

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO, DE
FRAÇÕES E DO ALCALÓIDE DICENTRINONA OBTIDOS
DE *Duguetia furfuracea* (St. Hil) EM CAMUNDONGOS**

ALEXSANDRA VILA MAIOR DE SOUZA

**DOURADOS MS
2013**

ALEXSANDRA VILA MAIOR DE SOUZA

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO, DE FRAÇÕES
E DO ALCALÓIDE DICENTRINONA OBTIDOS DE *Duguetia*
furfuracea (St. Hil) EM CAMUNDONGOS**

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. Candida Aparecida Leite Kassuya

Co-orientadora: Profa. Dra. Anelise Samara Nazari Formagio

Co-orientadora: Profa. Dra. Arielle Cristina Arena

**DOURADOS MS
2013**

Agradecimentos

A Deus pela minha vida.

Aos meus pais Antonio Alves de Souza e Elis Regina de Souza Vilamaior por sempre ficarem incondicionalmente ao meu lado e por serem exemplos de humildade, honestidade e perseverança.

Ao meu amado Gilberto Luís Guimarães de Paula, por me compreender e apoiar minhas decisões e principalmente por ser um homem maravilhoso com o qual, peço a Deus possa construir uma família.

Aos meus irmãos Geandro Vila Maior de Souza e Vanessa Vilamaior de Souza por serem generosos e pacientes na medida do possível, agradeço especialmente a Vanessa por deixar de lado suas limitações para me ajudar a superar as minhas.

Aos meus avós Ilson Cardoso Vilamaior e Marlene de Souza Vilamaior pelo conforto dos abraços e pelo carinho constante.

A minha orientadora Candida Aparecida Leite Kassuya pela excelente orientação e pela amizade, carinho e compreensão em todos os momentos. Por me conhecer tão bem a ponto de saber qual é o meu estado de espírito apenas de me olhar, pelo privilégio de compartilhar comigo momentos de sua vida, por ser um exemplo de humildade e por me ensinar o valor do trabalho em equipe. Não sei se um dia poderei retribuir o bem que me sempre me ofereceu.

A minha co-orientadora Anelise Samara Nazari Formagio pelo fornecimento da matéria-prima (extrato, frações e alcalóide) para que o trabalho pudesse ter sido realizado, pelo apoio, sobretudo nos momentos cruciais da finalização do trabalho, pelos sorrisos... Que tanto me confortaram.

Aos membros da banca Rodrigo Juliano Oliveira, Jonas da Silva Mota, Silvia Aparecida Osterreich e Marcio Eduardo Barros por terem aceitado meu convite e oferecerem sugestões imprescindíveis para o aperfeiçoamento do meu trabalho.

Ao meu companheiro de mestrado Frederico Formagio Neto, que no decorrer desses dois anos se tornou um amigo querido com o qual pude contar, um verdadeiro irmão nos apoiamos e juntos vencemos.

A minha amiga Edna Kiyomi Kassuya Iriguchi com quem aprendi que a base de uma vida feliz é a família e que por ela os sacrifícios são sempre válidos.

Aos meus amigos Magaiver Andrade Silva e Antonio da Silva Novaes pela alegria e companheirismo.

As minhas amigas Caroline do Amaral Polido e Caroline Müller por serem exemplos de amor a pesquisa, pessoas que mesmo longe moram no meu coração e das quais só posso ter lembranças boas.

As minhas amigas Patricia Karla da Rocha Ferreira, Caroline André de Souza Jorge e Flora Martinez Figueira Moreira pelas risadas, por pacientemente me ouvirem em momentos difíceis e por me incentivarem a prosseguir.

As minhas queridas companheiras de trabalho Débora Hoff Brait, Priscilla Ely Vieira Hattori, Mariana Bento Tatara, Camila Farah e Anália Gomes da Cruz, que fazem com que nosso ambiente de trabalho fique leve e prazeroso.

Aos meus companheiros de laboratório Aline Lima de Barros (guriazinha), Isabella Cristina Dias, Thaisa Dutra, Giseli Traesel, Ana Claudia Piccinelli e Juliane Coelho de Souza pelo apoio.

Dedicatória

Dedico essa dissertação a Profa. Dra. Candida Aparecida Leite Kassuya excelente professora, pesquisadora incansável e ser humano fantástico.

“Ninguém é digno do oásis se não aprender a atravessar o deserto”.

Augusto Cury

Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Considerações gerais sobre a família Annonaceae	3
2.1.1 Gênero <i>Duguetia</i>	3
2.1.2 <i>Duguetia furfuracea</i>	6
2.2 Alcalóides	7
2.3 Inflamação	8
2.3.1 Eventos vasculares e celulares na inflamação	9
2.3.2 Indutores e resolutores inflamatórios	12
2.3.3 Mediadores inflamatórios	12
2.3.3.1 Aminas vasoativas (histamina e serotonina)	12
2.3.3.2 Cininas	14
2.3.3.3 Eicosanóides	14
2.3.3.4 Citocinas	15
2.4 Fármacos utilizados na inflamação	17
2.5 Modelos experimentais para desenvolvimento de novos medicamentos	18
2.5.1 Edema de pata	18
2.5.2 Bolsa de ar	18
2.5.3 Artrite induzida por zimosan	19
2.6 Alvos moleculares para doenças inflamatórias	19
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivos Específicos	21
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
5 ARTIGO	35
6 ANEXOS	59
Anexo 1 – Metodologia	59
Anexo 2 – Carta de aprovação do CEP/UNIGRAN	62

Resumo

Duguetia furfuracea St. Hill (Annonaceae) é uma planta amplamente disseminada no Brasil, popularmente é utilizada para o tratamento de reumatismo e afecções nos rins. O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade aguda do extrato metanólico (EMDF) e a atividade anti-inflamatória do EMDF, das frações (acetato, hexano, clorofórmio e aquosa) e do alcalóide dicentrinona obtidos de folhas de *D. furfuracea* em modelos experimentais de inflamação em camundongos. Para avaliação da atividade anti-inflamatória foram utilizados os modelos experimentais de edema de pata induzido por carragenina, atividade de mieloperoxidase (MPO), modelo de bolsa de ar e artrite induzida por zimosan. Além disso, foi realizado o teste de toxicidade aguda. Os tratamentos foram realizados por gavagem com EMDF (30-300 mg / kg) seguido indução do edema de pata por carragenina. Foi observada redução significativa de parâmetros inflamatórios, por meio dos ensaios de edema de pata e a atividade de MPO em todas as frações testadas. Os estudos fitoquímicos da fração clorofórmio resultou no isolamento do composto dicentrinona no extrato analisado. A administração oral da dicentrinona inibiu tanto o edema quanto a atividade da MPO. No modelo de bolsa de ar, o EMDF (30-300 mg / kg) e a dicentrinona (2,4 mg / kg) inibiram a migração de leucócitos e o extravasamento plasmático. O EMDF (100 mg / kg) não alterou a artrite induzida por zimozan, e nenhum sinal de efeitos tóxicos foram evidenciados com a dose de 2.000 mg / Kg e 5.000 mg/Kg de EMDF. Os resultados mostraram que *D. furfuracea* apresenta atividade anti-inflamatória em modelos experimentais de inflamação e sem causar toxicidade aguda. A presença do alcalóide dicentrinona poderia ser responsável, pelo efeito anti-inflamatório observado.

Palavras-chave: *Duguetia furfuracea*, inflamação, dicentrinona, carragenina, mieloperoxidase

Abstract

Duguetia furfuracea St. Hill (Annonaceae) is a widely disseminated plant in Brazil, in folk medicine it is used for the treatment of rheumatism and kidney affections, however, there are no literature reports regarding its antiinflammatory activity. The focus of this study was to evaluate the acute toxicity and the antiinflammatory activity of the methanolic extract (EMDF), the fractions (acetate, hexane, chloroform and aqueous) and the alkaloid dicentrinone obtained from leaves of *D. furfuracea* in experimental models of inflammation with mice. To observe the antiinflammatory activity we performed the following experimental models: paw oedema induced by carrageenan, myeloperoxidase activity (MPO), air pouch model, and zymosan-induced arthritis, furthermore it was performed the acute toxicity test. The treatments were made orally (gavage) with EMDF (30-300 mg / kg), next the animals were submitted to paw oedema induced by carrageenin and it was observed a significant reduction of the inflammatory parameters such as paw oedema and MPO activity. All the fractions tested also inhibited the oedema induced by carrageenin. Phytochemical studies using the chloroform fraction revealed the presence of the compound dicentrinone. The oral administration of dicentrinone inhibited both oedema and the activity of MPO. In the air pouch model, the EMDF (30-300 mg / kg) and the dicentrinone (2.4 mg / kg) inhibited leukocyte migration and plasma extravasation. The EMDF (100 mg / kg) did not alter zymozan-induced arthritis, and no sign of toxic effects were seen at the dose of 2000 mg/ kg of EMDF. The results demonstrated that *D. furfuracea* has anti-inflammatory activity in experimental models of inflammation and no signs of acute toxicity. Since the presence of alkali dicentrinone could be responsible at least in part, for the observed effects. Whereas the presence of the alkaloid dicentrinone could be responsible, at least in part, for the effects observed.

Keywords: *Duguetia furfuracea*, inflammation, dicentrinone, carrageenan, myeloperoxidase

Lista de abreviaturas e símbolos

AAS	ácido acetilsalicílico
AIE	anti-inflamatório esteroideal
AINE	anti-inflamatório não esteroideal
ANOVA	análise de variância
CAMs	moléculas de adesão celular
Cg	carragenina
COX	ciclooxigenase
DNA	ácido desoxirribonucleico
GC	glicocorticóide
GR	receptor citosólico de glicocorticóide
ICAM-1	molécula de adesão intercelular 1
IL	interleucina
LOX	lipooxigenase
LT	leucotrieno
LX	lipoxina
MPO	mieloperoxidase
NF-kB	fator nuclear kappa B
NO	óxido nítrico
PAMPs	padrões moleculares associados ao patógeno
PECAM-1	molécula de adesão plaquetária / endotelial celular 1
PG	prostaglandina
PGD	prostaglandinas D
PGE	prostaglandina E

PMN	leucócito polimorfonuclear
SNC	sistema nervoso central
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
VCAM-1	molécula de adesão celular vascular 1

1 INTRODUÇÃO

O uso das plantas medicinais para prevenção e tratamento de doenças é uma prática utilizada desde a antiguidade. Trata-se de uma alternativa terapêutica interessante à medida que alia eficácia à relativa facilidade de obtenção de substâncias com potencial terapêutico, o desenvolvimento dos estudos com plantas medicinais como medicamentos (Butler 2008; Tulp and Bohlin 2004).

Aproximadamente 25 a 30% das drogas com propriedades medicinais são oriundas de produtos naturais, principalmente de plantas medicinais (Matos 1994; Veiga Junior et al. 2005; Veiga Junior 2008). O Brasil tem um papel promissor quanto à obtenção de matéria prima, uma vez que possui um terço da flora mundial (Yunes et al. 2001).

Como exemplos clássicos de fármacos obtidos a partir de plantas medicinais, cita-se: a digoxina, proveniente da *Digitalis purpúrea* utilizada no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva; a morfina, potente analgésico obtida da *Papaver somniferum*; a reserpina, um anti-hipertensivo, isolada a partir da *Rauwolfia serpentina*; a vincristina e a vinblastina, ambas de *Catharanthus roseus* utilizadas no tratamento de leucemia e doença de Hodgkin (Croteau et al. 2000). Ainda, é importante mencionar o Acheflan®, utilizado como analgésico e anti-inflamatório obtido de *Cordia verbenacea* (erva-baleeira). Esse medicamento foi o primeiro a ser pesquisado e desenvolvido totalmente no Brasil (Calixto and Siqueira Junior 2008).

O processo inflamatório consiste em uma série de eventos que ocorrem no organismo, frente a um agente infeccioso, antígeno ou lesão celular ou tecidual, cujo intuito é eliminar o agente agressor e promover a reparo do tecido (Sherwood and Toliver-Kinsky 2004). A inflamação coexiste com o desenvolvimento de doenças crônicas, tais como a artrite, a diabetes, as doenças que envolvem o sistema cardiovascular, dentre outras. Por isso, a busca por novos fármacos que atuem no tratamento dessas doenças, com efeitos colaterais reduzidos em relação aos anti-inflamatórios já existentes, se torna pertinente. Nesse contexto, acrescenta-se que as plantas medicinais são importante foco de estudo farmacológico, visto que possuem metabólitos secundários que são utilizados como base para o desenvolvimento de novos medicamentos (Verpoorte 1998; Newman and Cragg 2012).

As aplicabilidades comprovadas cientificamente da espécie *D. furfuracea*, em especial, estão relacionadas às atividades citotóxicas, antitumorais, tripanocidas e

leishmanicidas (*in vitro*), por outro lado, seu uso popular também se relaciona com a ação anti-inflamatória (de Sousa et al. 2010; Almeida et al. 2011).

Em função dos aspectos discutidos, o grupo de pesquisa “Farmacologia de produtos naturais” com objetivo de demonstrar o potencial farmacológico de plantas medicinais nativas do Mato Grosso do Sul, Estado que apresenta grande diversidade de plantas. Desta forma, dando continuidade a estudos principalmente de plantas do Cerrado na região de Dourados – MS, com especial interesse em plantas, nos propusemos a avaliação do efeito anti-inflamatório do extrato metanólico de *D. furfuracea*, além de suas frações (acetato, aquosa, clorofórmica e hexânica) e de seu alcalóide isolado, a dicentrinona, em modelos animais de inflamação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações gerais sobre a família Annonaceae

Na região sul do Estado do Mato Grosso do Sul, estudos que evidenciam a ocorrência de espécies utilizadas na medicina popular com ou sem comprovação científica ainda são escassos. Logo muitos aspectos da flora medicinal dessa região permanecem desconhecidos. (Sangalli and Vieira 2003; Mota et al. 2008)

Dentro desta variedade de espécies encontradas no Mato Grosso do Sul, destaca-se as plantas da família Annonaceae. Essa apresenta cerca de 140 gêneros e 2500 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, com 39 gêneros encontrados na América tropical. Tal família também se destaca pelo fornecimento de frutos comestíveis dos gêneros *Annona*, *Rollinia*, *Artabotrys*, *Asimina*, *Polyalthia*, *Raimondia*, *Uvaria* e *Duguetia* (Pontes and Mello-Silva 2005; da Silva Almeida et al. 2007). Já no Brasil são encontrados aproximadamente 29 gêneros que compreendem 260 espécies (Barroso 1978).

Annonaceae é uma família pouco estudada, entretanto, investigações fitoquímicas e farmacológicas foram se intensificando nos últimos anos e vários estudos demonstraram a presença de compostos de natureza química diversificada. Tais como os terpenóides (em especial diterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos) e os ácidos graxos (acetogéninas e alcalóides) (Silva et al. 2007).

