecanismo clássico que é dividido em dois processos: transativação e transrepressão.

A transrepressão é uma regulação indireta da expressão do gene por interação do receptor de GC. O receptor se liga em monômeros de moléculas de GC e interagem com fatores de transcrição tais como NF- κ B e a proteína ativadora 1 (AP-1) e promove o efeito inibitório, reduz a síntese de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucinas 6 (IL-6), IL-2, TNF- α e PGs [153-154].

Já no processo de transativação o complexo glicocorticóide-receptor são translocado para o núcleo da célula, modifica a sua estrutura, no qual se liga a regiões promotoras de certos genes, denominadas elementos responsivos aos GC, induzindo a síntese, não somente de proteínas anti-inflamatórias, como a lipocortina-1 e I κ B, mas também de proteínas que atuam no metabolismo sistêmico (por exemplo, proteínas que promovem gliconeogênese) [154].

O processo transrepressão é responsável por um grande número de desejáveis efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores, sendo considerado o mecanismo chave para a atividade anti-inflamatória e a transativação está associado com efeitos adversos que ocorrem com frequência nas atividades imunossupressoras [155].

A ação anti-inflamatória resulta, sobretudo, da interação do receptor de glicocorticóide ativado com os fatores de transcrição NF- κ B e AP-1, a qual leva à inibição da expressão de moléculas pró-inflamatórias [156].

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

- ✓ Realizar o estudo da atividade anti-inflamatória do extrato metanólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi, do metil galato e de 5 novos compostos derivados carboidrazil em modelos de inflamação experimental .

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliação da atividade do extrato metanólico de *S. terebinthifolius* no modelo de edema de pata agudo e atividade da mieloperoxidase induzida por carragenina em camundongos;
- ✓ Avaliação das atividades anti-inflamatórias do metil galato e derivados carboidrazil no edema de pata agudo e atividade da mieloperoxidase induzida por carragenina em camundongos;
- ✓ Avaliação da atividade anti-inflamatória dos derivados de metil galato em modelo experimental de pleurisia induzida por carragenina em camundongos.

4 Referências

- [1] F. Constabel, Medicinal plant biotechnology, *Planta Med.* 56 (1990) 421-425.
- [2] S. Mondal, B.R. Mirdha, S.C. Mahapatra, The science behind sacredness of Tulsi (*Ocimum sanctum* Linn.), *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 53 (2009) 291-306.
- [3] M.E.A. Moraes, G.S.M. Santana, Aroeira-do-sertão: um candidato promissor para o tratamento de úlceras gástricas, *Funcap 3* (2001) 5-6.
- [4] J.B. Calixto, Biodiversidade como fonte de medicamentos, *Cienc. Cult.* 55 (2003) 37-39.
- [5] S. Verma, S.P. Singh, Current and future status of herbal medicines, *Vet.World* 1 (2008) 347-350.
- [6] S.D. Shamon, M.I. Perez, Blood pressure lowering efficacy of reserpine for primary hypertension, *Cochrane Database Syst. Rev.* (2009) CD007655.
- [7] R.L. Noble, The discovery of the vinca alkaloids--chemotherapeutic agents against cancer, *Biochem. Cell. Biol.* 68 (1990) 1344-1351.
- [8] C.J. Woodrow, R.K. Haynes, S. Krishna, Artemisinins, *Postgrad. Med. J.* 81 (2005) 71-78.
- [9] P.J. Rosenthal, Artesunate for the treatment of severe falciparum malaria, *N. Engl. J. Med.* 358 (2008) 1829-1836.
- [10] N.D.C. Alves, T.C. Santos, C.R. Rodrigues, H.C. Castro, L.M. Lira, C.B. Dornelas, Avaliação da adequação técnica de indústrias de medicamentos fitoterápicos e officinais do Estado do Rio de Janeiro, *Ciênc. Saúde Coletiva* 13 (2008) 745-753.
- [11] V.S. Sierpina, B. Wollschlaeger, M. Blumenthal, Ginkgo biloba, *Am. Fam. Physician.* 68 (2003) 923-926.
- [12] A. Hollman, Plants and cardiac glycosides, *Br. Heart J.* 54 (1985) 258-261.
- [13] F.W. Merkus, E.H.D. Smith, The use of quinine in the treatment of malaria from the past to future, *Int. J. Pharmacy* 2 (1988) 47-50.
- [14] C.M.S. Menezes, K. Kirchgatter, S.M. Di Santi, G. A. Paula, E.I. Ferreira, In vitro evaluation of quinidine sensitivity in brazilian *Plasmodium falciparum* isolates: comparative analysis to quinine and chloroquine, *Rev. Ins. Med. Trop. São Paulo* 43 (2001) 221-226.
- [15] Y.Z. Shu, Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective, *J. Nat. Prod.* 61 (1998) 1053-1071.
- [16] K.G. Zulak, A. Cornish, T.E. Daskalchuk, M.K. Deyholos, D.B. Goodenowe, P.M. Gordon, D. Klassen, L.E. Pelcher, C.W. Sensen, P.J. Facchini, Gene transcript and metabolite profiling of elicitor-induced opium poppy cell cultures reveals the coordinate regulation of primary and secondary metabolism, *Planta* 225 (2007) 1085-1106.
- [17] C.A. Kassuya, D.F. Leite, L.V. Melo, V.L. Rehder, J.B. Calixto, Anti-inflammatory properties of extracts, fractions and lignans isolated from *Phyllanthus amarus*, *Planta Med.* 71 (2005) 721-726.
- [18] C.A. Dinarello, Anti-inflammatory Agents: Present and Future, *Cell* 140 (2010) 935-950.
- [19] O. Akerele, WHO guidelines for the assessment of herbal medicine, *Fitoterapia* 62 (1992) 99-110.
- [20] L.R. Gazzaneo, R.F. de Lucena, U.P. de Albuquerque, Knowledge and use of

- medicinal plants by local specialists in an region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil), *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 1 (2005) 1-8.
- [21] L.B.L. Silva, E.M. Albuquerque, E.L. Araújo, D.P. Santana, Preliminary clinical evaluation of diferent aroeira-da-praia (*Schinus terebinthifolilus* Raddi), *Rev. Bras. Med.* 61(2004) 381-384.
- [22] R.A. Yunes, V. C. Filho, Breve análise histórica da química de plantas medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental, in: R.A. Yunes, J.B. Calixto, *Plantas Mediciniais sob a ótica da Química Medicinal Moderna*, Argus, (Ed.), Chapecó, 2001, pp. 17-44.
- [23] S.J. Correia, J.P. David, J.M. David, Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae, *Quím.Nova* 29 (2006) 1287-1300.
- [24] C.S. Souza, H. Lorenzi, *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*, Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2005.
- [25] A. USDA, National Genetic Resources Program., Germplasm Resources Information Network - (GRIN), National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland, 2011.
- [26] A. Ferriter, *Brazilian Pepper Management Plan for Florida*, 1997. pp 4.
- [27] H. Lorenzi, F.J.A. Matos, *Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas*, Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, 2008.
- [28] M. Pio Corrêa, *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 1926.
- [29] R. Richter, S.H. von Reuss, W.A. König, Spirocyclopropane-type sesquiterpene hydrocarbons from *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Phytochemistry* 71 (2010) 1371-1374.
- [30] H. Lorenzi, *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*, Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, 2002.
- [31] M. Lenzi, A.I. Orth, Caracterização funcional do sistema reprodutivo da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi), em Florianópolis-SC, Brasil, *Rev. Bras. Frutic.* 26 (2004) 198-201.
- [32] L.F. Cesário, M.C. Gaglianone, *Biologia floral e fenologia reprodutiva de Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae) em Restinga do Norte Fluminense*, *Acta Bot. Bras.* 22 (2008) 828-833.
- [33] M.C. Carvalho, F.N. Barca, L.F. Agnez-Lima, S.R. Medeiros, Evaluation of mutagenic activity in an extract of pepper tree stem bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi), *Environ. Mol. Mutagen.* 42 (2003) 185-191.
- [34] L.R. Suzart, *Estudo Químico e Farmacológico de Schinus terebinthifolius Raddi e Contribuição para Validação de Seu Uso como Fitoterápico*, IOC (2002) 3-28.
- [35] M.O. Ribas, M.H. Sousa, J. Sartoretto, T.A. Lanzoni, L. Noronha, L.A. Acra, Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato, *Rev. Odonto Ciênc. (Journal of Dental Science)* 21 (2006) 245-252.
- [36] E. Haslam, Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action, *J. Nat. Prod.* 59 (1996) 205-215.
- [37] A.S.N. Formagio, E.K.K. Iriguchi, L.M. Roveda, M.C. Vieria, C.A.L. Cardoso, N.A.H. Zarate, L.A. Tabaldi, C.A.L. Kassuya, Chemical composition and anti-inflammatory activity of the essential oil of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) fruits, *Latin American Journal of Pharmacy (formerly Acta Farmacéutica Bonaerense)* 30 (2011) 1555-1559.

- [38] M.A. Silva, B.M.S. Pessotti, S.F. Zanini, G.L. Colnago, L.C. Nunes, M.R.A. Rodrigues, L. Ferreira, Uso de óleo de aroeira-vermelha sobre o desempenho e a morfometria intestinal de frangos de corte, *Cienc.Rural* 40 (2010) 2151-2156.
- [39] B.R. Vital, A.C.O. Carneiro, A.S. Pimenta, R. Della Lucia, Adesivos à base de taninos das cascas de duas espécies de eucalipto para produção de chapas de flocos, *Rev. Árvore* 28 (2004) 571-582.
- [40] V.C. Sgarbieri, Proteínas em alimentos protéicos - Propriedades, degradações, modificações, Varela, São Paulo, 1996.
- [41] D.K. Salunkhe, S.J. Jadhav, S.S. Kadam, J.K. Chavan, Chemical, biochemical, and biological significance of polyphenols in cereals and legumes, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 17 (1982) 277-305.
- [42] T.A. Hadi, R. Banerjee, B.C. Bhattacharyya, Optimization of tannase biosynthesis by a newly isolated *Rhizopus oryzae*, *Bioprocess Eng.* 11 (1994) 239-243.
- [43] B. Kar, R. Banerjee, B.C. Bhattacharyya, Microbial production of gallic acid modified solid state fermentation, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23 (1999) 173-177.
- [44] B. Kar, R. Banerjee, Biosynthesis of tannin acyl hydrolase from tannin-rich forest residue under different fermentation conditions., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 25 (2000) 29-38.
- [45] G.A. Macedo, L.K. Matsuda, V. Battestin, Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos, 29 (2005) 833-838.
- [46] P. Grundhofer, R. Niemetz, G. Schilling, G.G. Gross, Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins. *Phytochemistry* 57 (2001) 915-927.
- [47] A.D. Covington, Modern tanning chemistry, *Chem. Soc. Rev.* 26 (1997) 111-126.
- [48] V.U. Borde, P.P. Pangrikar, S.U. Tekale, Gallic Acid in Ayurvedic Herbs and Formulations, *Recent Research in Science and Technology* 3 (2011) 51-54.
- [49] A.E. Fazary, M. Taha, Y.-H. Ju, Iron Complexation Studies of Gallic Acid, *J. Chem. Eng. Data* 54 (2009) 35-42.
- [50] U. Bachrach, Y.C. Wang, Cancer therapy and prevention by green tea: role of ornithine decarboxylase, *Amino Acids* 22 (2002) 1-13.
- [51] B.H. Kroes, A.J. van den Berg, H.C. Quarles van Ufford, H. van Dijk, R.P. Labadie, Anti-inflammatory activity of gallic acid, *Planta Med.* 58 (1992) 499-504.
- [52] I. Kubo, P. Xiao, K. Fujita, Antifungal activity of octyl gallate: structural criteria and mode of action, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11 (2001) 347-350.
- [53] M.T. Huang, R.L. Chang, A.W. Wood, H.L. Newmark, J.M. Sayer, H. Yagi, D.M. Jerina, A.H. Conney, Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by tannic acid, hydroxylated anthraquinones and hydroxylated cinnamic acid derivatives, *Carcinogenesis* 6 (1985) 237-242.
- [54] R.C. Latha, P. Daisy, Insulin-secretagogue, antihyperlipidemic and other protective effects of gallic acid isolated from *Terminalia bellerica* Roxb. in streptozotocin-induced diabetic rats, *Chem. Biol. Interact.* 189 (2011) 112-118.
- [55] S.H. Kim, C.D. Jun, K. Suk, B.J. Choi, H. Lim, S. Park, S.H. Lee, H.Y. Shin, D.K. Kim, T.Y. Shin, Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells, *Toxicol. Sci.* 91 (2006) 123-131.
- [56] B. Trevino-Cueto, M. Luis, J.C. Contreras-Esquivel, R. Rodriguez, A. Aguilera, C.N. Aguilar, Gallic acid and tannase accumulation during fungal solid state culture of a tannin-rich desert plant (*Larrea tridentata* Cov.), *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 721-724.

- [57] K.C. Mondal, S. Samanta, S. Giri, B.R. Pati, Distribution of tannic acid degrading microorganisms in the soil and comparative study of tannase from two fungal strains, *Acta Microbiol. Pol.* 50 (2001) 75-82.
- [58] D. Garcia-Rivera, R. Delgado, N. Bougarne, G. Haegeman, W.V. Berghe, Gallic acid indanone and mangiferin xanthone are strong determinants of immunosuppressive anti-tumour effects of *Mangifera indica* L. bark in MDA-MB231 breast cancer cells, *Cancer Lett.* 305 (2011) 21-31.
- [59] S.C. Cavalher-Machado, E.C. Rosas, A. Brito, A.P. Heringe, R.R. Oliveira, M.A. Kaplan, M.R. Figueiredo, M.G. Henriques, The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy, *Int. Immunopharmacol.* 8 (2008) 1552-1560.
- [60] S.L. Da Silva, S. Char Jda, T. Yano, Chemotherapeutic potential of two gallic acid derivative compounds from leaves of *Casearia sylvestris* Sw (Flacourtiaceae), *Eur. J. Pharmacol.* 608 (2009) 76-83.
- [61] T. Hasegawa, F. Takano, T. Takata, M. Niiyama, T. Ohta, Bioactive monoterpene glycosides conjugated with gallic acid from the leaves of *Eucalyptus globulus*, *Phytochemistry* 69 (2008) 747-753.
- [62] A. Mahadevan, M.K. Reddy, Effect of phenolic compounds on growth, polygalacturonase production, and activity of *Fusarium oxysporum*, *J. Plant Pathol.* 74 (1968) 87-90.
- [63] B.H. Oliveira, Obtenção de Novos Fármacos Através da Biotransformação de Produtos Naturais, Univali, Itajaí, 2007.
- [64] P.C. Lima, L.M. Lima, K.C. da Silva, P.H. Leda, A.L. de Miranda, C.A. Fraga, E.J. Barreiro, Synthesis and analgesic activity of novel N-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole, *Eur. J. Med. Chem.* 35 (2000) 187-203.
- [65] C.D. Duarte, J.L. Tributino, D.I. Lacerda, M.V. Martins, M.S. Alexandre-Moreira, F. Dutra, E.J. Bechara, F.S. De-Paula, M.O. Goulart, J. Ferreira, J.B. Calixto, M.P. Nunes, A.L. Bertho, A.L. Miranda, E.J. Barreiro, C.A. Fraga, Synthesis, pharmacological evaluation and electrochemical studies of novel 6-nitro-3,4-methylenedioxyphenyl-N-acylhydrazone derivatives: Discovery of LASSBio-881, a new ligand of cannabinoid receptors, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 2421-2433.
- [66] J.L. Tributino, C.D. Duarte, R.S. Correa, A.C. Doriguetto, J. Ellena, N.C. Romeiro, N.G. Castro, A.L. Miranda, E.J. Barreiro, C.A. Fraga, Novel 6-methanesulfonamide-3,4-methylenedioxyphenyl-N-acylhydrazones: orally effective anti-inflammatory drug candidates, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 1125-1131.
- [67] H. Gonzalez-Serratos, R. Chang, E.F. Pereira, N.G. Castro, Y. Aracava, P.A. Melo, P.C. Lima, C.A. Fraga, E.J. Barreiro, E.X. Albuquerque, A novel thienylhydrazone, (2-thienylidene)3,4-methylenedioxybenzoylhydrazine, increases inotropism and decreases fatigue of skeletal muscle, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299 (2001) 558-566.
- [68] A.G. Silva, G. Zapata-Sudo, A.E. Kummerle, C.A. Fraga, E.J. Barreiro, R.T. Sudo, Synthesis and vasodilatory activity of new N-acylhydrazone derivatives, designed as LASSBio-294 analogues, *Bioorg. Med. Chem.* 13 (2005) 3431-3437.
- [69] J.M. Figueiredo, C.A. Camara, E.G. Amarante, A.L. Miranda, F.M. Santos, C.R. Rodrigues, C.A. Fraga, E.J. Barreiro, Design and synthesis of novel potent antinociceptive agents: methyl-imidazolyl N-acylhydrazone derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* 8 (2000) 2243-2248.
- [70] L. Jin, J. Chen, B. Song, Z. Chen, S. Yang, Q. Li, D. Hu, R. Xu, Synthesis, structure, and bioactivity of N'-substituted benzylidene-3,4,5-

- trimethoxybenzohydrazide and 3-acetyl-2-substituted phenyl-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2,3-dihydro-1,3,4-oxadiazole derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 5036-5040.
- [71] N. Terzioglu, A. Gursoy, Synthesis and anticancer evaluation of some new hydrazone derivatives of 2,6-dimethylimidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazole-5-carbohydrazide, *Eur. J. Med. Chem.* 38 (2003) 781-786.
- [72] K.H.P. Fernandes, E.S. Mori, M.R.d. Silva, C.S. Pinto, Propagação vegetativa de aroeira-pimenteira (*Schinus terebinthifolius Raddi*), *Rev. Bras. Frutic.* 30 (2008) 853-856.
- [73] M.R. Lima, J. Souza Luna, A.F. Santos, M.C. Andrade, A.E. Sant'Ana, J.P. Genet, B. Marquez, L. Neuville, N. Moreau, Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants, *J. Ethnopharmacol.* 105 (2006) 137-147.
- [74] E.A. Carlini, J.M. Duarte-Almeida, E. Rodrigues, R. Tabach, Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius Raddi* (aroeira-da-praia) and Myracrodruon urundeuva Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão), *Rev. Bras. Farmacogn.* 20 (2010) 140-146.
- [75] S. Johann, M.G. Pizzolatti, C.L. Donnici, M.A. Resende, Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens, *Braz. J. Microbiol.* 38 (2007) 632-637.
- [76] M. Gundidza, N. Gweru, M.L. Magwa, V. Mmbengwa, A. Samie, The chemical composition and biological activities of essential oil from the fresh leaves of *Schinus terebinthifolius* from Zimbabwe, *Afr.J. Biotechnol.* 8 (2009) 7164-7169.
- [77] D.M.N.M. Oliveira, E.P.O. Carieli, A.K.F. Fagundes, R.M.F. Costa, K.P. Oliveira, E.R. Lima, L.B.G. Silva, Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*), em cães com otite externa, *Rev. Bras. Med. Vet.* 26 (2004) 79-82.
- [78] M.L. Castelo Branco Neto, J.M. Ribas Filho, O. Malafaia, M.A. Oliveira Filho, N.G. Czeckzo, S. Aoki, R. Cunha, V.R. Fonseca, H.M. Teixeira, L.R.F. Aguiar, Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos, *Acta Cir. Bras.* 21 (2006) 17-22.
- [79] J.A.T. Nunes Jr., J.M. Ribas-Filho, O. Malafaia, N.G. Czeckzo, C.M. Inácio, A.W. Negrão, P.L.H.d. Lucena, H. Moreira, J. Wagenfuhr Jr., J.J. Cruz, Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius Raddi* (Aroeira) no processo de cicatrização da linea alba de ratos, *Acta Cir. Bras.* 21 (2006) 8-15.
- [80] I.H.I.L.S. Coutinho, O.J.M. Torres, J.E.F. Matias, J.C.U. Coelho, H.J. Stahlke Júnior, M.Â. Agulham, Ê. Bachle, P.A.M. Camargo, S.K. Pimentel, A.C.T. Freitas, Efeito do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*) na cicatrização de anastomoses colônicas: estudo experimental em ratos, *Acta Cir. Bras.* 21 (2006) 49-54.
- [81] H. Bendaoud, M. Romdhane, J.P. Souchard, S. Cazaux, J. Bouajila, Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius Raddi* berries essential oils, *J. Food Sci.* 75 (2010) 466-472.
- [82] A.L. Matsuo, C.R. Figueiredo, D.C. Arruda, F.V. Pereira, J.A. Scutti, M.H. Massaoka, L.R. Travassos, P. Sartorelli, J.H. Lago, α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius Raddi* (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 411 (2011) 449-454.

- [83] R. Medzhitov, Inflammation 2010: new adventures of an old flame, *Cell* 140 (2010) 771-776.
- [84] E.R. Sherwood, T. Toliver-Kinsky, Mechanisms of the inflammatory response, *Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* 18 (2004) 385-405.
- [85] K.L. Rock, H. Kono, The inflammatory response to cell death, *Annu. Rev. Pathol.* 3 (2008) 99-126.
- [86] A. Scott, K.M. Khan, J.L. Cook, V. Duronio, What is "inflammation"? Are we ready to move beyond Celsus?, *Br. J. Sports Med.* 38 (2004) 248-249.
- [87] T.J. Kindt, R.A. Goldsby, B.A. Osborne, *Imunologia de Kuby*, Artmed, Porto Alegre, 2008.
- [88] A.K. Abbas, C.A. Janeway, Jr., Immunology: improving on nature in the twenty-first century, *Cell* 100 (2000) 129-138.
- [89] R.N. Mitchell, V. Kumar, A.K. Abbas, N. Fausto, *Robbins & Cotran-Fundamentos de Patologia*, Elsevier, Rio de Janeiro, 2006.
- [90] V. Kumar, A.K. Abbas, N. Fausto, J.C. Aster, *Robins e Cotran, bases patológicas das doenças*, Elsevier, Rio de Janeiro, 2010.
- [91] H. Ulbrich, E.E. Eriksson, L. Lindbom, Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease, *Trends Pharmacol. Sci.* 24 (2003) 640-647.
- [92] K. Yonekawa, J.M. Harlan, Targeting leukocyte integrins in human diseases, *J. Leukoc. Biol.* 77 (2005) 129-140.
- [93] J.C.T. Brenol, R.M. Xavier, J. Marasca, Antiinflatórios não hormonais convencionais, *Rev. Bras. Med.* 57 (2000) 33-40.
- [94] G. Bellingan, Leukocytes: friend or foe, *Intensive Care Med.* 26 Suppl 1 (2000) 111-118.
- [95] J. Fan, TLR Cross-Talk Mechanism of Hemorrhagic Shock-Primed Pulmonary Neutrophil Infiltration, *Open Crit. Care Med. J.* 2 (2010) 1-8.
- [96] H.F. Langer, T. Chavakis, Leukocyte-endothelial interactions in inflammation, *J. Cell. Mol. Med.* 13 (2009) 1211-1220.
- [97] K. Raymond, M.M. Faraldo, M.A. Deugnier, M.A. Glukhova, Integrins in mammary development, *Semin. Cell Dev. Biol.* (2012) 1-7.
- [98] J.P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S.L. Goodman, M.A. Arnaout, Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand, *Science* 296 (2002) 151-155.
- [99] E.S. Welf, U.P. Naik, B.A. Ogunnaike, Probabilistic modeling and analysis of the effects of extra-cellular matrix density on the sizes, shapes, and locations of integrin clusters in adherent cells, *BMC Biophys.* 4 (2011) 2-13.
- [100] B. Petri, M.G. Bixel, Molecular events during leukocyte diapedesis, *FEBS J.* 273 (2006) 4399-4407.
- [101] R. Medzhitov, Origin and physiological roles of inflammation, *Nature* 454 (2008) 428-435.
- [102] A.C. Sampaio, *Processo inflamatório*, Patologia, Rideel, São Paulo, 2011.
- [103] H.M. Paterson, T.J. Murphy, E.J. Purcell, O. Shelley, S.J. Kriynovich, E. Lien, J.A. Mannick, J.A. Lederer, Injury primes the innate immune system for enhanced Toll-like receptor reactivity, *J. Immunol.* 171 (2003) 1473-1483.
- [104] C.N. Serhan, Controlling the resolution of acute inflammation: a new genus of dual anti-inflammatory and proresolving mediators, *J. Periodontol.* 79 (2008) 1520-1526.
- [105] C. Nathan, A. Ding, Nonresolving inflammation, *Cell* 140 (2010) 871-882.