A literatura relata que existem componentes com atividades antiparasitária, antimicrobiana, pesticida, antitumoral e antimalárica presentes em várias espécies desta família (Frana and Suffredini 2002; de Sousa et al. 2003). O extrato liofilizado das folhas de *D. furfuracea* também demonstrou atividade citotóxica que pode pelo menos em parte ser atribuída à ação de alcalóides presentes (Silva et al. 2012).

2.1.1 Gênero *Duguetia*

Duguetia consiste em 89 espécies nativas da América Tropical e 4 da África. Em relação a estudos fitoquímicos verifica-se a presença de compostos da classe de alcalóides e sesquiterpenos. Um levantamento sobre o gênero *Duguetia*, feito no Banco de Dados NAPRALERT, *Chemical Abstract e Biological Abstracts*, mostrou que nas oito espécies descritas na literatura todas de ocorrência sul americanas, foram isoladas um total de 79 substâncias e dessas, 72 são alcalóides (Navarro et al. 2001).

As *Duguetias* do Estado do Mato Grosso do Sul são conhecidas popularmente como araticum-seco, ata-do-mato ou sofre-do-rim-quem-quer (Rodrigues and Carvalho 2001; Neto and Morais, 2003). Partes das plantas de *Duguetia* são usadas na medicina popular para o preparo de chás e xaropes que são usados contra reumatismo, além deste outro uso freqüente é como parasiticida (Silberbauer-Gottsberger, 1981/82).

A Tabela 1, relata as principais espécies estudadas quimicamente e seus respectivos alcalóides isolados. É importante destacar que a classe de compostos que podem caracterizar o gênero *Duguetia* são os alcalóides, por isso esta classe de compostos será o principal alvo para identificação, caracterização, isolamento fitoquímico e estudo farmacológico comparativo com a ação de extratos de *Duguetia*.

As espécies *D. chrysocharpa*, *D. gardneriana* e *D. moricandiana* demonstraram atividade anti-inflamatória, analgésica, antinociceptiva e antioxidante (de Sousa et al. 2010; Almeida et al. 2011).

Alguns dos alcalóides aporfínicos isolados de *Duguetia* são relatados na literatura como antimálaricos, citotóxicos (*in vitro*) e antimicrobianos (Tempone et al. 2005; Maia et al. 2006). Os alcalóides hadrantine A e B (**1-2**), imbilina (**3**), sampagine (**4**) e 3 metóxisampagine (**5**), isolados de *D. hadrantha* (Figura 1) exibiram atividade antimalárica e antifúngica (Muhammad et al. 2001).

Tabela 1: Alcalóides isolados de espécies do gênero *Duguetia*.

Espécie	Alcalóide(s) isolado(s)	Referência
<i>D. furfuracea</i>	1,2,10-Trimetoxi-8,11-dihidroxi Isocoridina], norisocoridina, Xilopina; Obovanina, Assimilobina, aterospermidina, Liriodenina, bisbenziltetraidroisoquinolínico Isocondodendrina; Discretamina, Reticulina, duguetina, dicentrinona, duguetina-N-óxido, N-metiltetraidropalmatina, nitrosoanonaina, N-metilglaucina, nitrosoxilopina Nitrosoisocoridina, nitrosoaporfina	aporfínico, Carollo et al. 2006a; Carollo and De Siqueira 2009
<i>D. gardneriana</i>	discretamina, tetrahydrojathrorrizina tetrahidropalmatina	e Almeida et al. 2007

<i>D. glabriuscula</i>	oxoaporfinóide e 7-hidroxi-aporfinóide	Matos et al. 2006
<i>D. trunciflora</i>	reticulina, tetrahydro-palmatina, tetrahydrojathrorrizina, discretamina, taicanina, e jathrorrizina	Fechine et al. 2002a
<i>D. flagellaris</i>	nornuciferina, isopilina, <i>O</i> -methylisopilina, calicinina, duguevanina, pachipodantina, oliverolina N-óxido oliverolina, oliveridina e duguetina	Fechine et al. 2002b
<i>D. odorata</i>	oliverolina, N-metilguatterina, dehidrodiscretina, pseudopalmatina	Brastianos et al. 2007
<i>D. hadrantha</i>	4,5-dioxo-1-azaaporfinóides, hadrantina A, hadranthina B, imbilina-1, sampangina, 3-methoxisampangina, 4,5-dioxo-1-azaaporfina, (1-3), copirina	Muhammad et al. 2001
<i>D. spixiana</i> , <i>D. stelichantha</i>	aporfinicos e oxaporfínicos	Debourges et al. 1987

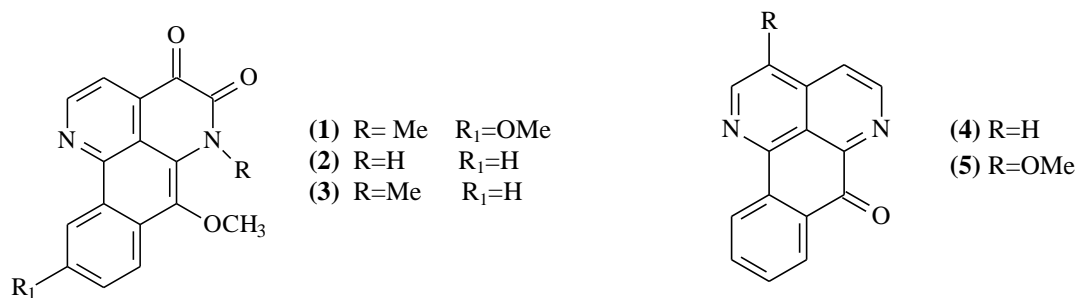


Figura 1 – Estrutura dos alcalóides com atividade antimalárica isolados de *D. hadrantha*

O óleo essencial obtido das folhas de *D. gardneriana* apresentou atividade antimicrobiana e *D. moricandiana* apresentou ação antinociceptiva em modelos experimentais (Almeida et al. 2010; Almeida et al. 2011). *D. glabriuscula* e *D. furfuraceae*

apresentaram em sua composição sesquiterpenos, considerados raros dentro deste gênero e família (Carollo and Hellmann 2005).

2.1.2 *Duguetia furfuracea*

Duguetia furfuracea (A. St. Hil Benth. e Hook. f.) conhecida popularmente como “sofre-do-rim-quem-quer” e “araticum-seco”, é um arbusto de ocorrência em várias regiões do Brasil, em especial no cerrado. Está distribuída em todo o Estado de Mato Grosso do Sul e é considerada uma espécie daninha em pastagens (Carollo et al., 2006b; Rodrigues 2001). A infusão das suas folhas e do caule é utilizada para o tratamento de reumatismo e cólica renal, também como sedativo; e o pó da semente para pediculose (Silberbauer 1982; Rodrigues 2001; Coelho et al. 2011).



Figura 2 – Foto de *Duguetia furfuracea* de dezembro de 2011.

O perfil fitoquímico da *D. furfuracea* (Figura 2), demonstrou a presença de sesquiterpenos, flavonóides e alcalóides (Carollo and Hellmann 2005; Carollo et al. 2006a; Carollo et al. 2006b; Silva et al. 2009). Apresenta ação antiespasmódica e antiprotozoárica; o óleo essencial apresentou em sua composição química um alto percentual de alcaloides, tanto monoterpenos quanto sesquiterpenos (Fischer et al. 2004; de Mesquita et al. 2007).

Estudos realizados evidenciaram que o extrato da casca do caule de *D. furfuracea* possui atividades citotóxica, antitumoral, tripanocida e leishmanicida, sendo que a citotoxicidade pode ser atribuída à presença de outros alcalóides, a presença, tanto de terpenos, quanto de alcalóides, pode contribuir para a proteção do DNA, e assim para a ausência de genotoxicidade e mutagenicidade quando tratado com *D. furfuracea* (Silva et al. 2007; Valter et al. 2008; Coelho et al. 2011; Silva et al. 2012).

O extrato hexânico e etanólico da *D. furfuracea* demonstrou atividade antiprotozoária (*in vitro*) sobre formas promastigotas de *Leishmania donovani* e amastigotas de *Tripanossoma cruzi* (Mesquita et al. 2005). Foi ainda observado que o extrato etanólico da planta apresentou ação larvicida sobre larvas no terceiro estágio de desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti* (Coelho et al. 2011).

2.2 Alcalóides

Alcalóides são compostos naturais classificados como metabólitos secundários. A maioria é derivada de aminoácidos e são encontrados principalmente nas plantas. Em sua estrutura química existe uma molécula de nitrogênio que pode ou não fazer parte de um anel heterocíclico, possuem como características a aparência cristalina e o sabor amargo, o caráter de base e a estrutura tridimensional faz com que os alcalóides tenham atividades fisiológicas pronunciadas (Vollhardt, 2004).

Podem atuar como fármacos e dentre eles destaca-se a morfina (analgésico), a reserpina (hipertensão arterial), a atropina (arritimias); a classe das penicilinas (antibióticos) e a quinina (anti malárico). Além desses alcalóides, há a nicotina, a teobromina, a cocaína e a estricnina, utilizadas para outros fins que não medicinais (Sarker 2007).

Dentro da classe dos alcalóides também estão os alcalóides aporfínicos (Figura 3a), presentes em diversas espécies de Annonaceae, que se subdividem em subclasses e dentre eles estão os oxaporfínicos (Figura 3b), cujo esqueleto é aromático e conta com a presença de um grupo carbonílico no carbono 7 (Silva et al. 2007).

Muitos alcalóides oxaporfínicos apresentam inúmeras atividades biológicas e farmacológicas, como a citotóxica, a antiagregante plaquetária, a antibacteriana, a antifúngica, a antiespasmódica e a antimalárica. Vários integrantes desta subclasse são alvos de patentes, o que gera um crescente interesse por ela. Dentre os compostos

promissores destaca-se é a dicentrinona (Figura 4) que atua na inibição da topoisomerase I (Zanin et al. 2011).

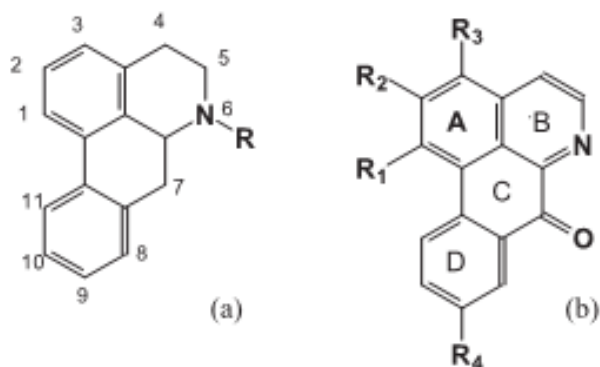


Figura 3 – Estrutura básica do esqueleto de alcalóides aporfínicos (a) e oxaporfínicos (b)

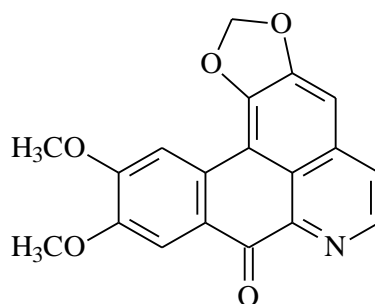


Figura 4 – Estrutura do alcalóide dicentrinona

2.3 Inflamação

Desde os primórdios da civilização desperta interesse, tanto, que Celsus (30 a.C- 36 d.C) foi o responsável pela descrição dos seus sinais cardinais (calor, rubor, tumor e dor). Já em 1858, Virchow acrescentou a esses sinais a perda da função do órgão acometido dessa enfermidade (Ryan and Majno 1977).

O processo inflamatório é uma resposta de adaptação do organismo, a fim de restaurar a homeostase tecidual (Medzhitov 2008). Atua de modo a contribuir com a reparação e regeneração do tecido, à medida que persiste no organismo, age agravando as lesões e se torna prejudicial, podendo contribuir para a cronificação do processo ou da doença (Glass et al. 2010; Esser et al. 2012).

Um dano ao tecido pode desencadear o processo inflamatório, contudo, a resposta inflamatória depende de dois fatores: I – o tipo de estímulo (mecânico, químico, infeccioso ou tumoral); II – o tipo de tecido afetado ou falha no sistema de resolução do organismo (Glass et al. 2010; Alexopoulos and Morimoto 2011)

Os principais eventos da inflamação são os vasculares e os celulares, nos quais ocorrem acúmulos e ativação de células hematopoiéticas (Henson 2005). Os eventos vasculares são caracterizados pela vasodilatação arteriolar e o consequente aumento da permeabilidade microvascular no local afetado (Medzhitov 2008).

Após a ocorrência de dano ao tecido é deflagrado o processo inflamatório, contudo a progressão da inflamação faz com que mediadores inflamatórios sejam liberados, dentre eles os leucotrienos (LT) e as prostaglandinas (PG) dentre esses destacam-se o leucotrieno B₄ (LTB₄) e as prostaglandinas E₂ (PGE₂) e D₂ (PGD₂), responsáveis por manter o processo inflamatório, que pode passar de um estado agudo para um estado crônico, desencadeando a formação de inúmeras doenças crônicas (Serhan et al. 2007).

2.3.1 Eventos vasculares e celulares na inflamação

De modo geral o processo inflamatório agudo tem como base eventos que agem de forma sinérgica e coordenada. Assim, quando ocorre um estímulo, a vasodilatação e o aumento da permeabilidade do vaso. Nesse momento surgem dois sintomas da inflamação aguda: o edema e o rubor. Eles são decorrentes da vasodilatação influenciada pelos mediadores inflamatórios (histamina, prostaglandinas, óxido nítrico, bradicinina, leucotrienos, produtos de ativação do complemento, produtos de ativação da coagulação, substância P e fator de agregação plaquetária), que induzem o aumento do fluxo de sangue e a permeabilidade faz com que o plasma extravase para o tecido, formando um exsudato rico em proteínas (Lichtman 2006; Kumar 2010).

Os mediadores inflamatórios induzem o aumento da permeabilidade vascular, estimulando a contração das células endoteliais que revestem as vênulas pós-capilares, desfazendo a ligação das junções intracelulares e ocasionando a passagem do plasma do interior do vaso para o tecido. Além da transcitose, o aumento da permeabilidade vascular também pode ocorrer em outras situações, como por exemplo, no caso de queimaduras em que a lesão direta ocasiona necrose tecidual, ou quando são formados novos capilares (neovascularização) (Lichtman 2006; Mehta and Malik 2006; Mitchell and Warner 2006).

Substâncias vasoativas tais como: a bradicinina, leucotrienos, produtos de ativação do complemento e da coagulação, substância P e fator de agregação plaquetária (PAF) quando presentes no local inflamado ocasionam o aumento da permeabilidade vascular por diferentes mecanismos o que é dependente dos receptores que são ativados na célula endotelial ou da lesão provocada no vaso (Kleemann 2008; Montuschi 2010).