- [106] J. Rogers, The inflammatory response in Alzheimer's disease, *J. Periodontol.* 79 (2008) 1535-1543.
- [107] D.W. Gilroy, T. Lawrence, M. Perretti, A.G. Rossi, Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery, *Nat. Rev. Drug. Discov.* 3 (2004) 401-416.
- [108] P.R. Criado, R.F.J. Criado, C.W. Maruta, C.A. Machado Filho, Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: novos conceitos, *Anais Brasileiros de Dermatologia* 85 (2010) 195-210.
- [109] M. Jutel, T. Watanabe, M. Akdis, K. Blaser, C.A. Akdis, Immune regulation by histamine, *Curr. Opin. Immunol.* 14 (2002) 735-740.
- [110] C.A. Akdis, F.E. Simons, Histamine receptors are hot in immunopharmacology, *Eur. J. Pharmacol.* 533 (2006) 69-76.
- [111] M. Berger, J.A. Gray, B.L. Roth, The expanded biology of serotonin, *Annu Rev. Med.* 60 (2009) 355-366.
- [112] D.E. Nichols, C.D. Nichols, Serotonin receptors, *Chem. Rev.* 108 (2008) 1614-1641.
- [113] B.L. Roth, T. Nakaki, D.M. Chuang, E. Costa, 5-Hydroxytryptamine₂ receptors coupled to phospholipase C in rat aorta: modulation of phosphoinositide turnover by phorbol ester, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238 (1986) 480-485.
- [114] G.B. Ryan, G. Majno, Acute inflammation. A review, *Am. J. Pathol.* 86 (1977) 183-276.
- [115] M.O.E. Hilário, M.T. Terreri, C.A. Len, Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2, *J. Pediatr.* 82 (2006) 206-212.
- [116] B.G. Katzung, *Farmacologia básica e clínica*, 10 ed., AMGH, Porto Alegre, 2010.
- [117] S. Yedgar, M. Krinsky, Y. Cohen, R.J. Flower, Treatment of inflammatory diseases by selective eicosanoid inhibition: a double-edged sword?, *Trends Pharmacol. Sci.* 28 (2007) 459-464.
- [118] V.J. Hammond, V.B. O'Donnell, Esterified eicosanoids: Generation, characterization and function, *Biochim. Biophys. Acta* (2011).
- [119] J.R. Vane, Y.S. Bakhle, R.M. Botting, Cyclooxygenases 1 and 2, *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38 (1998) 97-120.
- [120] I. St-Louis, M. Singh, K. Bresseur, V. Leblanc, S. Parent, E. Asselin, Expression of COX-1 and COX-2 in the endometrium of cyclic, pregnant and in a model of pseudopregnant rats and their regulation by sex steroids, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8 (2010) 1-12.
- [121] J. Munoz, C. Navarro, V. Noriega, G. Pinará, F. Sierralta, J.C. Prieto, H.F. Miranda, Synergism between COX-3 inhibitors in two animal models of pain, *Inflammopharmacology* 18 (2010) 65-71.
- [122] M.G. Papich, An update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Small Animals, *Veterinary Clinicians Small Animal Practice*, 38 (2008) 1243-1266.
- [123] C.D. Funk, Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology, *Science* 294 (2001) 1871-1875.
- [124] J. Bertin, C. Barat, S. Methot, M.J. Tremblay, Interactions between prostaglandins, leukotrienes and HIV-1: possible implications for the central nervous system, *Retrovirology* 9 (2012) 1-14.
- [125] R.M. Botting, Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927–2004), *Journal of Thermal Biology* 31 (2006) 208-219.
- [126] E.C.A. Monteiro, J.M.F. Trindade, A.L.B.P. Duarte, W.H. Chahade, Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), *Temas de Reumatologia Clínica* 9 (2008) 53-63.

- [127] M. Romano, I. Recchia, A. Recchiuti, Lipoxin receptors, *Scientific World Journal* 7 (2007) 1393-1412.
- [128] L.J. Macdonald, S.C. Boddy, F.C. Denison, K.J. Sales, H.N. Jabbour, A role for lipoxin A as an anti-inflammatory mediator in the human endometrium, *Reproduction* 142 (2011) 345-352.
- [129] U. Jaffer, R.G. Wade, T. Gourlay, Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review, *HSR Proceedings in Intensive Care and Cardiovascular Anesthesia* 2 (2010) 161-175.
- [130] C. Basset, J. Holton, R. O'Mahony, I. Roitt, Innate immunity and pathogen-host interaction, *Vaccine* 21 Suppl. 2 (2003) S12-23.
- [131] P. Sheeran, G.M. Hall, Cytokines in anaesthesia, *Br J Anaesth* 78 (1997) 201-219.
- [132] J.E. Sims, D.E. Smith, The IL-1 family: regulators of immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010) 89-102.
- [133] M. Akdis, S. Burgler, R. Cramer, T. Eiwegger, H. Fujita, E. Gomez, S. Klunker, N. Meyer, L. O'Mahony, O. Palomares, C. Rhyner, N. Ouaked, A. Schaffartzik, W. Van De Veen, S. Zeller, M. Zimmermann, C.A. Akdis, Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases, *J. Allergy Clin. Immunol.* 127 (2011) 701-721.
- [134] R. Kleemann, S. Zadelaar, T. Kooistra, Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice, *Cardiovasc. Res.* 79 (2008) 360-376.
- [135] M.A. Palladino, F.R. Bahjat, E.A. Theodorakis, L.L. Moldawer, Anti-TNF-alpha therapies: the next generation, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2 (2003) 736-746.
- [136] R.F. Vitale, F.A.Q. Ribeiro, O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média, *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 73 (2007) 123-127.
- [137] I.F. Charo, R.M. Ransohoff, The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation, *N. Engl. J. Med.* 354 (2006) 610-621.
- [138] R.M. Gonçalves, A.L. Teixeira, W.R. Campos, F. Oréfice, O papel das quimiocinas nas uveítes, *Arq. Bras. Oftalmol.* 70 (2007) 363-370.
- [139] A. Zlotnik, O. Yoshie, Chemokines: a new classification system and their role in immunity, *Immunity.* 12 (2000) 121-127.
- [140] S.J. Allen, S.E. Crown, T.M. Handel, Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism, *Annu. Rev. Immunol.* 25 (2007) 787-820.
- [141] R.N. Dubois, S.B. Abramson, L. Crofford, R.A. Gupta, L.S. Simon, L.B. Van De Putte, P.E. Lipsky, Cyclooxygenase in biology and disease, *FASEB J.* 12 (1998) 1063-1073.
- [142] H.P. Rang, M.M. Dale, J.M. Ritter, R.J. Flower, *Rang & Dale Farmacologia*, Elsevier, Rio de Janeiro, 2007.
- [143] J.O. Oliveira Júnior, S.C. Serrano, A.L. Teodoro, B.A. Dana, Os antiinflamatórios não hormonais, *Prática Hospitalar* 9 (2007) 173-178.
- [144] J. Gosepath, J. Brieger, E. Gletsou, W.J. Mann, Expression and localization of cyclooxygenases (Cox-1 and Cox-2) in nasal respiratory mucosa. Does Cox-2 play a key role in the immunology of nasal polyps?, *J Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 14 (2004) 114-118.
- [145] W.H. Chahade, R.D.N. Giorgi, J.C.M. Szajubok, Antiinflamatórios não hormonais, *einstein* 6 (2008) 166-174.
- [146] C.N. Serhan, S.D. Brain, C.D. Buckley, D.W. Gilroy, C. Haslett, L.A. O'Neill, M. Perretti, A.G. Rossi, J.L. Wallace, Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms, *FASEB J.* 21 (2007) 325-332.

- [147] J.A. Mitchell, T.D. Warner, COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 75-86.
- [148] G.A. FitzGerald, C. Patrono, The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2, *N. Engl. J. Med.* 345 (2001) 433-442.
- [149] I.R. Garcia Jr, C. Gaujac, W.C. Gealh, O. Magro-Filho, E. Ochuli-Vieira, Uso dos inibidores seletivos da COX-2 na odontologia, *Rev. Odontol. UNESP* 34 (2005) 167-171.
- [150] A. Rauch, V. Gossye, D. Bracke, E. Gevaert, P. Jacques, K. Van Beneden, B. Vandooren, M. Rauner, L.C. Hofbauer, G. Haegeman, D. Elewaut, J.P. Tuckermann, K. De Bosscher, An anti-inflammatory selective glucocorticoid receptor modulator preserves osteoblast differentiation, *FASEB J.* 25 (2011) 1323-1332.
- [151] S.M.A. Anti, R.D.N. Giorgi, W.H. Chahade, Antiinflamatórios hormonais: Glicocorticóides, *einstein* 6 (2008) 159-165.
- [152] A.M. Fernandes, F.C.P. Valera, W.T. Anselmo-Lima, Mecanismos de ação dos corticosteróides na polipose rinossinusal, *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 74 (2008) 279-283.
- [153] H. Schacke, A. Schottelius, W.D. Docke, P. Strehlke, S. Jaroch, N. Schmees, H. Rehwinkel, H. Hennekes, K. Asadullah, Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 227-232.
- [154] I.H. Song, R. Gold, R.H. Straub, G.R. Burmester, F. Buttgerit, New Glucocorticoids on the Horizon: Repress, Don't Activate!, *J. Rheumatol.* 32 (2005) 1199-1207.
- [155] C. Stahn, M. Lowenberg, D.W. Hommes, F. Buttgerit, Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists, *Mol. Cell. Endocrinol.* 275 (2007) 71-78.
- [156] H.J.C. Neto, C.S. Rosário, N.A. Rosário, Corticosteroides intranasais, *Rev. bras. Alerg. Imunopatol.* 33 (2010) 51-57.

5 ANEXOS

5.1 Anexo1 - Artigo científico

O artigo científico segue as normas do periódico internacional, que será submetido.

Chemico-Biological Interactions

Title: Analysis of responses of 3,4,5-trihydroxyphenyl derivatives bearing a substituted carbonyl moiety experimental inflammation in mice

Edna Kiyomi Kassuya Iriguchi^a, Anelise Samara Nazari Formagio^b, Luiz Augusto
Cauz dos Santos^b, Maria do Carmo Vieira^b, Candida Aparecida Leite Kassuya^a

^a *Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados,
MS, Brazil*

^b *Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados,
MS, Brazil*

**Corresponding author: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 79825-070, MS, Brazil, Phone: +55 67 3410-2326, Fax: +55 67 3410-2326. E-mail address: candida2005@gmail.com*

ABSTRACT

Inflammation is response induced by noxious stimuli, with the main objective to provide maintenance of homeostasis and repairs the tissue injury. The methyl gallate is an important component found in several medicinal plants especially in *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) a plant popularly used against inflammatory diseases. In the present study, we used mice (n=5/group) to assess the anti-inflammatory effect of methanolic extract (MEST) and methyl gallate (compound 2) obtained from *S. terebinthifolius*. A series of 3,4,5-trihydroxyphenyl derivatives bearing a substituted carbonyl moiety were synthesized and chemically identified as radical carbonyl or 3,4,5-trihydroxyphenyl-carbonyl (compound 2), 3,4,5-trihydroxyphenyl-N'-(4-methoxybenzylidene)-1-carbonyl (compound 4), 3,4,5-tri-hydroxyphenyl-N'-(4-N-dimethylaminobenzylidene)-1-carbonyl (compound 5), 3,4,5-tri-hydroxyphenyl-N'-(4-nitrobenzylidene)-carbonyl (compound 6), 3,4,5-tri-hydroxyphenyl-N'-(benzylidene)-carbonyl (compound 7) were evaluated for their anti-inflammatory activity. The oral administration of MEST (100 and 300 mg/kg), compound 2 (100 and 300 mg/kg), compound 3, 4, 5 and 6 (100 mg/kg), but not compound 7 (100 mg/kg), inhibited significantly the carrageenan-induced oedema in mice paw. Therefore, only compound 4 (100 mg/kg), reduced the carrageenan-increased of myeloperoxidase activity. When local application occur, compound 2 (10-100 µg/paw), 4, 5, and 6 (all at 10 µg/paw) inhibited the carrageenan-induced oedema and 3, 4, and 6 (10 µg/paw) decrease the MPO activity. To investigate if methyl gallate derivatives induced anti-inflammatory effects in another model of experimental inflammation, compound 3 and 4 were tested in pleurisy model inducing inhibition of inflammatory parameters like

leukocyte migration and protein extravazation. The experimental observations from anti-inflammatory activities of *S. terebinthifolius* extracts and methyl gallate have been guiding for the development of new methyl gallate derivatives that possess marcant anti-inflammatory activities.

Key-words: *Schinus terebinthifolius*, Anacardiaceae, mice, inflammation, methyl gallate, carbohydrazide

1. Introduction

The Inflammatory process is essential complex response that maintain the homeostasis after noxious condition such as infection or injury [1]. However, when excessive and uncontrolled, inflammation can lead to necrosis, physiologic unbalance, fibrosis [2], and chronic diseases. An example is the development of rheumatoid arthritis that maybe occur when inflammation is inappropriately directed against self tissues or is not adequately controlled [3].

The conventional anti-inflammatory therapy control the cardinal signs of inflammation in some diseases [4]. The four cardinal signs of inflammation such as swelling, rubor, heat, pain were described by Celsus and Virchow included a fifth cardinal sign for this process and loss of function [5].

Studies of natural products contributed to development of the spectroscopic approaches to structure elucidation, and synthetic methodologies that now constitute the foundation of organic chemistry. Recognition of the biological

properties of natural products has fueled the current focus of this field, namely, the search for new drugs, antibiotics and others [6].

Schinus terebinthifolius Raddi is an evergreen shrub or tree of the Anacardiaceae, native to South and Central America [7]. It is known as “aroeira-vermelha” and “aroeira pimenteira” [8]. In folk medicine, it has been used as a remedy for ulcers, respiratory problems, wounds, rheumatism, gout, tumors, diarrhea, skin ailments, arthritis [9] and used for the treatment of inflammation [10]. Some works have revealed through phytochemical analysis that gallic acid, methyl gallate (1,2,3,4,6-pentagalloylglucose) are the major components of the extracts from *Schinus* genus and some studies were made to shown that this components are important to medicinal activity by plants from this genus [11-12].

The research into plants with ethnopharmacological use as anti-inflammatory drugs, should be a strategy to development for new anti-inflammatory drugs [13] because the traditional anti-inflammatory drugs (NSAIDs) as well as glucocorticoid could lead adverse effects. Examples are that selective COX-2 inhibitors that increase the incidence of thrombotic adverse cardiovascular effect [14]. There is an urgent need to find safer and more effective drug treatments [15].

In the present study, we sought to investigate, by the use of inflammation procedures the ability extract of *S. terebinthifolius* Raddi as well as the isolated natural compound methyl gallate involvement in paw edema and pleurisy in experimental models of inflammation. We also synthesized and evaluated the anti-inflammatory activity of the series of 3,4,5-trihydroxyphenyl derivatives bearing a substituted carbonyl moiety (3-7). Attempts have been made to further investigate if some of methyl gallate synthesized by our group exhibit also anti-inflammatory actions.

2 Materials and methods

2.1. Plant material

Schinus terebinthifolius leaves were collected in Dourados-MS, in August, 2009, and identified by Dr. Zefa Valdevina Pereira of the UFGD. A voucher specimen (DDMS 4600) was deposited in the herbarium of the UFGD, MS, Brazil.

2.1.1. Preparation of the methanolic extract (MEST) and purification of methyl gallate

Dried leaves (23 g) were extracted successively with methanol at room temperature. After filtration, the filtrate was concentrated under reduced pressure at 45 °C and lyophilized to give a solid material (8 g). Part of the methanolic extract (5 g) was dissolved in methanol: water (1:1) and partitioned with hexane, CHCl₃ and ethyl acetate. The solvent was evaporated to dryness under vacuum to give the ethyl acetate fraction (EAF 2.8 g). The EAF (1.6 g) was purified on Sephadex LH-20 (25 g) using H₂O, H₂O-MeOH (1:3, 1:1) and MeOH, affording methyl gallate (15.4 mg). ¹HNMR (300 MHz, CD₃OD): 7.02 (s, 2H), 3.84 (s, 3H). ¹³CNMR (75 MHz, CD₃OD): 52.2 (OCH₃), 122,0 (C), 110.4 (2CH), 146.5 (2C), 139,7 (C), 170.6 (C=O).

2.1.2. General

^1H and ^{13}C spectra were recorded in a Varian spectrometer model Mercury plus BB at 300 MHz and 75 MHz, respectively. For TLC, Merck precoated plates (silica gel 60 G254) were used. All reagents were purchased from commercial suppliers: 4-methoxybenzaldehyde (Sigma-Aldrich, 98%), , 4-dimethylaminobenzaldehyde (Merck, 98,5%), , benzaldehyde (Acros Organic, 99%), 4-nitrobenzaldehyde (Acros Organic, 99%), hydrazine hydrate (Aldrich, 80%), ethanol (Synth, Nuclear), sulfuric acid (Dinâmica 95-98%), sodium bicarbonate (Synth 99,5%), methanol (Nuclear), ethyl acetate (Synth, Nuclear), n-hexane (Nuclear), CHCl_3 (Nuclear), gallic acid (Sigma-Aldrich, 98%).

2.2. Synthesis

2.2.1. General procedure for preparation of carbohydrazine (3)

To a solution of 2.97mmol of methyl gallate (2), previously prepared by reaction esterification of the gallic acid (1), in 30 mL of ethanol, was added 1.8 ml (48.2 mmol) of 80% hydrazine hydrate. This mixture was refluxed for 60 h, when TLC analysis indicated the end of the reaction. Then, the media were poured on ice and the resulting precipitate was filtered out, affording the corresponding carbohydrazine (3). ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): 6.82 (s, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD): 121.5 (C), 110.1 (2CH), 146.7 (2C), 153.4 (C), 162.4 (C=O).

2.2.2. General procedure for preparation of carbohydrazides (4-7)

A solution of derivatives 3 (1 mmol) in water (10 mL) containing two drops of concentrated sulfuric acid was refluxed for 30 min, until complete dissolution. Then, a solution of aromatic aldehyde (1 mmol) in ethanol (3 mL) was added. The resulting solution was refluxed for 48 h. The mixture was poured into cold water and neutralized with 10% aqueous sodium bicarbonate solution and the precipitate formed was filtered of buchner, crystallized from methanol and dried, furnishing the title compounds **4-7** with 74-80% yield.

2.2.2.1. *3,4,5-trihydroxyfenyl-N'-(4-methoxybenzylidene)-1-carbohydrazide* (4)

Yield: 75%; ¹HNMR (300 MHz, CD₃OD): 3.87 (3H, s, OCH₃), 7.00 (2H, s), 7.70 (2H, d, J= 8.7 Hz), 7.80 (2H, d, J= 8.7 Hz), 8.58 (1H, s, N'=CH). ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): 55.6, 115.2, 115.4, 125.9, 127.6, 131.2, 140.7, 145.9, 149.3, 162.3, 163.6.

2.2.2.2. *3,4,5-tri-hydroxyfenyl-N'-(4-N-dimethylaminobenzylidene)-1-carbohydrazide* (5)

Yield: 75%; ¹HNMR (300 MHz, CD₃OD): 3.03 (s, 6H), 6.93 (2H, d, J= 8.7 Hz), 7.68 (2H, s), 7.78 (2H, d, J =8.7 Hz), 8.36 (1H, s, N'=CH), ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): 40.3, 111.9, 114.1, 125.9, 129.8, 130.4, 141.4, 146.2, 149.4, 161.2, 162.6.

2.2.2.3. *3,4,5-tri-hydroxyfenyl-N'-(4-nitrobenzylidene)-carbohydrazide* (6)

Yield: 87%; ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): 7.34 (2H, d, J=7.5 Hz), 7.66 (2H, d, J =7.5 Hz), 7.70 (2H, s), 8.10 (1H, s, N'=CH). ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): 114.8, 125.4, 123.8, 128.2, 130.1, 139.5, 145.5, 146.2, 150.3, 161.2.

2.2.2.4. 3,4,5-tri-hydroxyfenyl-N'-(benzylidene)-carbohydrazide (7)

Yield: 75%; ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): 7.40 (3H, m), 7.88 (2H, d, J =7.0 Hz), 7.86 (2H,s), 8.65 (1H, s, N=CH). ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): 115.4, 126.3, 128.7, 128.8, 131.0, 133.9, 140.4, 145.2, 148.7, 162.5.

2.3. Animals

The experiments were conducted using male and female *Swiss* mice (25-35 g) provided from Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). The animals were maintained under a 12 h light-dark cycle, with controlled humidity (60 - 80 %), and temperature (22 ± 1°C). The animals were acclimatized to the experimentation room for at least 2 h before testing and were used only once throughout the experiments (n = 5/group). All experimental procedures were carried out in accordance with U.S. National Institute of Health, and were approved by the ethics committee for research on laboratory animal of the UFGD (Nbr. 005/2010).

2.4. Material and reagents

λ -Carrageenan (Cg), Tween 80 and dexamethasone were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.5. Carrageenan-induced paw oedema

Different groups of mice were orally treated with MEST (100 and 300 mg/kg), methyl gallate (100 and 300 mg/kg) and novel 3,4,5-trihydroxyphenyl derivatives bearing a substituted carbohydrazyde group at C-1 (3-7) (100 mg/kg) or vehicle.

In a separate experimental group, mice were treated intraplantar injection methyl gallate (10 and 100 μ g/paw) and derivates (3-7) (10 μ g/paw) or vehicle. Another group of mice were treated subcutaneously with the anti-inflammatory drug dexamethasone (1 mg/kg). After 1 h, the animals received a 50 μ L s.c. injection into the right hindpaw of carrageenan (300 μ g/paw) suspended in sterile 0.9% saline. The contralateral paw received only saline and was used as control.

The thickness of the paw oedema was measured using a digital micrometer (DIGIMESS 110-284) 1h before any treatment and at different time points (0.5, 1, 2, 4 and 24 h) after the injection of carrageenan. Results were expressed in μ m and the difference between basal and post-injection values quantified as oedema [16].