A bradicinina é um peptídeo composto por nove aminoácidos originada após a ação da enzima calicreína sobre fator de Hageman (fator XII da via intrínseca da coagulação) ocasionando a vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular e a contração da musculatura lisa. Esse peptídeo é ainda um dos principais indutores da dor decorrente de um processo inflamatório (Campbell 2000; Petho 2012).

Os leucotrienos são uma classe de mediadores lipídicos provenientes da ação da enzima 5-lipoxigenase (5-LOX). Os leucotrienos estão relacionados com o desenvolvimento de várias doenças, porém, os efeitos mais estudados destes mediadores reside sobre a asma, e assim como a histamina os leucotrienos causam contração endotelial (Funk 2011). Os receptores de leucotrienos são mais encontrados em células responsáveis pelo sistema imune, que estão relacionadas a doenças infecciosas e inflamatórias (Montuschi 2010).

A substância P é um peptídeo vasoativo que pode ser armazenado no interior de vesículas secretórias, podendo se originar a partir de precursores inativos que se localizam dispersos no plasma como, por exemplo a bradicinina ou ainda ser liberada por neurônios sensoriais causar assim a degranulação mastocitária (Kuhr 2010).

Fator de agregação plaquetária (PAF) é um lipídio biologicamente ativo, que é liberado de diversas células inflamatórias ativadas por meio da fosfolipase A₂, PAF apresenta ações como vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia para leucócitos, ativação dos leucócitos, ativação e agregação das plaquetas e ação espasmogênica para a musculatura lisa. É um mediador em muitos tipos de inflamação e está implicado na hiper-responsividade brônquica e na fase tardia da asma (Rang 2007).

Durante a inflamação, as principais e primeiras células efetoras são os leucócitos. Sua migração até o foco inicial da inflamação é importante para uma resposta inflamatória. Eles atuam secretando compostos citotóxicos inespecíficos, que destroem o agente agressor, porém, causam lesão no tecido. O recrutamento dessas células acontece quando elas interagem com o endotélio e a mediação se dá por moléculas de adesão celular

(CAMs). Tanto os leucócitos quanto os agente invasores que causam lesão vascular direta e extravasamento de fluídos (Ulbrich et al. 2003).

À medida que ocorrem alterações vasculares decorrentes do processo inflamatório instalado, células sanguíneas, principalmente leucócitos polimorfonucleares (PMNS), migram dos vasos sanguíneos para o parênquima tissular, processo que recebe o nome de migração transendotelial ou extravasamento que é composto quatro etapas que ocorrem em seqüência (I) marginação - leucócitos são alojados em uma posição periférica sobre células componentes do tecido endotelial; captura e rolamento- aderência transitória dos leucócitos ao endotélio; (II) adesão - estável união dos leucócitos às células endoteliais; (III) diapedese - passagem dos leucócitos por entre as células endoteliais para o parênquima tissular (Luscinskas et al. 2002; Burns et al. 2003; Simon and Green 2005).

Evidências demonstram que no momento em que ocorre a migração transendotelial as CAMs atuam estimulando a ativação dos leucócitos. Os principais grupos de CAMs envolvidas na migração transendotelial são as selectinas, as integrinas e as imunoglobulinas (Alberts et al. 2002; Simon and Green 2005).

As selectinas são proteínas transmembranas de cadeia única, com um domínio extracelular amino-terminal (N-terminal), tipo lectina que pode ser classificada como: E-selectina (sintetizada e expressa no endotélio), P-selectina sintetizadas e expressas em plaquetas e células endoteliais) e L- selectina sintetizadas e expressas constitutivamente na superfície dos leucócitos (Barkhausen et al. 2005; Langer and Chavakis 2009)

As integrinas são glicoproteínas heterodímeras que se associam de forma não covalente. São proteínas responsáveis pela adesão celular e pela transdução de sinais entre as células. Possuem duas sub-unidades uma denominada α que é composta por aproximadamente 800 aminoácidos e outra denominada β que é composta por aproximadamente 1000 aminoácidos. Assim 18 integrinas α que se combinam a 8 β , totalizando 24 sub-unidades diferentes. A formação de cada heterodimero garante uma especificidade diferente para as integrinas (Noguera-Troise et al. 2006; Ridgway et al. 2006).

As imunoglobulinas são divididas em dois tipos de moléculas responsáveis pela adesão molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular – 1 (VCAM-1), respectivamente responsáveis pela adesão entre as células e a pela adesão entre as células e o vaso. Essas imunoglobulinas interagem diretamente com as integrinas. Uma outra imunoglobulina que também merece destaque dentro da família é a molécula de

adesão plaqueta /endotélio (PECAM-1), em função da sua atuação durante o processo de diapedese (Petri and Bixel 2006; Langer and Chavakis 2009).

2.3.2 Indutores e resolutores inflamatórios

De uma maneira geral, a indução do processo inflamatório pode ser ocasionada por dois tipos de agentes: exógenos ou endógenos. Os indutores exógenos podem ser divididos em microbianos ou não microbianos. Uma das classes dos indutores exógenos microbianos é aquela que está associada a padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) que são reconhecidos por receptores específicos identificados como receptores Toll. A classe, indutores exógenos não microbianos, abrange desde produtos tóxicos, alérgenos até materiais estranhos ao corpo. A presença destes indutores ocasiona a diminuição ou perda da homeostase tecidual, deflagrando então, o processo inflamatório (Medzhitov 2008).

A ação do agente indutor da inflamação se baseia na indução da síntese de vários tipos de mediadores inflamatórios tais como as citocinas, o fator de necrose tumoral (TNF- α) a interleucina-1 (IL-1), as quimiocinas, as aminas vasoativas, os eicosanóides atuam de maneira a ocasionar à modificação do funcionamento de tecidos e órgãos, sobretudo por causa da formação do extravasamento plasmático e da migração leucocitária no foco da inflamação (Paterson et al. 2003; Medzhitov 2008).

A resolução do processo inflamatório ocorre por meio da ação direta de mediadores anti-inflamatórios e pró resolutivos, os quais são produzidos no decorrer do processo. Dentre essas substâncias estão: as prostaglandinas, as lipoxinas, resolvinas e o Fator nuclear kappa B (NF-kB) (Rajakariar et al. 2006).

2.3.3 Mediadores inflamatórios

2.3.3.1 Aminas vasoativas (histamina e serotonina)

A histamina é formada a partir da ação da enzima histidina-carboxilase, que atua sobre a histidina (Liu et al. 2001). Trata-se de uma amina básica de baixo peso molecular, que pode ser encontrada em vários tecidos do organismo, e é responsável pela expansão das arteríolas e pela ampliação da permeabilidade das vênulas (Rang 2007; Thurmond et al. 2008; Kumar 2010).

Em nível celular, a histamina é encontrada principalmente nos mastócitos e basófilos, alojada no interior de grânulos e liberada durante o processo inflamatório, reações alérgicas e na secreção gástrica. As suas funções são exercidas à medida que agem sobre os seus receptores que são quatro tipos H₁, H₂, H₃ e H₄ (Kumar 2010).

Os receptores de histamina pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G. Dentre os efeitos mediados pelo receptor H₁, estão o aumento da permeabilidade vascular a vasodilatação e o estímulo imunológico (Togias 2003). Quanto ao receptor H₂, assim como o H₁, ocorre em várias células e tem ações semelhantes, podendo inibir uma variedade de funções do sistema imune e atuar na musculatura lisa, tanto do útero quanto das vias aéreas (Jutel et al., 2009).

O receptor H₃ é um autorreceptor inibitório localizado nos neurônios, está envolvido em funções cerebrais e no efeito periférico da histamina sobre os mastócitos (Rang 2007). O receptor H₄, da subfamília da histamina, é um receptor acoplado à proteína G e estreitamente relacionado com o receptor H₃. O receptor H₄ é expresso em células hematopoiéticas e imunológicas, suas atividades consistem no recrutamento e ativação de células envolvendo a resposta inflamatória, tais como eosinófilos, mastócitos e neutrófilos (Coge et al. 2001; Nguyen et al. 2001; Leite-de-Moraes et al. 2009).

A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) é uma amina vasoativa resultante da excreção de células enterocromafins. É encontrada nas paredes do intestino e uma vez secretada, a serotonina, é absorvida e retida no interior das plaquetas (Sanger 2008). Quando o endotélio sofre algum tipo de dano são liberados sinais, então, a serotonina é liberada do interior das plaquetas (Jonnakuty and Gagnoli 2008). Além de se localizar nas plaquetas, ela também pode ser encontrada na mucosa intestinal e no sistema nervoso central (SNC) e em roedores (ratos e camundongos) é armazenada também nos mastócitos (Henry and Black 2008).

A formação da serotonina ocorre a partir da aquisição do triptofano (dieta), que é convertido em 5- hidroxitriptofano pela triptofano hidroxilase e, posteriormente, em 5-HT, pela ação da enzima L-aromático descarboxilase (= dopa descarboxilase). No processo inflamatório, a serotonina age como vasodilatadora e aumenta a permeabilidade vascular, dois pontos importantes para a formação do edema originado por estímulos nocivos, após a aplicação de carragenina (Goadsby et al. 2002).

2.3.3.2 Cininas

Em 1949, Rocha relatou uma substância relaxante liberada no plasma, pela ação do veneno de cobra *Bothrops jararaca*, denominada bradicinina (Rocha et al. 1949). A bradicinina pode ser classificada como uma relevante mediadora do sistema calicreína-cininas, pois estimula uma gama de processos fisiológicos, tais como o controle da pressão arterial, a contração e o relaxamento da musculatura lisa no processo inflamatório e nociceptivo (Calixto 2000; Moreau et al. 2005).

A bradicinina é capaz de reproduzir processos característicos inflamatórios como o calor, o rubor, o edema e a dor. Tais sintomas ocorrem pelo fato da bradicinina induzir a liberação de óxido nítrico (NO) das células endoteliais e de prostaciclina. Estes promovem vasodilatação e conseqüentemente, calor e rubor, ao passo que o edema é caracterizado por haver estímulos das células endoteliais (Marceau and Regoli 2004). Essa cinina apresenta ação direta sobre as fibras nervosas e sua atuação se dá através de receptores B₁ cuja expressão é induzida na presença da inflamação e da lesão tecidual, principalmente por ação da IL-1 (Rang 2007).

As cininas, peptídeos vasoativos envolvidos na dor e na inflamação, são provenientes do sistema calicreína-cininas (cininogênios plasmáticos, calicreínas e cininas) (Marceau et al. 1998). Dentre elas cita-se: a bradicinina e a lisil-bradicinina, também conhecida como calidina (Hansen et al. 2001; Dias et al. 2010). As cininas possuem dois tipos de receptores acoplados à proteína G e esses são B₁ e B₂ responsáveis por mediar os efeitos biológicos. O receptor B₁, caracteristicamente não é encontrado em tecidos normais, contudo, sua formação pode ser induzida a partir do momento em que é deflagrado um processo inflamatório (Menke et al. 1994). Já o receptor B₂, por outro lado, é expresso constitutivamente nos tecidos, além de mediar maior parte das respostas agudas induzidas por cininas (MacNeil et al. 1995; Calixto 2000; Leeb-Lundberg et al. 2005).

2.3.3.3 Eicosanóides

Os eicosanóides ou autacóides são as prostaglandinas (PGs), os leucotrienos (LTs), as lipoxinas (LXs) e o citocromo P450 (Harizi et al. 2008). Sua biossíntese depende da disponibilidade de ácido araquidônico (ácido graxo insaturado com 20 átomos de carbono) que é liberado, a partir do momento em que os tecidos são expostos a diferentes

estímulos fisiológicos e patológicos, pelos fosfolipídios de membrana, por meio da ação da enzima fosfolipase A₂ (Greene et al. 2011).

A COX é a enzima que catalisa a conversão do ácido araquidônico em prostaglandina G₂ (PGG₂) e esta por sua vez, em prostaglandina H₂ (PGH₂). A PGH₂ é convertida em uma variedade de eicosanóides que incluem PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ e tromboxanos TXA₂ e TXB (Vane 1971; Dubois et al. 1998). A enzima COX existe em duas isoformas a COX-1 que é expressa na maioria dos tecidos e media funções biológicas basais; e a COX-2 que está geralmente associada a condições patológicas, relacionadas à produção de TXB₂, PGI₂ e PGE₂, respectivamente (Caughey et al. 2001).

Na inflamação, as prostaglandinas PGE₂, PGI₂ e PGD₂ induzem a vasodilatação por agirem em determinados receptores, em conjunto com outros mediadores, como a bradicinina e a histamina, potencializando os efeitos sob a permeabilidade vascular desses dois mediadores. Além disso, as prostaglandinas induzem a febre por atuarem através de receptores presentes no hipotálamo (Glatstein and Scolnik 2008).

Com relação às enzimas lipoxigenases, essas participam no metabolismo dos ácidos graxos poli-insaturados, além de catalisarem a oxidação de uma variedade de eicosanóides (Skrzypczak-Jankun et al. 2012). Existe uma variedade de lipoxigenases (LOX) que podem ser classificadas em: 5-LOX, 12-LOX e 15-LOX. Essas são responsáveis pela produção dos leucotrienos. A via da 5-LOX dá origem a alguns dos mediadores mais potentes, incluindo o leucotrieno B₄ (LTB₄) que é quimioatratante de neutrófilos e agente espasmolítico (Gerritsen 1996).

2.3.3.4 Citocinas

As citocinas fazem parte de outro grupo de mediadores inflamatórios. São secretadas por células inflamatórias (linfócitos, eosinófilos e neutrófilos) e células constituintes teciduais (mastócitos, fibroblastos, células epiteliais e macrófagos), que por sua vez, modulam a função de outros tipos celulares (Becker et al. 2003). As citocinas possuem a função de regular os processos biológicos, tais como o crescimento, a ativação celular, a quimiotaxia, a inflamação, a imunidade, o reparo tecidual, a fibrose e a morfogênese (Nunes et al. 2010).

Diferentes tipos de células secretam a mesma citocina, que pode agir nos mais diversos tipos de células (Rang 2007). Elas se ligam aos receptores específicos e dessa

forma, ativam os mensageiros intracelulares, conseqüentemente, regulam a transcrição gênica, influenciando em fenômenos como a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica. Além disso, as citocinas também regulam a produção e até mesmo a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatória) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória. (Rang 2007; Kumar 2010).

Dentre as citocinas classificadas como pró-inflamatórias, destacam-se as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 e o TNF. Já as citocinas que possuem ação anti-inflamatória são a IL-4, a IL-10, a IL-13 e o fator transformador de crescimento β (FTC β). Quanto aos reguladores de inflamação crônica, destacam-se a interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral - α (TNF- α), estes são produzidos principalmente por macrófagos (Curfs et al. 1997).