2.6. Determination of myeloperoxidase (MPO) activity

To investigate whether oral treatment with extract, methyl gallate and compounds (3-7) and treated intraplantar injection methyl gallate (10 and 100

$\mu\text{g/paw}$) and compounds (3-7) ($10 \mu\text{g/paw}$) or vehicle could affect the cellular migration induced by carrageenan the myeloperoxidase activity was measured into the mouse paw. Animals were euthanized 6 h after carrageenan injection, the described before [17]. For MPO activity, the tissue was homogenized in 5% (w/v) of 80 mM phosphate buffer, pH 5.4, containing 0.5% of hexadecyltrimethylammonium bromide. The homogenate was centrifuged at 3200 rpm and 4°C for 20 min. Aliquots ($30 \mu\text{L}$) of each supernatant were mixed with $100 \mu\text{L}$ of phosphate buffer 80 mM, $85 \mu\text{L}$ of phosphate buffer 0.22 M and $15 \mu\text{L}$ of 0.017% H_2O_2 on a 96-well plate. The reaction was triggered with $20 \mu\text{L}$ of 3,3,3-tetramethylbenzidine (dissolved in N,N-dimethylformamide). The plate was kept at 37°C for 3 min, after which the reaction was stopped by adding $30 \mu\text{L}$ of sodium acetate 1.46 M, pH 3.0. The enzymatic activity was determined by measuring the optical density at 630 nm and was expressed as mOD per mg of protein.

2.7. Pleural cell migration and protein exudation

Different groups of animals treated with compounds (3) and (4) (10 mg/kg , i.p.) or dexamethasone (1.0 mg/kg , subcutaneously, positive control), vehicle, and naïve (0.9%—negative control) were administered orally by gavage, in different groups of mice. Pleurisy was induced by the intrathoracic injection of $100 \mu\text{L}$ of 1% carrageenan as previously described [18]. The carrageenan was diluted in saline buffered. Briefly, an adapted needle was inserted into the right side of the thoracic cavity of the animals to enable intrathoracic (i.t.) administration of carrageenan. Control mice received an equal volume ($100 \mu\text{L}$) of sterile, pyrogenfree saline. After 4 h, the animals were killed and the thoracic cavity was washed with 1mL of

phosphate-buffered saline (PBS). The exudate volume was measured, and an aliquot of 20 μ L was diluted in Turk solution (1:20) and used to determine the total number of leukocytes in a Neubauer chamber. For differential counting of leukocytes, the remaining fluid was centrifuged at 3200 rpm for 20 min, and the cells were resuspended. The protein exudation was evaluated directly from the lavage by Bradford's reaction, using the commercially available Bradford kit (Bioagency, São Paulo, Brazil). Total and differential cell counts were performed under light microscopy and the results are reported as the number of cells per ml of pleural fluid.

2.8. Statistical analysis

All data are presented as mean \pm S.E.M. Difference between groups was evaluated by analyses of variance (one-way ANOVA) followed by Student Newman-Keuls test. The number of animals per group is indicated in the legends. Statistical differences were considered to be significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Obtention of new carbohydrazides derivatives

The synthetic route for the preparation of carbohydrazides derivatives is presented in **Scheme 1**. The methyl gallate (**2**) were prepared by reaction esterification of the corresponding carboxylic acid (**1**) with methanol and sulfuric acid [19]. Reaction of methyl gallate with hydrazine hydrate afforded the carbohydrazil (**3**). Condensation of **3** with aromatic aldehydes 4-methoxybenzaldehyde, 4-

dimethylaminobenzaldehyde, 4-nitrobenzaldehyde and benzaldehyde, under reflux in ethanol yielded the carbohydrazides (**4-7**) [20] according to the procedures described in literature for similar compounds.

All novel compounds and isolated compound were characterized by their spectral data (^1H and ^{13}C NMR). The ^1H NMR spectra of carbohydrazides 4-7 showed signals at δ_{H} 8.40 integrating for one proton, and at δ_{H} 6.70–9.00, corresponding to the imine and aromatic hydrogens, respectively, of the (substituted-benzylidene) carbohydrazide group. The presence of this group was confirmed by the signals at δ_{C} 147–150 (C=N), 158–162 (C=O), and δ_{C} 110–135 (aromatic carbons of R group) in the ^{13}C NMR spectra.

3.2. Effects of oral MEST on carrageenan-induced paw oedema and increase in MPO activity

The injection of carrageenan in the paw induced an oedema that started at 30 min and peaked at 2 h (Fig. 1A). The oral treatment with MEST (100 and 300 mg/kg) significantly inhibited oedema formation. The inhibitions were of $33 \pm 9\%$ and $34 \pm 6\%$ at doses of 100 and 300 mg/kg, respectively (Fig., 1A and B). Moreover, our results showed that the MEST at dose of 300 mg/kg, presented its significant inhibition 2 h after its administration as indicated by the time course analysis (Fig.1A). In addition, the inhibition observed in dexamethasone-treated group was $41 \pm 5\%$ after 2 h of the injection of carrageenan in the paw (Fig.1A).

The injection of carrageenan (300 $\mu\text{g/paw}$) not increase MPO activity after 6 hours, therefore the oral treatment with MEST (100 and 300 mg/kg) did not alter the increasing of MPO activity induced by carrageenan. The positive control

(Dexametasone) was able to induce inhibitory activity in MPO analysis when compared to control group (Fig.1C).

3.3. Effect of oral and intraplantar administration methyl gallate on carrageenan-induced paw oedema and increase in MPO activity

In carrageenan-induced paw oedema experiment, the oral administration of methyl gallate (100 and 300 mg/kg) showed inhibitory properties in oedema formation. The inhibitions were of $43 \pm 9\%$ and $58 \pm 5\%$ at doses of 100 and 300 mg/kg, respectively (Fig. 2A). Dexamethasone inhibited oedema formation ($51 \pm 4\%$) at 2h after inflammatory stimulus (Fig. 2A). Animals treated with intraplantar injection methyl gallate (10 and 100 $\mu\text{g/paw}$), the inhibition were of $34 \pm 2\%$ and $39 \pm 8\%$, respectively (Fig. 2C). The injection of Cg (300 $\mu\text{g/paw}$) did not increase MPO activity oral treated with methyl gallate (100 and 300 mg/kg) and treated with intraplantar methyl gallate (10 and 100 $\mu\text{g/paw}$) compared with the paws of the animals treated control group (Fig. 2B and 2D).

3.4. Effects of oral administration carbohydrazydes compounds (3-7) on carrageenan-induced paw oedema and increase in MPO activity

The oral treatment of the animals with compounds (3-6) significantly inhibited the oedema formation in about $67 \pm 6\%$, $63 \pm 9\%$, $61 \pm 3\%$ and $47 \pm 10\%$, respectively for dose of 100 mg/kg (**3**, **4**, **5** and **6**). The injection of Cg (300 $\mu\text{g/paw}$) increased the MPO activity compared with the paws of animals treated

only with saline (Fig. 3B). The compound **4**, but not **3**, **5** and **6**, was able to inhibit significantly $33 \pm 4\%$ the MPO activity with dose of 100 mg/kg (Fig. 3B).

The oral administration of compound **7** did not interfere with oedema nor with MPO activity induced by carrageenan (results not shown).

3.5. Effects of intraplantar administration compounds carbohydrazides (3-7) on carrageenan-induced paw oedema and increase in MPO activity

The local treatment with compounds (**3-7**), specially **4**, **5** and **6** (but not **7**) were also capable of reducing the oedema induced by carrageenan. The inhibition were of $58 \pm 5\%$, $34 \pm 5\%$ and $31 \pm 5\%$ at doses of 10 $\mu\text{g/paw}$, respectively (Fig.4A). The **3**, **4** and **6** was able to inhibit significantly ($62 \pm 5\%$, $37 \pm 5\%$ and $45 \pm 4\%$) the MPO activity with dose 10 $\mu\text{g/paw}$ (Fig. 4B).

The intraplantar administration of **7** did not interfere with oedema or with MPO activity induced by carrageenan (results not shown).

3.6. Effects of compounds carbohydrazides (3-4) on carrageenan-induced pleural cell migration and protein exudation

The compounds **3** and **4** showed marcant efficacy in mouse paw oedema, then It was decided to test only this two compounds in the pleurisy model.

The results were expressed as leukocytes $\times 10^7$ and plasma leakage in mg of proteins/mL (Fig. 5). Administration of carrageenan to the pleural cavity of the animals induced an increase in total leukocyte numbers (Fig. 5A), and an increase in protein extravasation (Fig. 5B) 4 h after injection. Compounds **3** and **4**, given by i.p. route, significantly reduced the increase in total leukocytes (inhibition of $50 \pm$

5% and $73 \pm 9\%$, respectively) and also reduced the rise in protein levels (inhibition of 100% and $82 \pm 9\%$ respectively) induced by carrageenan in the pleural cavity (Fig. 5B). The subcutaneous administration of the dexamethasone (1.0 mg/kg, s.c.) 1 h before Cg also reduced the increase in total leukocytes (inhibition of $83 \pm 10\%$), and protein levels (100%) induced by carrageenan in the pleural cavity.

4. Discussion

In this present study, we demonstrate that extract and the methyl gallate obtained from *Schinus terebinthifolius* Raddi a plant popularly used against inflammatory diseases in several countries, including Brazil, were able to reduce the inflammation in mice, after oral administration. Furthermore, the anti-inflammatory effect of the crude extract could be associated with high levels of methyl gallate, and also found in other plants, the family Aceraceae such as , *Acer rubrum* L, *Acer saccharinum* L, *Acer saccharum* Marsh [21], and also found in other plants, such as *Paeonia lactiflora* [22], *Cercis chinensis* [23], *Toona sinensis* [24] and *Caesalpinia ferrea* MART [25].

There has been considerable interest in the development of novel compounds with anti-inflammatory activities. A chemical investigation of interactions between organisms has led to the isolation and identification of biologically active principles. Some of the biologically active natural products have served as leads to the discovery and development of commercialized medicaments.

The anti-inflammatory activity of *S. terebinthifolius* and methyl gallate were evaluated in carrageenan induced inflammation in mice paw, but the efficacy of two products were only limited in inhibiting oedema formation. Previous studies from others researches showed that extracts from *S. terebinthifolius* exhibit antibacterial and antifungal activity [26-28]; anticancer activity [29]; antiulcer activity [30]; wound healing properties [31-33]; antioxidant properties [34] . Methyl gallate obtained from *Lithrea molleoides* (Vell.) Engl. (from the same family of *S. terebinthifolius*) showed an anti-inflammatory activity in carrageenan-induced paw edema and in TPA-induced ear edema corroborating with our results [35]. Researchers have shown that the constituent from ethyl fraction obtained from *S. terebinthifolius* may be responsible by inhibition of 80% of the histamine-induced oedema probably was methyl gallate. In the same study it was tested the methyl gallate at concentration of 100 µg/mL in rat peritoneal cells *in vitro* inhibited the inflammatory activity of C48/80 compound [12]. Another studies showed that the ability of extract of *S. terebinthifolius* in inhibiting fosfolipase A_2 in pig pancreas could be associated by the presence of tripernes in this specie [36]. Previous results from our group have showed that the oral administration of essential oil from fruits of *S. terebinthifolius* (100-200 mg/kg) inhibited carrageenan-induced oedema in rats, inflammatory parameter in air pouch models, and CFA-induced inflammation [37]. Preparations obtained from *S. terebinthifolius* are continuously self-administered as a phytomedicine, an example is the Brazilian phytotherapeutic Kronel® (Hebron industries) used as antibacterial, anti-inflammatory, wound healing agents against gynecologic infections. Nevertheless, the anti-inflammatory effects of extract of *S. terebinthifolius* have never been described. Thus, this is the first study showing that oral extract of *S. terebinthifolius* administration and also

oral or topical administration of methyl gallate reduces the oedema induced by local inflammation in mice, suggesting that this phenolic compound is the main responsible for the antiedematogenic effects popularly attributed to *S. terebinthifolius*.

Methyl gallate have been demonstrated to possess activity antitumor [38], antibacterial [39], antiviral [40], analgesic [41] , anti-inflammatory [20] among other. Several examples of the chemical modification of such natural products yielding new medicaments are made some examples are roscovitin, derived from olomucin obtained from *Raphanus sativus* L. (Brassicaceae). Roscovitin is in clinical phase but is a promise of natural product compound with possess potent effect in inhibition of protein kinases to treatment of câncer and glomerulonefritis [42]. As classical examples about natural products as molecules leads are Salicilates obtained from *Salix alba* guiding the discovery of Aspirin® in 1897 [43]. Procaine and benzocaine (local anethesics) obtained by the derivatization of cocaine from *Erythroxylon coca* [44]. Then, as methyl gallate exhibit several activities it was a good choice as a natural products as leads in structural modification studies yielding new anti-inflammatory agents. In the present study, the results showed the description of new five derivatives, 3,4,5-trihydroxyphenyl-N'-(substituted-benzylidene)-1-carbohydrazides. A single oral dose of compound **3**, **4**, **5** and **6** (100 mg/kg), but not compound **7** (100 mg/kg), inhibited the carrageenan-induced oedema in mice paw. Compound **4** (100 mg/kg) reduced the carrageenan-increased of myeloperoxidase activity showing evident advantages above the methyl gallate original structure. When local application occur, methyl gallate (10-100 µg/paw), Compound **4**, **5**, and **6** (all at 10 µg/paw) inhibited the carrageenan-induced oedema and compound **3**, **4** and **6** (10 µg/paw) decrease the

MPO activity. To investigate if methyl gallate derivatives induced anti-inflammatory effects in another model of experimental inflammation, **4** and **3** were tested in pleurisy model inducing inhibition of inflammatory parameters like leukocyte migration and protein extravazation. The relative acidity of the amide hydrogen, as well as its capacity for stabilizing free radicals give these compounds the ability of mimicking the bis-allylic moiety of unsaturated fatty acids and amides like, that is, arachidonic acid.

Inflammation is, in some cases, could be a chronic condition that must be daily treated with anti-inflammatory drugs in chronic inflammatory diseases like rheumatic arthritis (RA). Although the current clinical practice lowering inflammation as a priority for people suffering from RA, the efficiency of the pharmacological treatment is reduced by absence of satisfactory responses that may be related to adverse effects [45]. At least to our known, this is the first study showing that preparations obtained from *S. terebinthifolius*, and the methyl gallate, are able to cause inflammation reduction in mice. Methyl gallate is not the only active compound, but it showed activity and certainly contributes to anti-inflammatory effect of crude extract. Also, these observations from anti-inflammatory activities of *S. terebinthifolius* extracts and methyl gallate have been guiding for the development of new methyl gallate derivatives that possess marcant anti-inflammatory activities.

References

- [1] R. Medzhitov, Inflammation 2010: new adventures of an old flame, *Cell* 140 (2010) 771-776.
- [2] E.R. Sherwood, T. Toliver-Kinsky, Mechanisms of the inflammatory response, *Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* 18 (2004) 385-405.
- [3] V. Kumar, A.K. Abbas, N. Fausto, J. Aster, Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Eighth ed., Saunders, Elsevier, 2009.
- [4] C.N. Serhan, S.D. Brain, C.D. Buckley, D.W. Gilroy, C. Haslett, L.A. O'Neill, M. Perretti, A.G. Rossi, J.L. Wallace, Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms, *FASEB J.* 21 (2007) 325-332.
- [5] A. Gonzalez-Chavez, S. Elizondo-Argueta, G. Gutierrez-Reyes, J.I. Leon-Pedroza, Pathophysiological implications between chronic inflammation and the development of diabetes and obesity, *Cir. Cir.* 79 (2011) 209-216.
- [6] R. Croteau, T.M. Kutchan, N.G. Lewis, *Biochemistry & Molecular Biology of Plants, Natural Products (Secondary Metabolites)*, 2000.
- [7] R. Richter, S.H. von Reuss, W.A. König, Spirocyclopropane-type sesquiterpene hydrocarbons from *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Phytochemistry* 71 (2010) 1371-1374.
- [8] S. Johann, N.P. Sa, L.A. Lima, P.S. Cisalpino, B.B. Cota, T.M. Alves, E.P. Siqueira, C.L. Zani, Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 9 (2010) 30.
- [9] J.F. Morton, Brazilian pepper - Its impact on people, animals and the environment, *Economy Botany* 32 (1978) 353-359.
- [10] L.R. Gazzaneo, R.F. de Lucena, U.P. de Albuquerque, Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in an region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil), *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 1 (2005) 9.
- [11] M.S. Marzouk, F.A. Moharram, E.G. Haggag, M.T. Ibrahim, O.A. Badary, Antioxidant flavonol glycosides from *Schinus molle*, *Phytother Res* 20 (2006) 200-205.
- [12] S.C. Cavalher-Machado, E.C. Rosas, A. Brito Fde, A.P. Heringe, R.R. Oliveira, M.A. Kaplan, M.R. Figueiredo, M.G. Henriques, The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy, *In.t Immunopharmacol.* 8 (2008) 1552-1560.
- [13] M. Gupta, U.K. Mazumder, P. Gomathi, V.T. Selvan, Antiinflammatory evaluation of leaves of *Plumeria acuminata*, *BMC Complement. Altern. Med.* 6 (2006) 36.
- [14] M.A. Chowdhury, K.R. Abdellatif, Y. Dong, D. Das, M.R. Suresh, E.E. Knaus, Synthesis of celecoxib analogues possessing a N-difluoromethyl-1,2-dihydropyrid-2-one 5-lipoxygenase pharmacophore: biological evaluation as dual inhibitors of cyclooxygenases and 5-lipoxygenase with anti-inflammatory activity, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 1525-1529.
- [15] G.A. Ayoola, G.A. Akpanika, F.O. Awobajo, M.O. Sofidiya, V.O. Osunkalu, H.A.B. Coker, T.O. Odugbemi, Anti-Inflammatory Properties of the Fruits of

- Allanblanckia floribunda* Oliv. (Guttiferae), Botany Research International 2 (2009) 21-26.
- [16] C.A. Kassuya, A. Cremonese, L.F. Barros, A.S. Simas, R. Lapa, R. Mello-Silva, M.E. Stefanello, A.R. Zamprônio, Antipyretic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract, dichloromethane fraction and costunolide from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae), J. Ethnopharmacol. 124 (2009) 369-376.
- [17] L.M. De Young, J.B. Kheifets, S.J. Ballaron, J.M. Young, Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents, Agents Actions 26 (1989) 335-341.
- [18] M.G. Henriques, V.B. Weg, M.A. Martins, P.M. Silva, P.D. Fernandes, R.S. Cordeiro, B.B. Vargaftig, Differential inhibition by two hexazepine PAF antagonists of acute inflammation in the mouse, Br. J. Pharmacol. 99 (1990) 164-168.
- [19] A. Vogel, Vogel's Practical organic chemistry, 3 ed., 1978, pp. 843.
- [20] L.F.C.C. Leite, M.N. Ramos, J.B.P. Silva, A.L.P. Miranda, C.A.M. Fraga, E.J. Barreiro, Synthesis and analgesic profile of novel N-containing heterocycle derivatives: arylidene 3-phenyl-1,2,4-oxadiazole-5-carbohidrazide, II FÁRMACO 54 (1999) 747-757.
- [21] M.M. Abou-Zaid, D.A. Lombardo, C. Nozzolillo, Methyl gallate is a natural constituent of maple (Genus *Acer*) leaves, Nat. Prod. Res. 23 (2009) 1373-1377.
- [22] S.J. Kim, M. Jin, E. Lee, T.C. Moon, Z. Quan, J.H. Yang, K.H. Son, K.U. Kim, J.K. Son, H.W. Chang, Effects of methyl gallate on arachidonic acid metabolizing enzymes: Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase in mouse bone marrow-derived mast cells, Arch. Pharm. Res. 29 (2006) 874-878.
- [23] W.K. Whang, H.S. Park, I.H. Ham, M. Oh, H. Namkoong, H.K. Kim, D.W. Hwang, S.Y. Hur, T.E. Kim, Y.G. Park, J.R. Kim, J.W. Kim, Methyl gallate and chemicals structurally related to methyl gallate protect human umbilical vein endothelial cells from oxidative stress, Exp. Mol. Med. 37 (2005) 343-352.
- [24] T.J. Hsieh, T.Z. Liu, Y.C. Chia, C.L. Chern, F.J. Lu, M.C. Chuang, S.Y. Mau, S.H. Chen, Y.H. Syu, C.H. Chen, Protective effect of methyl gallate from *Toona sinensis* (Meliaceae) against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damage in MDCK cells, Food Chem. Toxicol. 42 (2004) 843-850.
- [25] E.S. Nakamura, F. Kurosaki, M. Arisawa, T. Mukainaka, M. Okuda, H. Tokuda, H. Nishino, F. Pastore, Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds, Cancer Lett 177 (2002) 119-124.
- [26] M. Gundidza, N. Gweru, M.L. Magwa, V. Mmbengwa, A. Samie, The chemical composition and biological activities of essential oil from the fresh leaves of *Schinus terebinthifolius* from Zimbabwe, Afr. J. Biotechnol. 8 (2009) 7164-7169.
- [27] D.M.N.M. Oliveira, E.P.O. Carieli, A.K.F. Fagundes, R.M.F. Costa, K.P. Oliveira, E.R. Lima, L.B.G. Silva, Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), em cães com otite externa, Rev. Bras. Med. Vet. 26 (2004) 79-82.

- [28] S. Johann, M.G. Pizzolatti, C.L. Donnici, M.A. Resende, Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens, *Braz. J. Microbiol.* 38 (2007) 632-637.
- [29] A.L. Matsuo, C.R. Figueiredo, D.C. Arruda, F.V. Pereira, J.A. Scutti, M.H. Massaoka, L.R. Travassos, P. Sartorelli, J.H. Lago, α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 411 (2011) 449-454.
- [30] E.A. Carlini, J.M. Duarte-Almeida, E. Rodrigues, R. Tabach, Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão), *Rev. Bras. Farmacogn.* 20 (2010) 140-146.
- [31] M.L. Castelo Branco Neto, J.M. Ribas Filho, O. Malafaia, M.A. Oliveira Filho, N.G. Czezczko, S. Aoki, R. Cunha, V.R. Fonseca, H.M. Teixeira, L.R.F.d. Aguiar, Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos, *Acta Cir. Bras.* 21 (2006) 17-22.
- [32] I.H.I.L.S. Coutinho, O.J.M. Torres, J.E.F. Matias, J.C.U. Coelho, H.J. Stahlke Júnior, M.Á. Agulham, Ê. Bachle, P.A.M. Camargo, S.K. Pimentel, A.C.T. Freitas, Efeito do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de anastomoses colônicas: estudo experimental em ratos, *Acta Cir. Bras.* 21 (2006) 49-54.
- [33] J.A.T. Nunes Jr., J.M. Ribas-Filho, O. Malafaia, N.G. Czezczko, C.M. Inácio, A.W. Negrão, P.L.H.d. Lucena, H. Moreira, J. Wagenfuhr Jr., J.d.J. Cruz, Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) no processo de cicatrização da linea alba de ratos, *Acta Cir. Bras.* 21 (2006) 8-15.
- [34] H. Bendaoud, M. Romdhane, J.P. Souchard, S. Cazaux, J. Bouajila, Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils, *J. Food Sci.* 75 (2010) 466-472.
- [35] S. Gorzalczany, P. López, C. Acevedo, G. Ferraro, Anti-inflammatory effect of *Lithrea molleoides* extracts and isolated active compounds, *J. Ethnopharmacol.* 133 (2011) 994-998.
- [36] M.K. Jain, B.Z. Yu, J.M. Rogers, A.E. Smith, E.T. Boger, R.L. Ostrander, A.L. Rheingold, Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A2 from berries of *Schinus terebinthifolius*, *Phytochemistry* 39 (1995) 537-547.
- [37] A.S.N. Formagio, E.K.K. Iriguchi, L.M. Roveda, M.C. Vieria, C.A.L. Cardoso, N.A.H. Zarate, L.A. Tabaldi, C.A.L. Kassuya, Chemical composition and anti-inflammatory activity of the essential oil of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) fruits, *Latin American Journal of Pharmacy (formerly Acta Farmacéutica Bonaerense)* 30 (2011) 1555-1559.
- [38] H. Lee, Y. Kwon, J.H. Lee, J. Kim, M.K. Shin, S.H. Kim, H. Bae, Methyl gallate exhibits potent antitumor activities by inhibiting tumor infiltration of CD4+CD25+ regulatory T cells, *J. Immunol.* 185 (2010) 6698-6705.
- [39] J.G. Choi, O.H. Kang, Y.S. Lee, Y.C. Oh, H.S. Chae, H.J. Jang, J.H. Kim, D.H. Sohn, D.W. Shin, H. Park, D.Y. Kwon, In vitro activity of methyl gallate isolated from galla rhois alone and in combination with ciprofloxacin against