A primeira interleucina caracterizada foi a IL-1, primariamente produzida por macrófagos, monócitos, células não imunológicas (como fibroblastos) e células endoteliais ativadas durante uma lesão celular, infecção, invasão ou inflamação. O grupo das interleucinas compreende 11 membros, como por exemplo IL-1 α , a IL-1 β , antagonista de receptor IL-1 (IL-1Ra), a IL-1F5–a IL-1F10 a IL-18 (também conhecida como IL-1F4), e a IL33 (também conhecida como IL-1F11) (Sims and Smith, 2010).

A IL-1 β é uma das mais estudadas, é sintetizada por monócitos e macrófagos e distribuída no organismo (Sims and Smith, 2010). Já a IL-1 α é expressa por queratinócitos e células endoteliais, age a nível local, portanto, se apresenta mais associada nas reações de hipersensibilidade. Ambas são mediadores dos quadros de febre, decorrentes do aumento da produção de PGE₂ pelo endotélio vascular do hipotálamo, como resposta ao estímulo à produção de células T (Ambrus et al. 1991; Appasamy 1993; Baird et al. 1995; Fuchs 2010).

O TNF é conhecido como uma citocina pró-inflamatória multifuncional envolvida em processos fisiológicos e patológicos (Feghali and Wright 1997). O TNF- α (catequina) e o TNF- β (linfotóxina) são membros da família TNF (Han et al. 2012). O TNF induz a ativação dos neutrófilos, da COX-2 e de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6), também aumenta a permeabilidade da camada endotelial e a migração de leucócitos, estimula a proliferação de fibroblastos e a reabsorção óssea, além de produzir degradação da cartilagem (Fernandes et al. 2002).

2.4 Fármacos utilizados na inflamação

Existem relatos escritos há mais de 150 anos sobre a redução da inflamação por meio do uso de extratos de plantas que contenham salicilatos (Dinarello 2007). Felix Hoffman sintetizou o ácido acetilsalicílico (AAS) por meio do uso de ácido salicílico (que pode ser isolado da planta medicinal *Salix alba*). O AAS inibe a ação da COX-1 e 2, reduzindo os níveis de prostaglandinas e tromboxanos (Batlouni 2010)

Atualmente, o AAS é o agente terapêutico mais usado no mundo e pertence à classe dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) (Adcock et al. 2005; Dinarello 2007).

Fármacos classificados como AINE podem ser ou não seletivos para a COX-2 (COXIBE). Além dos agentes clássicos, os anti-inflamatórios esteroidais (AIES) também são amplamente utilizados para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas, mesmo diante dos marcantes efeitos adversos ocasionados, embora os resultados dessas duas classes sejam bons, a utilização constante ocasiona fortes efeitos colaterais (Rang, 2007).

AINE tais como o ibuprofeno, o naproxeno, a indometacina, a nabutenona, o diclofenaco e o AAS, foram desenvolvidos, inicialmente, a fim de inibirem as enzimas COX-1 e COX-2. Entretanto, mesmo havendo evidências sobre a ação anti-inflamatória desses medicamentos, seu uso contínuo demonstrou a formação de efeitos adversos, tais como a dor abdominal e o sangramento gastroduodenal por conta da inibição da COX-1 (Clark et al. 2000). A partir de então, foram sintetizados AINE, cuja inibição é seletiva da COX-2 (COXIBE), possuindo eficácia semelhante a dos AINE mais antigos. Porém, sem os efeitos adversos apresentados pelos primeiros. Contudo, o uso contínuo desses medicamentos demonstrou a ocorrência de problemas cardiovasculares, por este motivo, alguns foram retirados de comercialização (Silverstein et al. 2000; Mitchell 2006).

Os anti-inflamatórios esteroidais, também conhecidos como glicocorticóides (GC), agem de forma principalmente de forma genômica e o processo que tem início à medida que o esteróide de natureza altamente lipofílica atravessa a barreira celular e interage com o receptor GCR (*Glucocorticoid cytosolic receptor*). Dessa interação forma o complexo GC/CR. Uma vez formado o complexo, este é levado ao núcleo celular local, onde se liga às sequências do DNA, estimulando assim, a produção de proteínas com propriedades anti-inflamatórias. O mecanismo genômico leva à formação da trans-ativação e da trans-repressão (Almawi and Melemedjian 2002).

2.5 Modelos experimentais para desenvolvimento de novos medicamentos

Os modelos experimentais auxiliam quanto à elucidação de mecanismos de ação e processos fisiológicos, sendo possível pela sua utilização, um aprofundamento no conhecimento da ação de fármacos na fisiologia e, ainda, na etiopatogenia de diversas doenças. Ultimamente, a importância dos modelos experimentais transcende o âmbito do aprimoramento e comprovação de técnicas e procedimentos já estabelecidos, como também o desenvolvimento de novos protocolos (Ferreira et al. 2005). A síntese dos novos fármacos depende diretamente da implementação de modelos em animais, para que por meio do processo de pesquisa seja possível avaliar a ação dos agentes farmacológicos (Sedgwick and Lees, 1986).

2.5.1 Edema de pata

Modelos animais de inflamação induzida por carragenina (polissacarídeo sulfatado) são utilizados com frequência, oriundo de inúmeras algas vermelhas pertencentes à ordem Gigartinales); em particular, o edema de pata induzido por carragenina é o mais usado, por meio dele é possível mensurar o papel de inúmeros mediadores presentes durante o processo inflamatório, originalmente o modelo foi proposto por Winter et al. (1962) e referia-se apenas a ratos. Em 1969, Levy demonstrou que o modelo poderia ser estendido também ao uso de camundongos, a carragenina também é importante em modelos de nocicepção, uma vez que ocasiona a sensibilização de nociceptores, quando estimulados de forma mecânica ou térmica; além disso, o modelo permite a observação da migração de células e a análise das etapas pertencentes ao processo inflamatório (Zhang et al. 1997; Smith et al. 1998; de Campos et al. 1999; Osborne and Coderre 1999; Pinheiro and Calixto 2002).

A Cg é um polissacarídeo vastamente utilizado como agente irritante na indução da resposta inflamatória aguda, em modelos experimentais animais, atua de modo a induzir a liberação de mediadores inflamatórios, tais como a histamina, bradicinina e prostaglandina. Esse método foi introduzido por Winter em 1962, sendo atualmente amplamente utilizado para teste de drogas e avaliação de novas terapias anti-inflamatórias (Morris 2003).

2.5.2 Bolsa de ar

No presente trabalho observou-se o efeito anti-inflamatório da planta *D. furfuracea* em um modelo de bolsa de ar induzido por carragenina. Neste modelo, a formação da bolsa foi efetuada por meio da injeção, em doses repetidas e durante sete dias, de ar estéril na região dorsal, a cavidade formada induziu uma formação que se assemelha à membrana sinovial (Edwards et al. 1981; Kowanko et al. 1986). Para a realização desse modelo de reação aguda foi utilizada a carragenina (Cg), descrita pela primeira vez por Winter et al. (1962).

2.5.3 Artrite induzida por zimosan

O zimosan consiste em uma formulação insolúvel da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que atua ativando macrófagos e desencadeia uma resposta imunológica à medida que é reconhecido pelos receptores Toll do tipo 2 (TLR2), TLR6 (receptor toll 6), CD14 e dectina-1 (expressa em macrófagos e células dendríticas) (Ozinsky et al. 2000).

Além de outros modelos animais de inflamação foi utilizado o modelo animal de artrite induzida por zimosan (Coelho et al. 2004). Os modelos experimentais que mimetizam a artrite em roedores são importantes à medida que, auxiliam no esclarecimento do mecanismo de ação de doenças que envolvem o sistema imunológico e a inflamação envolvida nessas doenças. Estes modelos são importantes também porque contribuem de forma significativa para a descoberta de agentes terapêuticos úteis no tratamento, sobretudo agentes oriundos de plantas (Ngoc et al. 2005; Coelho et al. 2011). Contudo é importante mencionar que, o modelo experimental tem possui similaridade com a doença em questão, porém, não possui todos os aspectos que envolvem a doença humana, sendo usado para delinear as vias pelas quais a doença é originada (Holmdahl et al. 2001).

2.6 Alvos moleculares para doenças inflamatórias

A síntese de fármacos está diretamente relacionada à interação entre compostos e receptores, logo o centro dos estudos baseia-se desde o reconhecimento dos diferentes receptores até a forma de ação seja ela agonista ou antagonistas sobre estes receptores. Na

década de 90, com o surgimento da Biologia Molecular foram determinados novos alvos moleculares e protocolos para a síntese de fármacos assim possibilitando, a determinação da causa gênica de determinadas patologias e a otimização da procura de alvos moleculares mais seguros para obtenção do mesmo efeito (Yunes et al. 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato, das frações e do composto isolado, dicentrinona, de *Duguetia furfuracea* em modelos experimentais de inflamação.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar a toxicidade aguda do EMDF;

Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato, das frações e do composto dicentrinona obtidos das folhas de *D. furfuracea* nos modelos animais de:

- Edema de pata induzido por carragenina;
- Atividade da mieloperoxidase;
- Bolsa de ar;
- Artrite induzida por zimosan.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adcock, I.M., Cosio, B., Tsaprouni, L., Barnes, P.J., Ito, K., 2005. Redox regulation of histone deacetylases and glucocorticoid-mediated inhibition of the inflammatory response. *Antioxidants & Redox Signaling* 7, 144-152.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. *Molecular biology of the cell*, Garland Science, New York.
- Alexopoulos, G.S., Morimoto, S.S., 2011. The inflammation hypothesis in geriatric depression. *International Journal Geriatric Psychiatry* doi: 10.1002/gps.2672.
- Almawi, W.Y., Melemedjian, O.K., 2002. Negative regulation of nuclear factor-kappaB activation and function by glucocorticoids. *Journal of Molecular Endocrinology* 28, 69-78.
- Almeida, J.R.G.S., Lúcio, A.S.S.C., Barbosa-Filho, J.M., Agra, M.F., Silva, M.S., Cunha, E.V.L., (2007). Alkaloids and a new cinnamate derivative from *Duguetia gardneriana*. *Biochemical Systematics and Ecology* 35, 456–458
- Almeida, J., Facanali, R., Vieira, M.A.R., Marques, M.O.M., Lúcio, A., Lima, E., Agra, M., Barbosa-Filho, J.M., 2010. Composition and Antimicrobial Activity of the Leaf Essential Oils of *Duguetia gardneriana* Mart. and *Duguetia moricandiana* Mart. (Annonaceae). *Journal of essential oil research* 22, 275-278.
- Almeida, J.R., de Lima, J.T., de Oliveira, H.R., de Oliveira, M.R., Meira, P.R., Lucio, A.S., Barbosa Filho, J.M., Quintans Junior, L.J., 2011. Antinociceptive activity of discretamine isolated from *Duguetia moricandiana*. *Natural Product Research* 25, 1908-1915.
- Ambrus, J.L., Jr., Chesky, L., Chused, T., Young, K.R., Jr., McFarland, P., August, A., Brown, E.J., 1991. Intracellular signaling events associated with the induction of proliferation of normal human B lymphocytes by two different antigenically related human B cell growth factors (high molecular weight B cell growth factor (HMW-BCGF) and the complement factor Bb). *The Journal of Biological Chemistry* 266, 3702-3708.
- Appasamy, P.M., 1993. Interleukin-7: biology and potential clinical applications. *Cancer Investigation* 11, 487-499.
- Baird, P.N., D'Andrea, R.J., Goodall, G.J., 1995. Cytokine receptor genes: structure, chromosomal location, and involvement in human disease. *Leukemia and Lymphoma* 18, 373-383.
- Barinas, J.A., Suarez, L.E., 2011. Chemical constituents of *Talauma arcabucoana* (Magnoliaceae): their brine shrimp lethality and antimicrobial activity. *Natural Product Research* 25, 1497-1504.

- Barkhausen, T., Krettek, C., Van Griensven, M., 2005. L-selectin: adhesion, signalling and its importance in pathologic posttraumatic endotoxemia and non-septic inflammation. *Experimental and Toxicologic Pathology* 57, 39-52.
- Barroso, G.M., Guimarães, E.F., Ichaso, C.L.F., Costa, C.G., Peixoto, A.L., 1978. *Annonaceae*. *LTC/EDUSP* 1, 10-11.
- Batlouni, M., 2010. Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cerebrovasculares e renais. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 94, 556-563.
- Becker, H.M.G., Guimarães, R.E.S., Nascimento, E., Becker, C.G., Gonçalves, D.U., Crosara, P.F.T.B., 2003. Perfil de citocinas e tipificação de HLA em pacientes com polipose nasossinusal tolerantes e intolerantes a aspirina. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia* 69, 296-302.
- Boustie, J., Stigliani, J.L., Montanha, J., Amoros, M., Payard, M., Girre, L., 1998. Antipoliiovirus structure-activity relationships of some aporphine alkaloids. *Journal Natural of Product* 61, 480-484.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Brastianos, H.C., Sturgeon, C.M., Roberge, M., Andersen, R.J., 2007. Inhibition of the G(2) DNA damage checkpoint by oliveroline isolated from *Duguetia odorata*. *Journal of Natural Products* 70, 287-288.
- Burns, A.R., Smith, C.W., Walker, D.C., 2003. Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. *Physiological Reviews* 83, 309-336.
- Butler, M.S., 2008. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Natural Product Reports* 25, 475-516.
- Calixto, J.B., 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33, 179-189.
- Calixto, J.B., Siqueira Junior, J.M., 2008. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. *Gazeta Médica da Bahia* 78, 98-106.
- Camacho, M.R., Kirby, G.C., Warhurst, D.C., Croft, S.L., Phillipson, J.D., 2000. Oxoaporphine alkaloids and quinones from *Stephania dinklagei* and evaluation of their antiprotozoal activities. *Planta Med* 66, 478-480.
- Campbell, D.J., 2000. Towards understanding the kallikrein-kinin system: insights from measurement of kinin peptides. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33, 665-677.

- Carollo, C.A., de Siqueira, J.M., Garcez, W.S., Diniz, R., Fernandes, N.G., 2006a. N-Nitrosoanonaína and N-Nitrosoxylopinina, Aporfina Alcalóides de *Duguetia furfuracea*. *Journal of Natural Products* 69, 1222-1224.
- Carollo, C.A., de Siqueira, J.M., 2009. Isolation of a minor nitro-alkaloid from the aerial parts of *Duguetia furfuracea*--Annonaceae. *Natural Products Research* 23, 633-637.
- Carollo, C.A., Hellmann, A.R., 2005. Sesquiterpenóides de óleo essencial de folhas de *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 33, 3-3.
- Carollo, C.A., Hellmann-Carollo, A.R., Siqueira, J.M., Albuquerque, S., 2006b. Alcalóides e um flavonóide de partes aéreas (folhas e galhos) de *Duguetia furfuracea*-Annonaceae. *Journal of the Chilean Chemical Society* 51, 837-841.
- Caughey, G.E., Cleland, L.G., Gamble, J.R., James, M.J., 2001. Up-regulation of endothelial cyclooxygenase-2 and prostanoide síntese por plaquetas. Papel do tromboxano A2. *Journal Biological Chemistry* 276, 37839-37845.
- Chanakul, W., Tuchinda, P., Anantachoke, N., Pohmakotr, M., Piyachaturawat, P., Jariyawat, S., Suksen, K., Jaipetch, T., Nuntasana, N., Reutrakul, V., 2011. Citotóxicos alcalóides de caules, folhas e galhos de *Dasymaschalon blumei*. *Fitoterapia* 82, 964-968.
- Clark, P., Tugwell, P., Bennet, K., Bombardier, C., Shea, B., Wells, G., Suarez-Almazor, M.E., 2000. Injetável de ouro para artrite reumatóide. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, CD000520.
- Coelho, L.S., Felício, L.P., Miranda, C.T., da Silva, E.M., Vale, C.R., Lima, D.C., Duarte, S.R., Ferreira, H.D., Chen Chen, L., Carvalho, S., 2011. Efeitos modulatórios de *Duguetia furfuracea* (A. St. Hil) Benth. e Hook. f. em *Drosophila melanogaster* células somáticas e germinativas. *Genetics Molecular Research* 10, 75-85.
- Coelho, M.G., Sabino, K.C., Dalmau, S.R., 2004. Efeitos imunomodulatórios de infusão de semente de *Pterodon pubescens* em artrite induzida por colágeno. *Clinical and Experimental Rheumatology* 22, 213-218.
- Coge, F., Guenin, S.P., Rique, H., Boutin, J.A., Galizzi, J.P., 2001. Estrutura e expressão do gene humano do receptor de histamina H4. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 284, 301-309.
- Conte Fde, P., Barja-Fidalgo, C., Verri, W.A., Jr., Cunha, F.Q., Rae, G.A., Penido, C., Henriques, M., 2008. Endotelinas modulam a reação inflamatória em artrite induzida por zimosana: participação de LTB4, TNF- α , e CXCL-1. *Journal of Leukocyte Biology* 84, 652-660.
- Craig, C. R., Stitzel, R.E., 2004. *Farmacologia Moderna*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 58-82.

- Criado, P.R., Criado, R.F.J., Maruta, C.W., Machado Filho, C.D.A., 2010. Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: novos conceitos. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 85, 195-210.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis N.G., 2000. Natural products (secondary metabolites). *American Society of Plant Physiologists* 2, 1250-1318.
- Curfs, J.H., Meis, J.F., Hoogkamp-Korstanje, J.A., 1997. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clinical Microbiology Reviews* 10, 742-780.
- da Silva Almeida, J.R.G., Carneiro Lúcio, A.S.S., Barbosa-Filho, J.M., de Fátima Agra, M., da Silva, M.S., da Cunha, E.V.L., de Andrade Uchoa, D.E., Braz-Filho, R., 2007. Alkaloids and a new cinnamate derivative from *Duguetia gardneriana*. *Biochemical Systematics and Ecology* 35, 456-458.
- da Silva, D.B., Tulli, E.C., Militao, G.C., Costa-Lotufo, L.V., Pessoa, C., de Moraes, M.O., Albuquerque, S., de Siqueira, J.M., 2009. The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *Duguetia furfuracea*. *Phytomedicine* 16, 1059-1063.
- de Campos, R.O., Alves, R.V., Ferreira, J., Kyle, D.J., Chakravarty, S., Mavunkel, B.J., Calixto, J.B., 1999. Oral antinociception and oedema inhibition produced by NPC 18884, a non-peptidic bradykinin B2 receptor antagonist. *Naunyn Schmiedebergs Archives Pharmacology* 360, 278-286.
- de Mesquita, M.L., Grellier, P., Mambu, L., de Paula, J.E., Espindola, L.S., 2007. *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. *Journal of Ethnopharmacology* 110, 165-170.
- de Sousa, N.C., de Carvalho, S., Spano, M.A., Graf, U., 2003. Absence of genotoxicity of a phytotherapeutic extract from *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 41, 293-299.
- de Sousa, O.V., Vieira, G.D., de Jesus, R.G.D.P.J., Yamamoto, C.H., Alves, M.S., 2010. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Ethanol Extract of *Annona muricata* L. Leaves in Animal Models. *International Journal Molecular Sciences* 11, 2067-2078.
- De Young, L.M., Kheifets, J.B., Ballaron, S.J., Young, J.M., 1989. 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, 335-341.
- Debourges, D., Roblot, F., Hocquemiller, R., Cavé, A., 1987. N-Oxycodamine, Alcaloïde de *Duguetia spixiana*, Synthèse et Rmn 1H de N-oxydes de Benzyltétrahydroisoquinoléines. *Journal of Natural Products* 50, 852-859.

- Dias, J.P., Talbot, S., Sénécal, J., Carayon, P., Couture, R., 2010. Receptor Enhances the Oxidative Stress in a Rat Model of Insulin Resistance: Outcome in Hypertension, Allodynia and Metabolic Complications. *PLoS One* 5, e12622.
- Dinarello, C.A., 2007. Historical insights into cytokines. *European Journal of Immunology* 37, S34-S45.
- Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., A. Van De Putte, L.B., Lipsky, P.E., 1998. Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB Journal* 12, 1063-1073.
- Edwards, J.C., Sedgwick, A.D., Willoughby, D.A., 1981. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. *Journal Pathology* 134, 147-156.
- Esser, S., Jablonka, R., Heinemann, F.M., Reuter, S., Jaeger, H., Von Krosigk, A., Schenk-Westkamp, P., Schadendorf, D., Horn, P.A., Lindemann, M., 2012. Detection of abacavir hypersensitivity by ELIS pot method. *Inflammation & Allergy Drug Targets* 11, 227-234.
- Fechine, I.M., Navarro, V.R., da-Cunha, E.d.V.L., Silva, M.S., Guilherme S. Maia, J., Barbosa-Filho, J.M., 2002a. Alkaloids and volatile constituents from *Duguetia flagellaris*. *Biochemical Systematics and Ecology* 30, 267-269.
- Fechine, I.M., Lima, M.A., Navarro, V.R., Cunha, E.V.L., Silva, M.S., Barbosa-Filho, J.M., Maia, J.G.S., 2002b. Alcalóides de *Duguetia trunciflora* Maas (Annonaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 12, 17-19.
- Feghali, C.A., Wright, T.M., 1997. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience* 2, d12-26.
- Fernandes, J.C., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., 2002. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 39, 237-246.
- Ferreira, L.M., Hochman, B., Barbosa, M.V.J., 2005. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cirurgica Brasileira* 20, 28-34.
- Fischer, D.C., de Amorim Gualda, N.C., Bachiega, D., Carvalho, C.S., Lupo, F.N., Bonotto, S.V., Alves Mde, O., Yogi, A., Santi, S.M., Avila, P.E., Kirchgatter, K., Moreno, P.R., 2004. In vitro screening for antiplasmodial activity of isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. *Acta Tropica* 92, 261-266.
- Frana, S.A., Suffredini, I.B., 2002. Determinação da atividade citotóxica a artemia de extratos de Annonaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 12, 15-16.
- Fuchs, F.D., Wannmacher, L., 2010. *Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro pp. 325-329.

- Funk, C.D., 2011. Leukotriene Inflammatory Mediators Meet Their Match, *Science Translational Medicine* 3, 66ps3.
- Garcia-Ramallo, E., Marques, T., Prats, N., Beleta, J., Kunkel, S.L., Godessart, N., 2002. Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. *Journal of Immunology* 169, 6467-6473.
- Gerritsen, M.E., 1996. Physiological and pathophysiological roles of eicosanoids in the microcirculation. *Cardiovascular Research* 32, 720-732.
- Glass, C.K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M.C., Gage, F.H., 2010. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140, 918-934.
- Glatstein, M., Scolnik, D., 2008. Fever: to treat or not to treat? *World Journal Pediatric* 4, 245-247.
- Greene, E.R., Huang, S., Serhan, C.N., Panigrahy, D., 2011. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 96, 27-36.
- Han, L., Song, J.H., Yoon, J.H., Park, Y.G., Lee, S.W., Choi, Y.J., Nam, S.W., Lee, J.Y., Park, W.S., 2012. TNF- α and TNF- β Polymorphisms are Associated with Susceptibility to Osteoarthritis in a Korean Population. *Korean Journal Pathology* 46, 30-37.
- Hansen, M.K., O'Connor, K.A., Goehler, L.E., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2001. The contribution of the vagus nerve in interleukin-1beta-induced fever is dependent on dose. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 280, R929-934.
- Harizi, H., Corcuff, J.B., Gualde, N., 2008. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Molecular Medicine* 14, 461-469.
- Henry, T.B., Black, M.C., 2008. Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor) in western mosquitofish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54, 325-330.
- Henson, P.M., 2005. Dampening inflammation. *Nature Immunology* 6, 1179-1181.
- Hoet, S., Stevigny, C., Block, S., Opperdoes, F., Colson, P., Baldeyrou, B., Lansiaux, A., Bailly, C., Quetin-Leclercq, J., 2004. Alkaloids from *Cassipouita filiformis* and related aporphines: antitrypanosomal activity, cytotoxicity, and interaction with DNA and topoisomerases. *Plant Medicine* 70, 407-413.
- Holmdahl, R., Lorentzen, J.C., Lu, S., Olofsson, P., Wester, L., Holmberg, J., Pettersson, U., 2001. Arthritis induced in rats with non-immunogenic adjuvants as models for rheumatoid arthritis. *Immunological Reviews* 184, 184-202.

- Hufford, C., Sharma, A.S., Oguntimein, B.O., 1980. Antibacterial and antifungal activity of liriodenina and related oxoaporphine alkaloids. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 69, 1180-1183.
- Jonnakuty, C., Gagnoli, C., 2008. What do we know about serotonin? *Journal of Cellular Physiology* 217, 301-306.
- Jutel, M., Akdis, M., Akdis, C.A., 2009. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clinical & Experimental Allergy* 39, 1786-1800.
- Kassuya, C.A., Cremoneze, A., Barros, L.F., Simas, A.S., Lapa Fda, R., Mello-Silva, R., Stefanello, M.E., Zamprônio, A.R., 2009. Antipyretic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract, dichloromethane fraction and costunolide from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 124, 369-376.
- Kuhr, F., Lowry, J., Zhang, Y., V Brovkovich, V., Skidgel, R.A., 2010. Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. *Neuropeptides* 44, 145-154.
- Kowanko, I.C., Gordon, T.P., Rozenbils, M.A., Brooks, P.M., Roberts-Thomson, P.J., 1986. The subcutaneous air pouch model of synovium and the inflammatory response to heat aggregated gammaglobulin. *Agents Actions* 18, 421-428.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, J.C., 2010. *Bases patológicas das doenças*, Elsevier, Rio de Janeiro, pp. 302-339.
- Kleemann, R., Zadelaar, S., Kooistra, T., 2008. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovascular Research* 79, 360-376.
- Langer, H.F., Chavakis, T., 2009. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13, 1211-1220.
- Leeb-Lundberg, L.M.F., Marceau, F., Müller-Esterl, W., Pettibone, D.J., Zuraw, B.L., 2005. International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the Kinin Receptor Family: from Molecular Mechanisms to Pathophysiological Consequences. *Pharmacological Reviews* 57, 27-77.
- Leite-de-Moraes, M.C., Diem, S., Michel, M.L., Ohtsu, H., Thurmond, R.L., Schneider, E., Dy, M., 2009. Cutting edge: histamine receptor H4 activation positively regulates in vivo IL-4 and IFN-gamma production by invariant NKT cells. *Journal of Immunology* 182, 1233-1236.
- Lichtman, M.A.W., 2006. *Williams hematology*, McGraw Hill, New York, pp. 355-368.
- Likhitwitayawuid, K., Angerhofer, C.K., Chai, H., Pezzuto, J.M., Cordell, G.A., Ruangrunsi, N., 1993. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the tubers of *Stephania pierrei*. *Journal of Natural Products* 56, 1468-1478.

- Liu, C., Wilson, S.J., Kuei, C., Lovenberg, T.W., 2001. Comparison of human, mouse, rat, and guinea pig histamine H4 receptors reveals substantial pharmacological species variation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 299, 121-130.
- Lorenzi, H., 2000. *Plantas Daninhas do Brasil - Terrestres, Aquáticas, Parasitas e Tóxicas*, 3 ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Luscinskas, F.W., Ma, S., Nusrat, A., Parkos, C.A., Shaw, S.K., 2002. Leukocyte transendothelial migration: A junctional affair. *Seminars in Immunology* 14, 105-113.
- MacNeil, T., Bierilo, K.K., Menke, J.G., Hess, J.F., 1995. Cloning and pharmacological characterization of a rabbit bradykinin B1 receptor. *Biochimica et Biophysica Acta* 1264, 223-228.
- Maia, J.G.S., Andrade, E.H.A., Carreira, L.M.M., Oliveira, J., 2006. Essential Oil Composition from *Duguetia* Species (Annonaceae). *Journal of Essential Oil Research* 18, 60-63.
- Marceau, F., Hess, J.F., Bachvarov, D.R., 1998. The B1 receptors for kinins. *Pharmacological Reviews* 50, 357-386.
- Marceau, F., Regoli, D., 2004. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 845-852.
- Mota, D.M., Silva, M.G.C., Sudo, E.C., Ortún, V., 2008. Uso racional de medicamentos: uma abordagem econômica para tomada de decisões. *Ciência & Saúde Coletiva* 13, 589-601.
- Matos, F.J., 1994. *Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades*, EUFC, Fortaleza, pp. 180-181.
- Matos, M.F., Leite, L.I., Brustolim, D., de Siqueira J.M., Carollo C.A., Hellmann, A.R., Pereira, N.F., da Silva, D.B., 2006. Antineoplastic activity of selected constituents of *Duguetia glabriuscula*. *Fitoterapia* 77, 227-229.
- Medzhitov, R., 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428-435.
- Mehta, D., Malik, A.B., 2006. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiological Reviews* 86, 279-367.
- Menke, J.G., Borkowski, J.A., Bierilo, K.K., MacNeil, T., Derrick, A.W., Schneck, K.A., Ransom, R.W., Strader, C.D., Linemeyer, D.L., Hess, J.F., 1994. Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *The Journal Biological Chemistry* 269, 21583-21586.