- clinical isolates of salmonella, *J. Microbiol. Biotechnol.* 18 (2008) 1848-1852.
- [40] C.J. Kane, J.H. Menna, C.C. Sung, Y.C. Yeh, Methyl gallate, methyl-3,4,5-trihydroxybenzoate, is a potent and highly specific inhibitor of herpes simplex virus in vitro. II. Antiviral activity of methyl gallate and its derivatives, *Biosci. Rep.* 8 (1988) 95-102.
- [41] H.S. Chae, O.H. Kang, J.G. Choi, Y.C. Oh, Y.S. Lee, O.O. Brice, M.S. Chong, K.N. Lee, D.W. Shin, D.Y. Kwon, Methyl gallate inhibits the production of interleukin-6 and nitric oxide via down-regulation of extracellular-signal regulated protein kinase in RAW 264.7 cells, *Am. J. Chin. Med.* 38 (2010) 973-983.
- [42] H.N. Brandão, J.P. David, R.D. Couto, J.A.P. Nascimento, J.M. David, Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas, *Quím. Nova* 33 (2010) 1359-1369.
- [43] C. Viegas Jr, V.S. Bolzani, E.J. Barreiro, Os produtos naturais e a química medicinal moderna, *Quím. Nova* 29 (2006) 326-337.
- [44] D.R. Araujo, E. Paula, L.F. Fraceto, Local anesthetics: interaction with biological membranes and with the voltage-gated sodium channel *Quím. Nova* 31 (2008) 1775-1783.
- [45] R.A.Elliott, Poor Adherence to Medication in Adults with Rheumatoid Arthritis: Reasons and Solutions, *Disease Management & Health Outcomes*, 16 (2008) 13-29.

Legends to figures

Figure 1 – Effect of oral administration of MEST on carrageenan-induced paw oedema in mice. Animal received MEST (100 or 300 mg/kg, p.o.), dexamethasone (DEX – 1 mg/kg, s.c) or vehicle and after 1 h, an intraplantar injection of carrageenan (300 µg/paw) was performed. In (A), the time course of the inhibition induced by 300 mg/kg MEST and DEX is shown. In (B), bars show the effect of different doses of MEST and DEX in paw oedema (µm) 2 h after carrageenan injection. In (C), the not inhibition induced by MEST in increasing of myeloperoxidase (MPO) activity induced by local injection of carrageenan. The bars express the mean ± SEM of 5 animals, compared with vehicle (V) vs treated group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls.

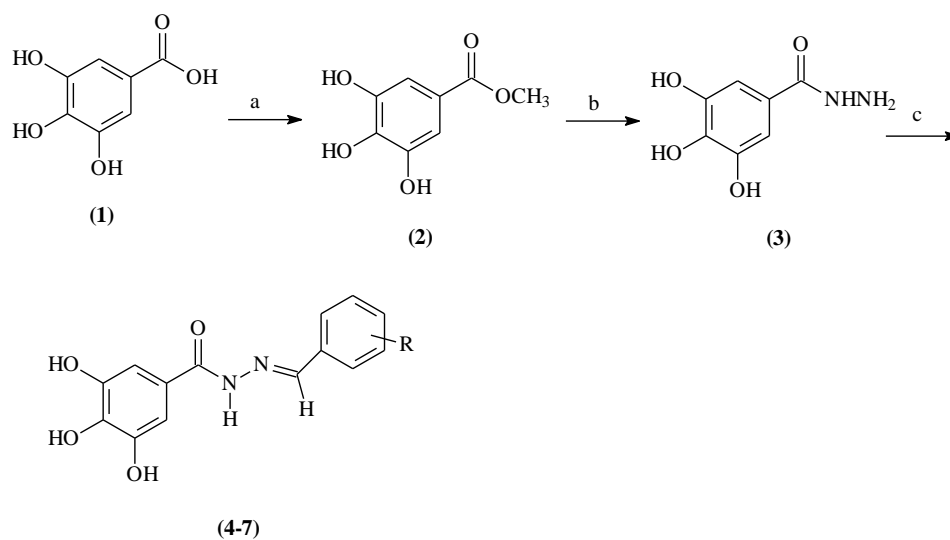
Figure 2 – Effect of methyl gallate (compound 2) on carrageenan-induced paw oedema in mice. Animal received the oral treatment compound 2 (100 and 300 mg/kg, p.o.), dexamethasone (DEX – 1 mg/kg, s.c) or vehicle and after 1 h, an intraplantar injection of carrageenan (300 µg/paw) was performed. In (A), bars show the effect of different doses of compound 2 and DEX in paw oedema (µm) 2h after carrageenan injection. In (B), the not inhibition induced by compound 2 in increasing of myeloperoxidase (MPO) activity induced by carrageenan. In (C), bars show the effect of different doses of intraplantar injection of compound 2 (10 and 100 µg/paw), DEX in paw oedema (mm) 2 h after carrageenan injection. In (D), the not inhibition induced by compound 2 in increasing of MPO activity induced by local injection of carrageenan. The bars express the mean±SEM of 5 animals, compared with vehicle (V) vs treated group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls.

Figure 3 – Effect of compounds 3, 4, 5 and 6 on carrageenan-induced paw oedema in mice. Animal received the oral treatment compounds 3, 4, 5 and 6 (100 mg/kg, p.o.), dexamethasone (DEX – 1 mg/kg, s.c) or vehicle and after 1h, an intraplantar injection of carrageenan (300 µg/paw) was performed. In (A), bars

show the effect of compounds 3, 4, 5 and 6 and DEX in paw oedema (μm) 2h after carrageenan injection. In (B), the inhibition induced by compound in increasing of myeloperoxidase (MPO) activity induced by local injection of carrageenan. The bars express the mean \pm SEM of 5 animals, compared with vehicle (V) vs treated group. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls.

Figure 4 - Effect of compounds 3, 4, 5 and 6 on carrageenan-induced paw oedema in mice. Animal received the local treatment with compounds 3, 4, 5 and 6 (10 $\mu\text{g}/\text{paw}$), dexamethasone (DEX – 1 mg/kg, s.c) or vehicle and after 1h, an intraplantar injection of carrageenan (300 $\mu\text{g}/\text{paw}$) was performed. In (A), bars show the effect of different compounds derived from Compound 2 and dexamethasone in paw oedema (μm). 2h after carrageenan injection. In (B), the inhibition induced by compound in increasing of myeloperoxidase (MPO) activity induced by local injection of carrageenan. The bars express the mean \pm SEM of 5 animals, compared with vehicle (V) vs treated group. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls.

Figure 5 – Effects of Compound 4 and Compound 3 on total leukocytes (A) and protein extravasation (B) induced by carrageenan in the pleural cavity of mice. Animal received the intraperitoneal treatment compounds derived from gallic acid (10 mg/kg), or vehicle, and after 1 h they received an intrapleural injection of Cg (100 μl of a 1% solution/cavity). Control animals received only the vehicles. Animals were killed after Cg injection. The bars express the mean \pm SEM of 5 animals, compared with vehicle (V) vs treated group. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls.



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) CH_3OH , H_2SO_4 , reflux, 48 h; 85%. (b) $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, EtOH , reflux, 48 h; 74%. (c) RCHO , EtOH , H_2SO_4 (cat), reflux, 36 h; 74-80%.