- Mesquita, M.L.D., Desrivot, J., Bories, Fournet, A., Paula, J.E.D., Grellier, P., Espindola, L.S., 2005. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100, 783-787.
- Mitchell, J.A., Warner, T.D., 2006. COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* 5, 75-86.
- Moreau, M.E., Garbacki, N., Molinaro, G., Brown, N.J., Marceau, F., Adam, A., 2005. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *Journal Pharmacology Science* 99, 6-38.
- Montuschi, P., Peters-Golden, M.L., 2010. Leukotriene mod- ifiers for asthma treatment. *Clinical and Experimental Allergy* 40, 1732–1741.
- Muhammad, I., Dunbar, D.C., Takamatsu, S., Walker, L.A., Clark, A.M., 2001. Antimalarial, cytotoxic, and antifungal alkaloids from *Duguetia hadrantha*. *Journal of Natural Products* 64, 559-562.
- Navarro, V.R., Sette, I.M.F., Da-Cunha, E.V.L., Silva, M.S., Barbosa-Filho, J.M., Maia, J. G.S., 2001. Alcalóides de *Duguetia flagellaris* Huber (Annonaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 3, 23-29.
- Neto, G.G., Morais, R.G., 2003. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: Um estudo bibliográfico. *Acta Botanica Brasilica* 17, 561-584.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., 2012. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* 75, 311-335.
- Ngoc, P.L., Gold, D.R., Tzianabos, A.O., Weiss, S.T., Celedon, J.C., 2005. Cytokines, allergy, and asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 5, 161-166.
- Nguyen, T., Shapiro, D.A., George, S.R., Setola, V., Lee, D.K., Cheng, R., Rauser, L., Lee, S.P., Lynch, K.R., Roth, B.L., O'Dowd, B.F., 2001. Discovery of a novel member of the histamine receptor family. *Molecular Pharmacology* 59, 427-433.
- Noguera-Troise, I., Daly, C., Papadopoulos, N.J., Coetzee, S., Boland, P., Gale, N.W., Lin, H.C., Yancopoulos, G.D., Thurston, G., 2006. Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* 444, 1032-1037.
- Nunes, F.B., Castro, M.C.M.d., Silva, T.M.D., Araújo, R.N., Becker, H.M.G., Crosara, P.F.T.B., Guimarães, R.E.S., 2010. Perfil de citocinas da polipose nasossinusal na Fibrose Cística comparado com indivíduos sem doenças nasossinusais. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology* 76, 25-28.
- OECD, 2001. Guideline on acute oral toxicity (AOT) environmental health and safety monograph series on testing and adjustment, p. 27.

- Osborne, M.G., Coderre, T.J., 1999. Effects of intrathecal administration of nitric oxide synthase inhibitors on carrageenan-induced thermal hyperalgesia. *British Journal of Pharmacology* 126, 1840-1846.
- Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L., Aderem, A., 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 13766-13771.
- Paterson, H.M., Murphy, T.J., Purcell, E.J., Shelley, O., Kriynovich, S.J., Lien, E., Mannick, J.A., Lederer, J.A., 2003. Injury primes the innate immune system for enhanced Toll-like receptor reactivity. *The Journal of Immunology* 171, 1473-1483.
- Petho, G., Reeh, P.W., Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors, 2012. *Physiological Reviews* 92, 1699-1775.
- Petri, B., Bixel, M.G., 2006. Molecular events during leukocyte diapedesis. *FEBS Journal* 273, 4399-4407.
- Pinheiro, R.M., Calixto, J.B., 2002. Effect of the selective COX-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib in rat acute models of inflammation. *Inflammation Research* 51, 603-610.
- Piornedo R., R., de Souza, P., Stefanello, M.E., Strapasson, R.L., Zampronio, A.R., Kassuya, C.A., 2011. Anti-inflammatory activity of extracts and 11,13-dihydrozaluzanin C from *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa* trunk bark in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 133, 1077-1084.
- Pontes, A.F., Mello-Silva, R., 2005. Annonaceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 23, 71-84.
- Rajakariar, R., Yaqoob, M.M., Gilroy, D.W., 2006. COX-2 in inflammation and resolution. *Molecular Interventions* 6, 199-207.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Gardner, P., 2007. *Farmacologia*, Elsevier, Rio de Janeiro, pp. 320-329.
- Ridgway, J., Zhang, G., Wu, Y., Stawicki, S., Liang, W.C., Chanthery, Y., Kowalski, J., Watts, R.J., Callahan, C., Kasman, I., Singh, M., Chien, M., Tan, C., Hongo, J.A., de Sauvage, F., Plowman, G., Yan, M., 2006. Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature* 444, 1083-1087.
- Rocha, E.S.M., Beraldo, W.T., Rosenfeld, G., 1949. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *American Journal of Physiology* 156, 261-273.

- Rodrigues, V.E.G., Carvalho, D.A., 2001. Levantamento Etnobotânico de Plantas Medicinais no Domínio do Cerrado na Região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia* 25, 102-123.
- Ryan, G.B., Majno, G., 1977. Acute inflammation. A review. *American Journal of Pathology* 86, 183-276.
- Sanger, G.J., 2008. 5-hydroxytryptamine and the gastrointestinal tract: where next? *Trends Pharmacology Science* 29, 465-471.
- Sangalli, A., Vieira, M.C., 2003. Plantas medicinais utilizadas por parte da população de Dourados-MS. *Cerrados* 6, 17-20.
- Santos, D.Y., Salatino, M.L., 2000. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. *Phytochemistry* 55, 567-573.
- Sarker, S.D., Uddin, S.J., Shilpi, J.A., Rouf, R., Ferdous, M.E., Nahar, L., 2007. Neuropharmacological properties of *Xylocarpus moluccensis*. *Fitoterapia* 78, 107-111.
- Sedgwick, A.D., Lees, P., 1986. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. *Agents Actions* 18, 439-446.
- Serhan, C.N., Brain, S.D., Buckley, C.D., Gilroy, D.W., Haslett, C., O'Neill, L.A., Perretti, M., Rossi, A.G., Wallace, J.L., 2007. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *The FASEB Journal* 21, 325-332.
- Sherwood, E.R., Toliver-Kinsky, T., 2004. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* 18, 385-405.
- Silberbauer-Gottsberger, I., 1981/82. O cerrado como potencial de plantas medicinais e tóxicas. *Oréades* 8, 15-30.
- Silva, D.B.D., Tulli, E.C.O., Garcez, W.S., Nascimento, E.A., Siqueira, J.M.D., 2007. Chemical constituents of the underground stem bark of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 18, 1560-1565.
- Silva, M.S.D., Tavares, J.F., Queiroga, K.F., Agra, M.D.F., Barbosa Filho, J.M., Almeida, J.R.G.D.S., Silva, S.A.S.D., 2009. Alcaloides e outros constituintes de *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae). *Química Nova* 32, 1566-1570.
- Silva, C.R., Vieira, P.M., Santos, S.C., Chen-Chen, L., 2012. Assessment of *Duguetia furfuracea* genotoxic and cytotoxic activity in bacteria and mice. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 84, 149-156.
- Silverstein, F.E., Faich, G., Goldstein, J.L., Simon, L.S., Pincus, T., Whelton, A., Makuch, R., Eisen, G., Agrawal, N.M., Stenson, W.F., Burr, A.M., Zhao, W.W., Kent, J.D., Lefkowitz, J.B., Verburg, K.M., Geis, G.S., 2000. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid

- arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *JAMA* 284, 1247-1255.
- Simon, S.I., Green, C.E., 2005. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. *Annual Review of Biomedical Engineering* 7, 151-185.
- Sims, J.E., Smith, D.E., 2010. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature Reviews Immunology* 10, 89-102.
- Skrzypczak-Jankun, E., Jankun, J., Al-Senaidy, A., 2012. Human lipoxygenase: developments in its structure, function, relevance to diseases and challenges in drug development. *Current Medicinal Chemistry* 19, 5122-5127.
- Smith, C.J., Zhang, Y., Koboldt, C.M., Muhammad, J., Zweifel, B.S., Shaffer, A., Talley, J.J., Masferrer, J.L., Seibert, K., Isakson, P.C., 1998. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 13313-13318.
- Tempone, A.G., Borborema, S.E., de Andrade, H.F., Jr., de Amorim Gualda, N.C., Yogi, A., Carvalho, C.S., Bachiega, D., Lupo, F.N., Bonotto, S.V., Fischer, D.C., 2005. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. *Phytomedicine* 12, 382-390.
- Thurmond, R.L., Gelfand, E.W., Dunford, P.J., 2008. The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. *Nature Reviews Drug Discovery* 7, 41-53.
- Togias, A., 2003. H1-receptors: localization and role in airway physiology and in immune functions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 112, S60-68.
- Tulp, M., Bohlin, L., 2004. Unconventional natural sources for future drug discovery. *Drug Discovery Today* 9, 450-458.
- Ulbrich, H., Eriksson, E.E., Lindbom, L., 2003. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 24, 640-647.
- Valter, J.L., Alencar, K.M.C., Sartori, Â.L.B., Nascimento, E.A., Chang, R., Morais, S.A.L.D., Laura, V.A., Yoshida, N.C., Carollo, C.A., Silva, D.B.D., Grassi, R.F., Fabri, J.R., Siqueira, J.M.D., 2008. Variação química no óleo essencial das folhas de seis indivíduos de *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18, 373-378.
- Vane, J.R., 1971. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature: New Biology* 231, 232-235.
- Veiga Junior, V.F., Pinto, A.C., Maciel, M.A.M., 2005. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova* 28, 519-528.

- Veiga Junior, V.F., 2008. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18, 308-313.
- Verpoorte, R., 1998. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today* 3, 232-238.
- Vollhardt, K.P.C.S., Schore, N.E., 2004. *Química Orgânica: estrutura e função*, Bookman, Porto Alegre, pp. 50-53.
- Yunes, R.A., Pedrosa, R.C., Cechinel Filho, V., 2001. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova* 24, 147-152.
- Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W., 1962. Carrageenin-induced edemas in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 111, 544-547.
- Zanin, S.M.W., Miguel, O.G., Montrucchio, D.P., Costa, C.K., Lagos, J.B., Lordello, A.L.L., 2011. *Mudas de Ocotea puberula (Lauraceae): identificação e monitoramento de alcaloides aporfinoídeos*. *Química Nova* 34, 743-747.
- Zhang, Y., Shaffer, A., Portanova, J., Seibert, K., Isakson, P.C., 1997. Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E₂ production. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 283, 1069-1075.

5 ARTIGO**Anti-inflammatory activity of the methanolic extract, fractions and dicentrinone from *Duguetia furfuracea* in mice**

Alexsandra Vila Maior de Souza^a, Magaiver Andrade Silva^a, Anelise Samara Nazari Formagio^c, Cláudia Andréa Lima Cardoso^b, Ana Isabel Neves de Matos^c, Arielle Cristina Arena^a, Maria do Carmo Vieira^c, Candida Aparecida Leite Kassuya^a

^a*Federal University of Grande Dourados, College of Health Science, Dourados, MS, Brazil*

^b*State University of Mato Grosso do sul, Chemistry course, Dourados, MS, Brazil*

^c*Federal University of Grande Dourados, College of Agricultural Science, 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

Plants of the genus *Duguetia*, especially *Duguetia furfuracea* have been used in folk medicine to prepare teas and syrups to treat rheumatism and some species have demonstrated anti-inflammatory activity. However, no data have been published to support the anti-inflammatory ethnopharmacological use. This work aimed to evaluate the acute toxicity of methanolic extract (MEDF) and the anti-inflammatory activity of MEDF, fractions (such as acetate, hexane, chloroform, aqueous fractions) and the dicentrinone obtained from leaves of *D. furfuracea* in experimental models of inflammation. The anti-inflammatory of MEDF and dicentrinone were studied in the following experimental models: carrageenan-induced paw oedema and increase in myeloperoxidase activity, air pouch model, and zymosan-induced arthritis and the acute toxicity in mice. Animals orally treated with MEDF (30-300 mg/kg) were submitted to carrageenan-induced paw oedema reducing significantly the inflammatory parameters such as paw oedema and increase in MPO activity. All tested fraction also inhibited the oedema induced by carrageenan. Phytochemical studies using chloroform fraction revealed the presence of compound dicentrinone. The oral administration of the dicentrinone inhibited both oedema and MPO activity in carrageenan-induced inflammation in mice. In air pouch models of inflammation, MEDF (30-300 mg/kg) and dicentrinone (2.4 mg/kg) inhibited the leukocyte migration and plasmatic extravasation induced by carrageenan in mice. Finally, MEDF (100 mg/kg) did not alter the zymosan-induced arthritis in mice and no signs of toxicological effects were evidenced with dose of 2,000 mg/Kg of MEDF. The results showed that *D. furfuracea* present anti-inflammatory activity in experimental inflammatory models and no signs of toxicity in acute model. However, the presence of alkaloid dicentrinone could be responsible, at least in part, for the observed effects.

Keywords: *Duguetia furfuracea*; inflammation; mice; alkaloid

Introduction

Duguetia (Annonaceae) genus comprises about 89 species, and approximately 50 were found in Brazil (Navarro et al. 2001). These plants were widely distributed in Brazil and Paraguay (Schultes 1990). The chemical study, pharmacological and biological activity of *Duguetia* genus has conducted intensely. *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hill.) Benth. & Hook. f. is popularly known as “araticum-seco” (Lorenzi 2000), and the popular use, the infusion of leaves is used in the treatment of rheumatism and mainly in the treatment of renal colic (Rodrigues and Carvalho 2001) while the powdered seed is also used to treat pediculosis (Silberbauer-Gottsberger 1981/82).

The phytochemical study showed the presence of aporphine alkaloids, duguetine, duguetine- β -N-oxide, N-methyltetrahydropalmatine, dicentrinone (Silva et al. 2009), four flavonoids the leaves (Santos and Salatino 2000), and sesquiterpenes in essential oil from the fresh leaves (Pereira et al. 2003; Carollo and Hellmann 2005). They investigated the antitumoral, trypanocidal and leishmanicidal activities, demonstrated that *D. furfuracea* showed cytotoxicity, and leishmanicidal activity (Coelho et al. 2011; Silva et al. 2012). In the other side, duguetine and duguetine- β -N-oxide caused considerable antitumoral activity in all cell lines evaluated, although duguetine was more active against trypomastigote forms than other alkaloids tested (Mesquita 2005).

Alkaloids compounds are common in Annonaceae family and some derivatives were isolated from *Duguetia* genus (Leboeuf et al. 1980). The aporphine alkaloids demonstrate antibacterial, antifungal activities (Hufford et al. 1980), antiviral activity (Boustie et al. 1998), cytotoxic activity (Hoet et al. 2004), antimalarial activity (Likhitwitayawuid et al. 1993), leishmanicidal activity (Rodrigues and Carvalho 2001), trypanocidal activity (Hoet et al. 2004) and for the treatment of Parkinson's disease (Zhang and An 2007).