Figures

Fig. 1

Iriguchi *et al.*, 2012

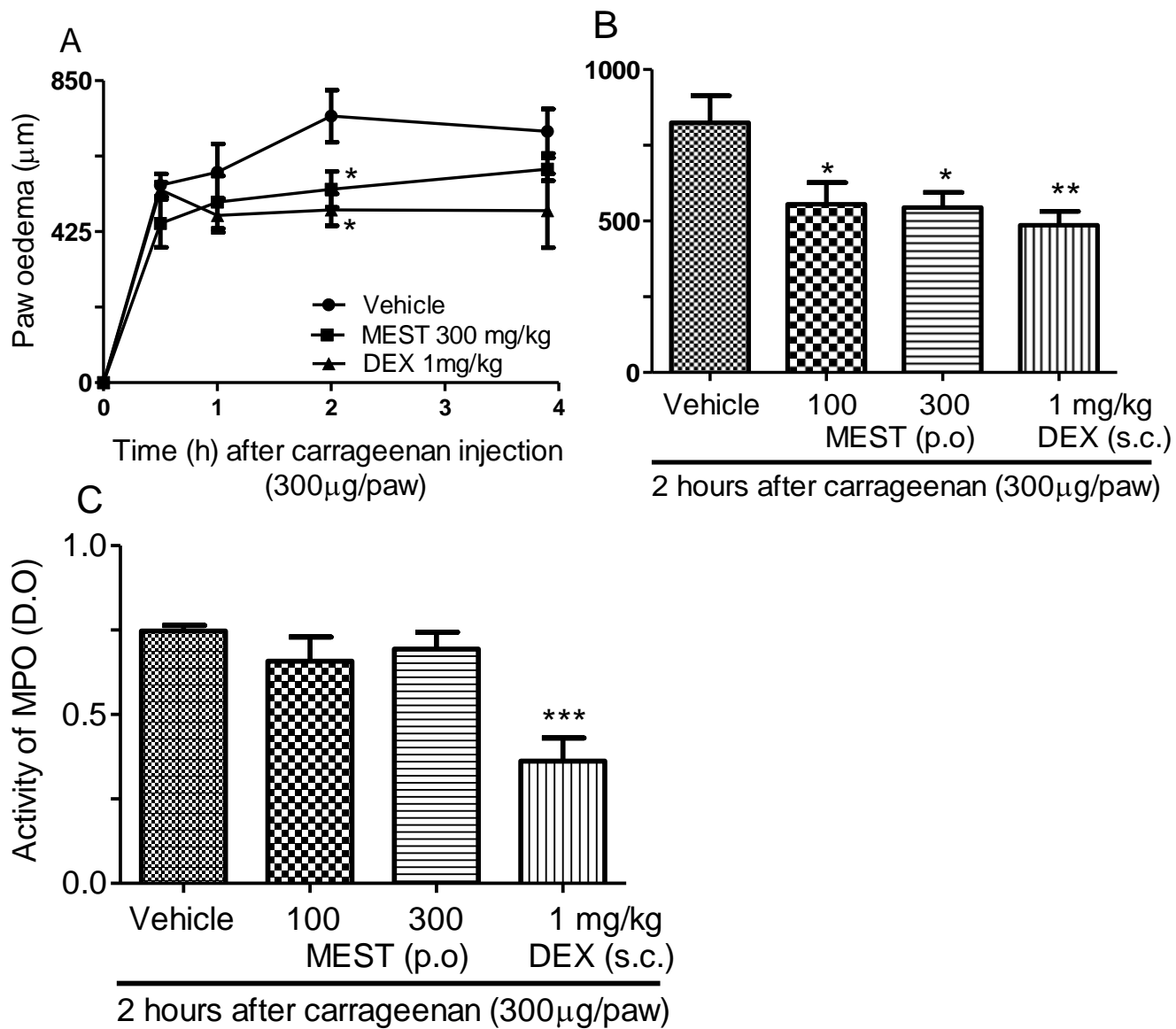


Fig. 2

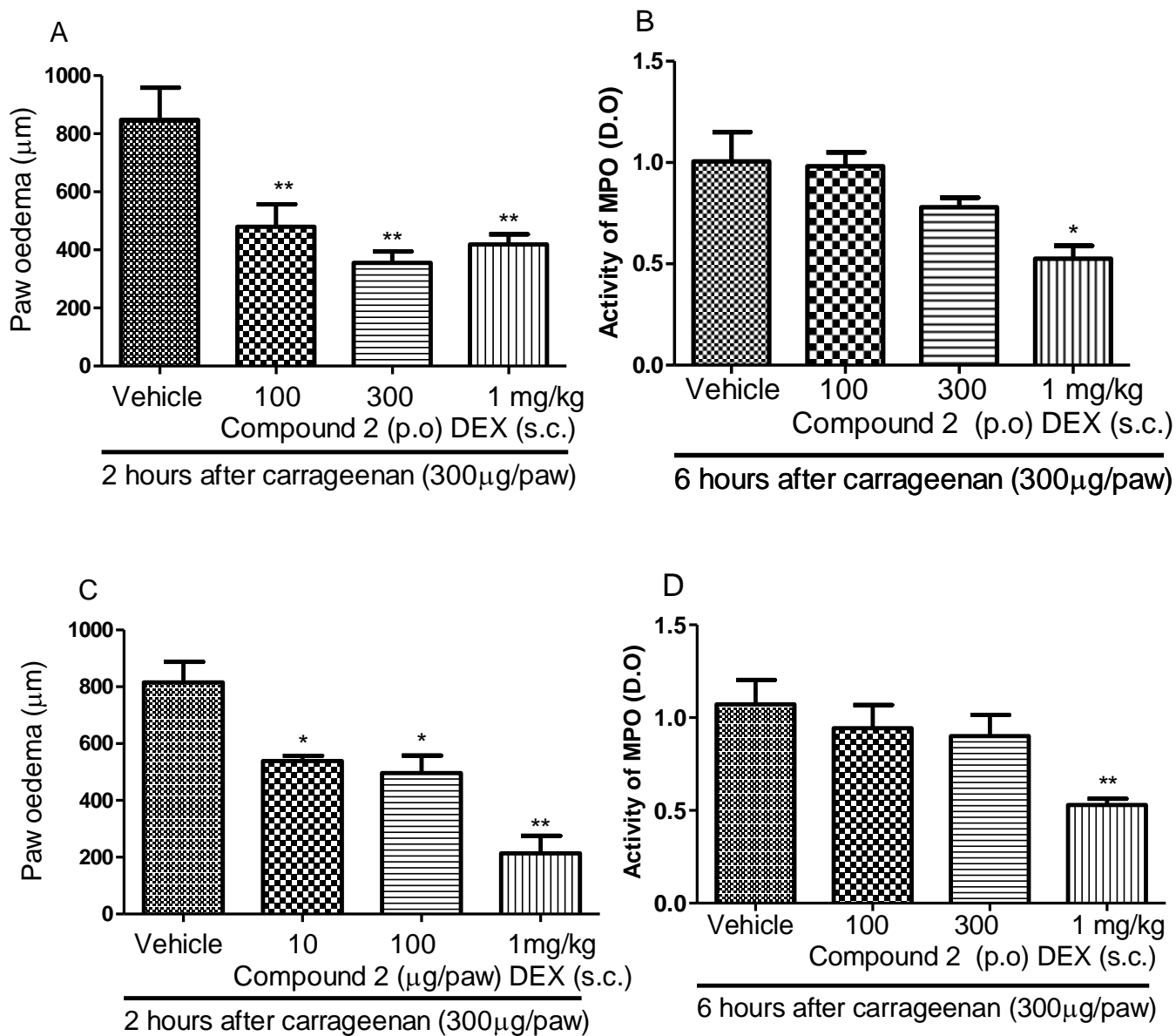
Iriguchi *et al.*, 2012

Fig. 3

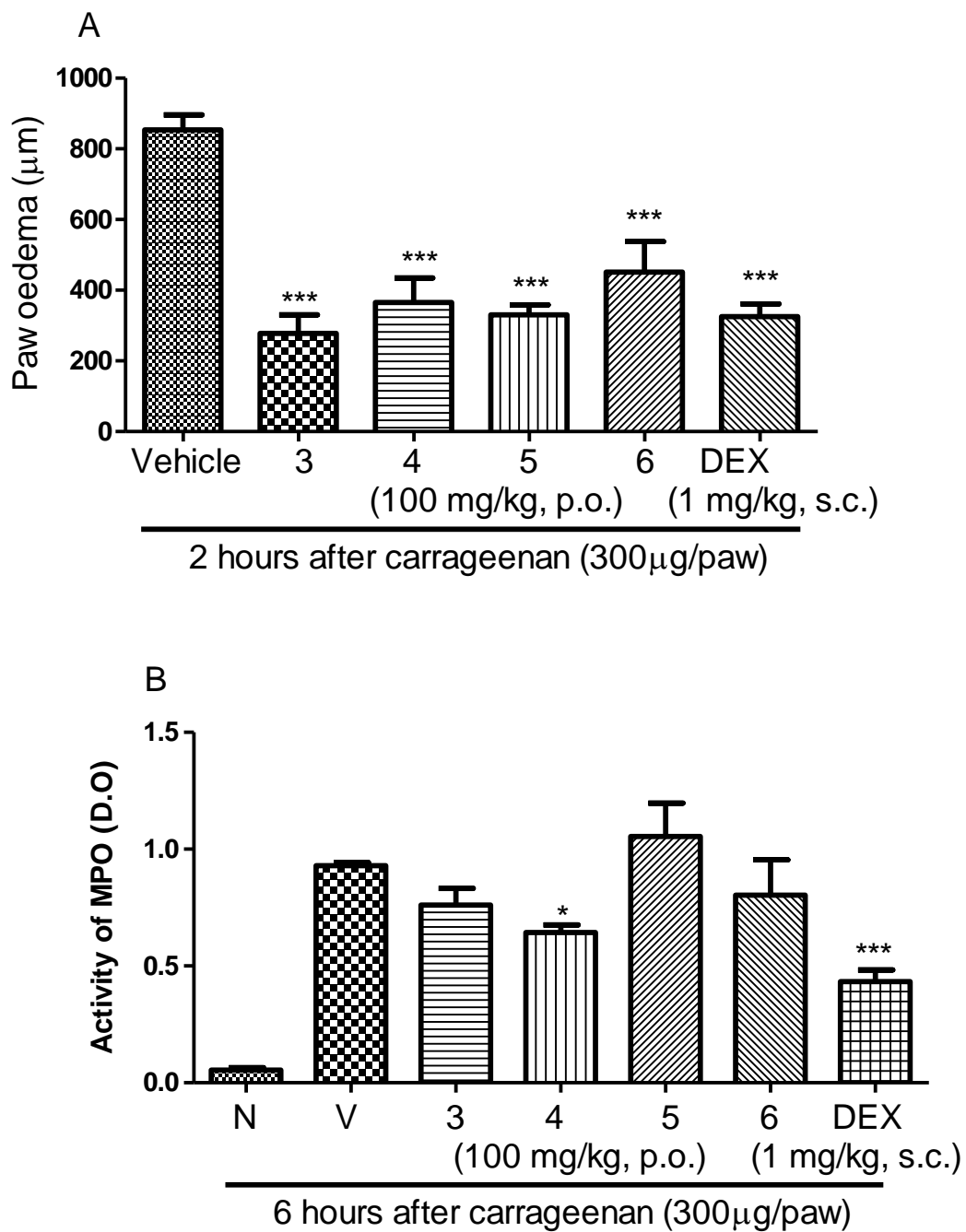
Iriguchi *et al.*, 2012

Fig. 4

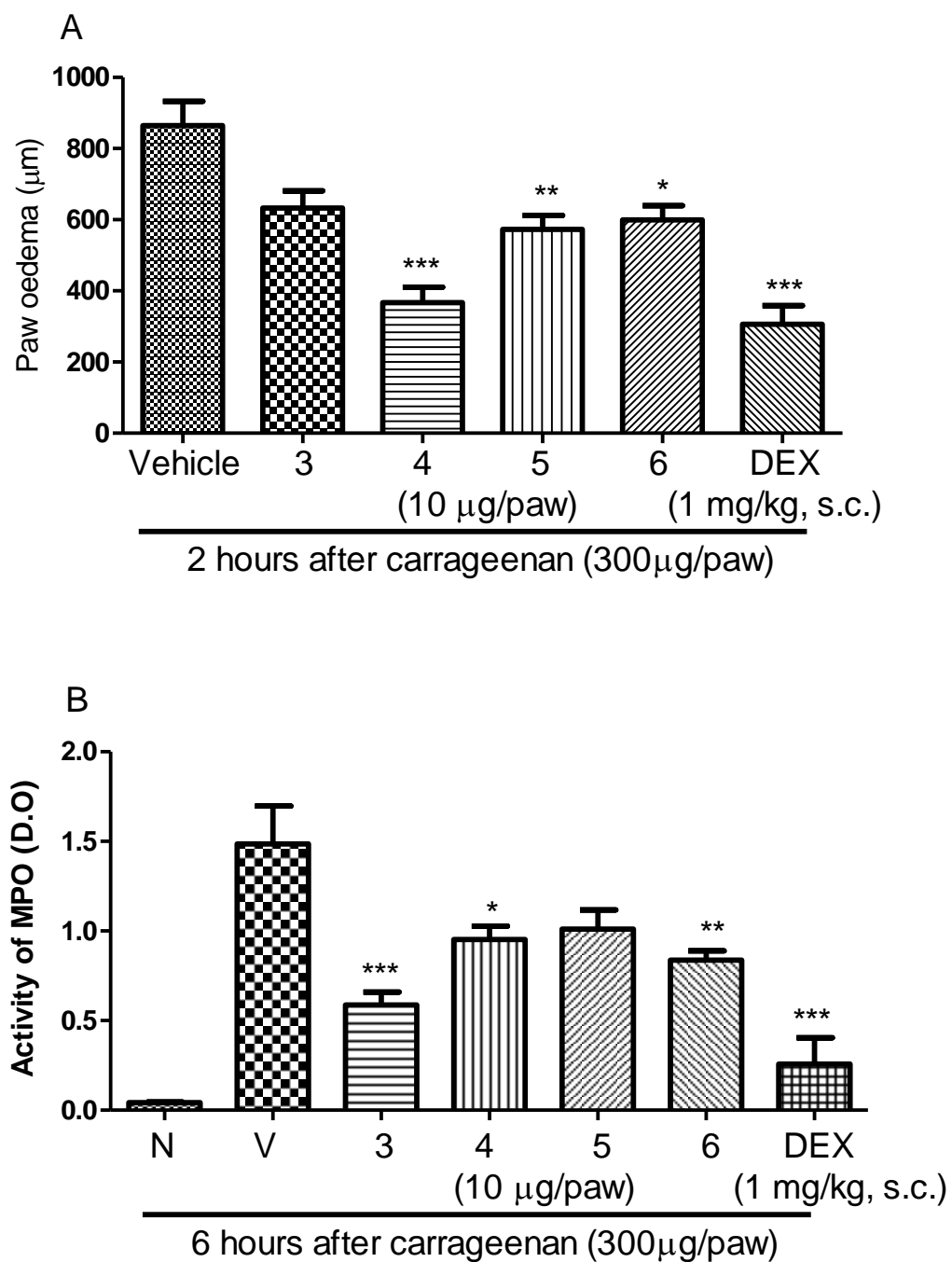
Iriguchi *et al.*, 2012

Fig. 5

Iriguchi *et al.*, 2012