In the present study we evaluated the ability of methanolic extract, fractions and alkaloid dicentrinone the *D. furfuracea* for anti-inflammatory activity in some experimental models of inflammation.

Materials and methods

Animals

The experiments were conducted using male (Carrageenan-induced paw oedema, determination of myeloperoxidase (MPO) activity and air pouch model) and female (Acute toxicity) *Swiss* mice (18-22g, n=6) 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 ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). The animals were acclimatized to the experimentation room for at least 2 h before testing and were used only once throughout the experiments. 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 UNIGRAN (Nbr. 109/10).

Chemical, kits and reagents

λ -Carrageenan, phosphate-buffered saline (PBS), Tween 20%, dexamethasone, and zymosan were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Plant material

Leaves of *D. furfuracea* were collected in May 2010 in Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. The plant was identified by Dr. Zefa Valdevina Pereira and a voucher specimen (DDMS166) was deposited in the herbarium of the Faculty of Biological and Sciences, Federal University of Grande Dourados (UFGD), Mato Grosso do Sul, Brazil.

Extraction and isolation of the chemical constituents

Leaves of *D. furfuracea* (960 g) were exhaustively extracted by maceration with methanol at room temperature. The solvent was then eliminated by a rotary vacuum evaporator under reduced pressure and lyophilized, afforded the methanol extract (40.8 g). Part of this extract (31.0 g) was dissolved in MeOH–H₂O 1:1 and partitioned with n-hexane, chloroform and ethyl acetate. The solvents were evaporated to give the hexane (HF, 4.3 g), chloroform (CF, 6.9 g), ethyl acetate (EAF, 10.5 g), and hydromethanol (HMF, 8.6 g) fractions. The chloroform fraction (3.5 g) was fractionated on a chromatographic column of silica gel and eluted with a mixture of CHCl₃: MeOH, in increasing polarity, to give twenty-three sub-fractions (DF-1 to DF-23). Part of sub-

fraction DF-10 (634 mg) was purified on CCDP using mixture of CHCl_3 :MeOH 30% as solvent furnished dicentrinone (DF1) (Fig. 1).

Phytochemical analysis

The isolated compound was identified by analysis of their NMR data. NMR measurements were carried out on a Varian Mercury Plus BB spectrometer operating at 300 MHz for ^1H and 75.5 for ^{13}C , using CDCl_3 as solvent and tetramethylsilane (TMS) as internal standard. The structures of dicentrinone were elucidated by comparison of their NMR data with those reported in the literature (Cava and Venkateswarlu 1971).

Phytochemical screening of the methanolic extract and chloroform fraction by LC-MS

The constituents of extract methanolic and chloroform fraction obtained from *D. furfuracea* were analyzed by LC-MS. The sample was analyzed on an analytical LC (Varian) system with a ternary solvent delivery system equipped with an autosampler, a photodiode array detector (PDA) and mass spectrometric detector (MS) (Brucker) (Bremen, Germany). The MS system (Brucker) consisted of quadrupole spectrometer. The mass spectrometer was run in positive as well as negative ionization mode using electrospray ionization (ESI) with mass to charge (m/z) ratio in the range of m/z 60-1000. The LC column was a C-18 (25 cm \times 4.6 mm; particle size, 5 μm) (Luna, Phenomenex, Torrance, CA, USA), with a small pre-column (2.5 cm \times 3 mm) containing the same packing, used to protect the analytical column. The flow rate of 1.0 mL/min and injected volume of 10 μL were used for each analysis. All chromatographic analyses were performed at 25 $^\circ\text{C}$. Elution was carried out using the following solvent-gradient formic acid 0.1%: acetonitrile (80:20, v / v) taking 35 minutes to reach 35 % formic acid 0.1% and 65% acetonitrile, then returning in exactly 5 minutes to the initial conditions (Fig. 2).

Phytochemical analysis

The analysis of chromatogram the lyophilized extracts for LC_MS exhibited the major peaks at retention times of 20.5 minutes for dicentrinone (1) (m/z 350), 23.4 minutes for duguetine (2) (m/z 370), and 34.3 minutes for N-methylglucine (3) (m/z 385) (Fig. 7).

The analysis the chloroform fraction showed dicentrinone (1). Other works were also reported the presence of these compounds in the extracts from the *D. furfuracea* (Silva et al. 2007).

The chloroform fraction was purified on CCDP till alkaloid exhaustion and was monitored by means of the Dragendorff's reagent test., affording dicentrinone (2) (8.9 mg), as crystals. ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃): 8.47 (1H, d *J*= 7,2Hz); 7.55 (1H, d *J*=7,2Hz); 7.59 (1H, s); 7.58 (1H, s), 6.15 (1H, s); 6.08 (2H, sl); 3.81 (3H, s), 3.84 (3H, s). ¹³CNMR (75 MHz, CDCl₃): 180.4, 154.2, 152.3, 149.7, 149.4, 143.7, 142.9, 136.1, 128.9, 124.8, 124.3, 122.7, 121.5, 109.1, 108.8, 102.5, 102.4, 55.7, 55.6.

Carrageenan-induced paw oedema

Different groups of mice (n: 6) were orally treated (60 minutes before carrageenan injection) with MEDF (30, 100 and 300 mg/Kg), acetate fraction (4 mg/Kg), hexane fraction (5 mg/Kg), chloroform fraction (4 mg/Kg), aqueous fraction (87 mg/Kg), dicentrinone (2.4 mg/Kg) or vehicle. Another groups of mice were treated subcutaneously with the anti-inflammatory drug dexamethasone (1 mg/Kg, 30 minutes before carrageenan injection) or by topical administration (10 and 30 µg/paw, 15 minutes before carrageenan injection) of dicentrinone. After treatments, the animals received a 50 µL s.c. injection into the right hind paw of carrageenan (300 µg/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 plethysmometer (LE 7500, Pamlab, Spain) 1h before any treatment and at different time points (0.5, 1, 2, 4) after the injection of carrageenan. Results were expressed in µL and the difference between basal and post-injection values quantified as oedema (Kassuya et al. 2009).

Determination of myeloperoxidase (MPO) activity

To investigate whether oral treatment with extract, and compounds or vehicle could affect the cellular migration induced by carrageenan the myeloperoxidase activity was measured into the mouse paw. Animals from experiments of carrageenan-induced paw oedema were euthanized 6 h after carrageenan injection, the described before (De Young et al. 1989). 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 µL) of each supernatant were mixed with 100 µL of phosphate buffer 80 mM, 85 µL of phosphate buffer 0.22 M and 15 µL of 0.017% H₂O₂ on a 96-well plate. The reaction was triggered with 20 µL 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 µL of sodium acetate 1.46 M, pH 3.0. The enzymatic activity was determined by measuring the optical density at 630 nm and it was expressed as mOD per mg of protein.

Air pouch model

Air Pouch model was performed as described by (Garcia-Ramallo et al. 2002; Piornedo et al. 2011), with some modifications. Swiss mice (n: 6) were briefly anesthetized with ketamine and xylazine and 4 mL of sterile air was injected s.c in the back of mice, on day 0. On day 3, a second injection of 2 mL of sterile air was performed into the preformed pouch. On day 6, animals were treated with vehicle, DEX (1 mg/kg s.c.) as positive control drug, MEDF (30, 100, 300 mg/kg, p.o), dicentrinone (2.4 mg/kg) and one hour later the inflammatory response was induced by a injection of a solution of carrageenan 0.1% directly into the pouch. Four hours after the inflammatory stimulus mice were euthanized and the pouches were washed with 1 mL of PBS/EDTA 10mM. Exudates were collected and total cells were counted on Neubauer chamber under light microscopy. Exsudates were then centrifuged at 1000 g for 2 min at 4 °C and the pellet suspended in 1 ml of 3 % albumin and added to previously prepared slides. Cells were stained by May-Gruenwald-Giemsa method and analyzed under light microscopy and 100 cells were counted. The supernatant obtained after exsudate centrifugation as described above was used to evaluate protein leakage to the inflammatory site. Protein levels were measured in the supernatants by Bradford's reaction (Bradford 1976).

Induction of joint inflammation

Different groups of mice were orally treated with MEDF (100 mg/kg) or vehicle. Another group of mice were treated subcutaneously with the anti-inflammatory drug dexamethasone (1 mg/kg). Joint inflammation was induced by intra-articular (i.art.)

injection of zymosan (500 µg per cavity in 25 µL sterile saline) by inserting a 27.5 G needle through the suprapatellar ligament into the left knee joint cavity, as previously described (Penido et al. 2006; Conte et al. 2008). Control animals received an i.art. injection of an equal volume of sterile saline.

Acute toxicity

The acute toxicity of MEDF was determined by using female *Swiss* mice (25–35 g) which were maintained under the standard conditions. The animals (n= 5 per group) were fasted 12 h prior to the experiment. Animals were administered with single dose of MEDF at a dose of 2000 mg/kg and 5000 mg/Kg observed for their mortality during 2 and 7 days study period toxicity (OECD 2001; Kumar 2010).

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 $p < 0.05$.

Results

Effects of oral MEDF on carrageenan-induced paw oedema and increase in MPO activity

The injection of carrageenan in the paw induced an oedema that peaked at 2 h (Fig. 3a). The oral treatment with MEDF (100 and 300 mg/kg) significantly inhibited oedema formation. The inhibitions were of $58 \pm 8\%$ and $53 \pm 8\%$ at doses of 100 and 300 mg/kg, respectively (Fig. 3a). In addition, the inhibition observed in dexamethasone-treated group was $55 \pm 8\%$ after 2 h of the injection of carrageenan in the paw (Results not shown).

The injection of carrageenan (300 µg/paw) increased about 20 X the MPO activities after 6 hours. The oral treatment with MEDF with dose of 30 mg/Kg, but not, 100 and 300 mg/Kg, altered significantly the increasing of MPO activity induced by carrageenan. The Fig. 3b showed that oral treatment with dose of 30 mg/Kg of MEDF inhibited about $39 \pm$

7% in the MPO activity. The positive control (dexamethasone) was able to induce inhibitory activity in MPO analysis when compared to control group with reduction of $79 \pm 3\%$ (Fig. 3b).

Effects of MEDF on carrageenan-induced leukocytes migration and plasma leakage to air pouches

In the 6th day, after induction of air pouch in dorsal region of mice, was applied carrageenan injection (350 μL at 0.1%), which in 4h, promoted a plasma leakage and leukocyte migration, principally by polymorphonuclear leukocytes (Fig. 4a). The results were expressed as leukocytes $\times 10^7$ and plasma leakage in mg of proteins/mL. The oral treatment of all tested doses of MEDF significantly inhibited the leukocyte migration to air pouches in $60 \pm 8\%$ (30 mg/kg), $74 \pm 5\%$ (100 mg/kg), $62 \pm 2\%$ (300 mg/kg). In plasma leakage, only the dose of 300 mg/kg significantly inhibited this process, the percent of inhibition was $37 \pm 5\%$ (Fig. 4b). Dexametasone used as positive control, reduced about $78 \pm 8\%$ the leucocytes migration and plasma leakage.

Effects of fractions of MEDF and dicentrinone on carrageenan-induced paw oedema

The MEDF was fractionated and four fractions were obtained. All fractions were able to inhibited the carrageenan induced oedema. The observed inhibitions were $78 \pm 2\%$ for acetate fraction (4 mg/kg), $88 \pm 3\%$ for hexane fraction (5 mg/kg), $86 \pm 5\%$ for chloroform fraction (4 mg/kg) and $64 \pm 2\%$ for aqueous fraction (87 mg/kg) (Figure 5a). The oral administration (2.4 mg/kg) $40 \pm 2\%$ and topical administration 10 and 30 $\mu\text{g}/\text{paw}$ $49 \pm 9\%$ and $50 \pm 2\%$ respectively (Figure 5b), of dicentrinone obtained from chloroform fraction of *D. furfuracea* was able to inhibited the carrageenan oedema.

Effects of oral dicentrinone isolated from chloroform fraction on carrageenan-induced leukocytes migration and plasma leakage to air pouches

The alkaloid dicentrinone inhibited both leukocyte migration as well as plasmatic leakage induced by carrageenan in the pouches, with inhibitions of $69 \pm 5\%$ and $43 \pm 7\%$, respectively, when animals were treated with dose of 2.4 mg/kg by oral route (Fig. 6a; 6b).

Effects of MEDF on zymosan-induced articular inflammatory response

According to previous results (Conte et al. 2008) zymosan injection induced a significant articular inflammatory response that was characterized by marked articular oedema formation with six time increase in knee diameter of control group in relation to naive group (Fig. 6) (Penido et al. 2006). The results showed that pretreatment with MEDF failed to reduce zymosan induced oedema formation while subcutaneous treatment with dexamethasone group inhibited the oedema formation in $59 \pm 7\%$ (Fig. 7).

Acute toxicity studies

The animals treated with high doses of *D. furfuracea* extract no presented the signals of toxicity analysed. Mortality, macroscopic tissue injury, weight loss and also changes in behavior were not observed in animals.

Discussion

The results of the present study did show that the extract, chloroform fraction obtained from *D. furfuracea* (Annonaceae), a plant popularly used against rheumatisms in Brazil and others inflammatory disease, were able to reduce the parameters of inflammation, after oral administration. Dicontrinone was isolated and identified from the active chloroform fraction *D. furfuracea* and when dicentrinone was assayed showed efficacy against inflammatory parameters such as oedema, leukocyte migration, plasmatic extravazation. Furthermore, the anti-inflammatory effect of the crude extract and chloroform fraction is associated with levels of the alkaloid dicentrinone, a alkaloid previously identified in subterranean stem bark (Silva et al. 2009) in *D. furfuracea*, and also found in other plants, such as *Dasymaschalon blumei* (Chanakul et al. 2011), *Talauma arcabucoana* (Barinas and Suarez 2011), *Stephania dinklagei* (Camacho et al. 2000), *Mitrephora maingayi* (Yu et al. 2005), among others species.

Carrageenan models of inflammation were used for the discovery of new anti-inflammatory drugs or to validate the anti-inflammatory action of medicinal plants. To analise indirect migration of neutrophils we can measure myeloperoxidase activity (De Young et al., 1989). As *D. furfuracea* extract reduced significantly, in dose dependent

manner, the oedema formation, as well as myeloperoxidase, it could be suggest that this extract exhibit anti-oedematogenic and anti-inflammatory activity. These properties could contribute, at least in part, to validate, anti-rheumatism use of this plant in the popular medicine.

Once MEDF anti-inflammatory properties is observed, the extract was fractionated in four fraction. Acetate, hexane, chloroform, and hydromethanolic fractions inhibited the oedema formation induced by carrageenan which suggests that fractions possess compounds that potentially should be studied as anti-inflammatory. The chloroform fraction also had inhibitory effect on oedema formation, and it was decided to focus our phytochemical studies, initially, in this fraction. Phytochemical studies showed that *D. furfuracea* presents as major components such as the aporphine alkaloids, flavonoids and sesquiterpenos (Santos and Salatino 2000; Silva et al. 2009). In the present study, the analysis of chromatogram the lyophilized extracts for LC-MS revealed the presence of the alkaloid dicentrinone and the purification and identification (Silva et al. 2007) was performed in the present study.

It has been described that several alkaloids and alkaloids-rich fractions present beneficial effects against inflammatory and pain diseases, nevertheless, the anti-inflammatory effects of dicentrinone have never been described. Thus, this is the first study showing that oral administration of dicentrinone reduces the inflammatory parameters of mice, suggesting that this alkaloid is the main responsible for the anti-inflammatory effects of MEAG and chloroform fraction obtained from *D. furfuracea*.

Another important model of experimental inflammation is air pouch model. The carrageenan air pouch model is characterized by cellular influx and protein extravasation, and has been used to examine the effects of anti-inflammatory compounds. MEDF inhibited leukocyte migration and, in dose dependent manner, the protein extravasation. When dicentrinone was assayed both experimental inflammatory parameters were inhibited in low dose oral tested. These results showed that dicentrinone and MEAG are effective against cellular influx and protein extravasation.

The popular uses of *D. furfuracea* against rheumatism (Rodrigues and Carvalho 2001) could involve the treatment of rheumatic diseases. For example, many treatments are used to treat inflammation associated with rheumatoid arthritis. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and traditional anti-rheumatic induce adverse effects when used for a long time and maybe are not effective in some patients. In acute arthritis induced

by zymosan in the mice knee some aspects such as oedema formation, migration of inflammatory cells into the joint cavity, and the release of proinflammatory mediators could be evaluated. Zymosan is obtained from fungi *Saccharomyces cerevisiae*, and the oedema formation was not inhibited by MEDF.

Preparations obtained from *D. furfuracea* are continuously self-administered as a phytomedicine in the population of Mato Grosso do Sul. Although neither *D. furfuracea* nor dicentrinone have been chronically administered in our experiments. Our study is a pioneering study showing that in toxicological studies no evidence of toxicological signs was verified in dose of 2000 mg/Kg of crude extract of *D. furfuracea* indicated a very low toxicity of extract and this alkaloid.

This research supports and extends the ethnomedicinal use of plant as anti-inflammatory. Dicentrinone was isolated and identified from the active fraction of *D. furfuracea*. Then the activity of *D. furfuracea* seems to be associated to the presence of the dicentrinone.

Acknowledgements

We are grateful to Fundect and CNPq for fellowships for financial support. The authors are grateful to Dra. Zefa Valdevina Pereira (Faculdade de Ciências Biológicas e Ambiental – UFGD, Dourados-MS) for botanical identification of plant material and Dra. Anelise Samara Nazari Formagio (Faculdade de Ciências Agrônômicas – UFGD, Dourados-MS) for technical support.

References

- Barinas, J.A., Suarez, L.E., 2011. Chemical constituents of *Talauma arcabucoana* (Magnoliaceae): their brine shrimp lethality and antimicrobial activity. *Natural Products Research* 25, 1497-1504.
- Boustie, J., Stigliani, J.L., Montanha, J., Amoros, M., Payard, M., Girre, L., 1998. Antipoliavirus structure-activity relationships of some aporphine alkaloids. *Journal Natural of Products* 61, 480-484.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Camacho, M.R., Kirby, G.C., Warhurst, D.C., Croft, S.L., Phillipson, J.D., 2000. Oxoaporphine alkaloids and quinones from *Stephania dinklagei* and evaluation of their antiprotozoal activities. *Plant Medicine* 66, 478-480.
- Carollo, C.A., Hellmann, A.R., 2005. Sesquiterpenoids from the essential oil from leaves of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 33, 3-3.
- Cava, M.P., Venkateswarlu, A., 1971. Dehydroocopodine, dicentrinone, and other alkaloids from *Ocotea macropoda* and *Hermandia jamaicensis*. *Tetrahedron* 27, 2639-2643.
- Chanakul, W., Tuchinda, P., Anantachoke, N., Pohmakotr, M., Piyachaturawat, P., Jariyawat, S., Suksen, K., Jaipetch, T., Nuntasae, N., Reutrakul, V., 2011. Cytotoxic alkaloids from stems, leaves and twigs of *Dasymaschalon blumei*. *Fitoterapia* 82, 964-968.
- Coelho, L.S., Felicio, L.P., Miranda, C.T., da Silva, E.M., Vale, C.R., Lima, D.C., Duarte, S.R., Ferreira, H.D., Chen Chen, L., Carvalho, S., 2011. Modulatory effects of *Duguetia furfuracea* (A. St. Hil) Benth. and Hook. f. in *Drosophila melanogaster* somatic and germinative cells. *Genetics Molecular Research* 10, 75-85.
- Conte F., P., Barja-Fidalgo, C., Verri, W.A., Jr., Cunha, F.Q., Rae, G.A., Penido, C., Henriques, M., 2008. Endothelins modulate inflammatory reaction in zymosan-induced arthritis: participation of LTB₄, TNF- α , and CXCL-1. *Journal of Leukocyte Biology* 84, 652-660.
- De Young, L.M., Kheifets, J.B., Ballaron, S.J., Young, J.M., 1989. 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, 335-341.
- Garcia-Ramallo, E., Marques, T., Prats, N., Beleta, J., Kunkel, S.L., Godessart, N., 2002. Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. *The Journal of Immunology* 169, 6467-6473.
- Hoet, S., Stevigny, C., Block, S., Opperdoes, F., Colson, P., Baldeyrou, B., Lansiaux, A., Bailly, C., Quetin-Leclercq, J., 2004. Alkaloids from *Cassytha filiformis* and related aporphines: antitrypanosomal activity, cytotoxicity, and interaction with DNA and topoisomerases. *Plant Medicine* 70, 407-413.
- Hufford, C., Sharma, A.S., Oguntimein, B.O., 1980. Antibacterial and antifungal activity of liriodenina and related oxoaporphine alkaloids. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 69, 1180-1183.
- Kassuya, C.A., Cremoneze, A., Barros, L.F., Simas, A.S., Lapa Fda, R., Mello-Silva, R., Stefanello, M.E., Zamprônio, A.R., 2009. Antipyretic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract, dichloromethane fraction and costunolide from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 124, 369-376.

- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, J.C., 2010. Bases patológicas das doenças, Elsevier, Rio de Janeiro, pp. 320-323.
- Leboeuf, M., Cavé, A., Bhaumik, P.K., Mukherjee, B., Mukherjee, R., 1980. The phytochemistry of the annonaceae. *Phytochemistry* 21, 2783-2813.
- Likhitwitayawuid, K., Angerhofer, C.K., Chai, H., Pezzuto, J.M., Cordell, G.A., Ruangrunsi, N., 1993. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the tubers of *Stephania pierrei*. *Journal Natural of Products* 56, 1468-1478.
- Lorenzi, H., 2000. Plantas Daninhas do Brasil - Terrestres, Aquáticas, Parasitas e Tóxicas. Instituto Plantarum, Nova Odessa, pp.62-68.
- Mesquita, M.L.D., Desrivot, J., Bories, Fournet, A., Paula, J.E.D., Grellier, P., Espindola, L.S., 2005. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100, 783-787.
- Navarro, V.R., Sette, I.M.F., Da-Cunha, E.V.L., Silva, M.S., Barbosa-Filho, J.M., Maia, J. G.S., 2001. Alcalóides de *Duguetia flagellaris* Huber (Annonaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 3, 23-29.
- OECD, 2001. Guideline on acute oral toxicity (AOT) environmental health and safety monograph series on testing and adjustment, p. 27.
- Penido, C., Conte, F.P., Chagas, M.S., Rodrigues, C.A., Pereira, J.F., Henriques, M.G., 2006. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. *Inflammation Research* 55, 457-464.
- Pereira, N.F.G., Carollo, C.A., Garcez, S., Siqueira, J.M., 2003. Novel santalane sesquiterpenoids from the stem bark of *Duguetia glabriuscula*-Annonaceae. *Química Nova* 26, 512-516.
- Piornedo R., R., de Souza, P., Stefanello, M.E., Strapasson, R.L., Zampronio, A.R., Kassuya, C.A., 2011. Anti-inflammatory activity of extracts and 11,13-dihydrozaluzanin C from *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa* trunk bark in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 133, 1077-1084.
- Rodrigues, V.E.G., Carvalho, D.A., 2001. Levantamento Etnobotânico de Plantas Mediciniais no Domínio do Cerrado na Região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia* 25, 102-123.
- Santos, D.Y., Salatino, M.L., 2000. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. *Phytochemistry* 55, 567-573.
- Silberbauer-Gottsberger, I., 1981/82. O cerrado como potencial de plantas medicinais e tóxicas. *Oréades* 8, 15-30.
- Silva, C.R., Vieira, P.M., Santos, S.C., Chen-Chen, L., 2012. Assessment of *Duguetia furfuracea* genotoxic and cytotoxic activity in bacteria and mice. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 84, 149-156.
- Silva, D.B.D., Tulli, E.C.O., Garcez, W.S., Nascimento, E.A., Siqueira, J.M.D., 2007. Chemical constituents of the underground stem bark of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 18, 1560-1565.
- Silva, D.B.D., Tulli, E.C., Militao, G.C., Costa-Lotufo, L.V., Pessoa, C., de Moraes, M.O., Albuquerque, S., de Siqueira, J.M., 2009. The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *Duguetia furfuracea*. *Phytomedicine* 16, 1059-1063.
- Schultes, R.E., Raffauf, R.F., 1990. The Healing Forest: Medicinal and toxic plants of the north west Amazonia. Dioscorides Press, Portland, pp.484.
- Yu, R., Li, B.G., Ye, Q., Zhang, G.L., 2005. A novel alkaloid from *Mitrephora maingayi*. *Natural Products Research* 19, 359-362.

Zhang, J.M., An, J., 2007. Cytokines, inflammation, and pain. *International Anesthesiology Clinics* 45, 27-37.

Legends to figures

Fig. 1 – Chemical structure of dicentrinone (DF-1).

Fig. 2 - LC-MS chromatogram of the methanolic extract of *D. furfuracea* leaves (a); LMS chromatogram of the chloroform fraction of *D. furfuracea* (b).

Fig. 3 – Effect of oral administration of MEDF on carrageenan-induced paw oedema in mice. Animal received MEDF (30, 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 dose response inhibition induced by 30,100 and 300 mg/kg MEDF and DEX is shown in oedema. In (b), the dose response inhibition induced by 30,100 and 300 mg/kg MEDF and DEX is shown in increasing of myeloperoxidase (MPO) activity induced by local injection of carrageenan. The bars express the mean ± SEM of 6-7 animals, compared with vehicle (V) vs treated group. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls.

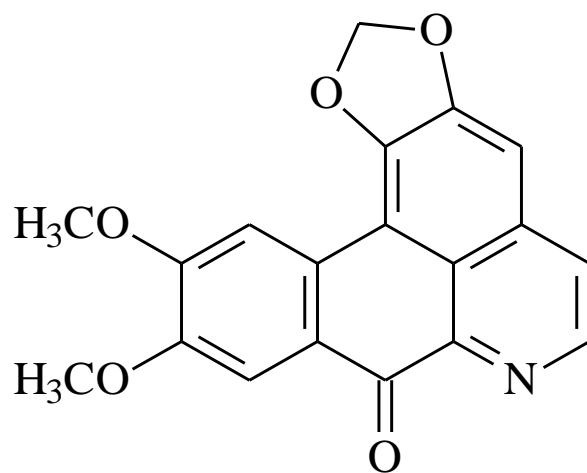
Fig. 4 – Effect of MEDF on carrageenan-induced leukocyte migration and plasma leakage into the air pouch. Mice were pretreated one hour before with MEDF (30, 100 and 300 mg/kg p.o.), dexamethasone (1 mg/kg, s.c. in sterile saline) or filtered water (vehicle). Pouches were washed with PBS/EDTA 10mM. Cells were counted and plasma leakage was analyzed. In A, number of cells that migrates to the pouches 4 hours after carrageenan. Results are expressed as cell 10^6 /cavity. In B, plasma leakage was measured by Bradford's reaction, results are expressed as protein/mg-1 of protein compared with vehicle (V) vs treated group. The bars express the mean ± SEM of 6 animals, compared with vehicle (V) vs treated group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls. +, denote statistical difference ($P < 0.05$) between naïve (N) and vehicle group.

Fig. 5 – Effect of oral administration of acetate fraction, hexane fraction, chloroform fraction, aqueous fraction (A) and oral and topical administration dicentrinone (B) obtained from MEDF on carrageenan-induced paw oedema in mice. Animal received acetate fraction (4 mg/kg), hexane fraction (5 mg/kg), chloroform fraction (4 mg/kg), aqueous fraction (87 mg/kg), dexamethasone (DEX – 1 mg/kg, s.c), dicentrinone or vehicle and

after, an intraplantar injection of carrageenan (300 µg/paw) was performed. The bars express the mean ± SEM of 6-7 animals, compared with vehicle (V) vs treated group. * $P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls.

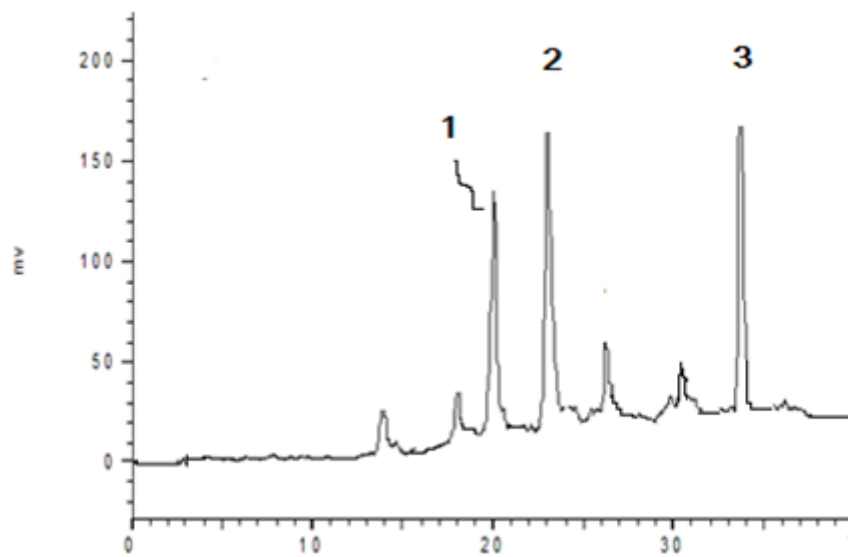
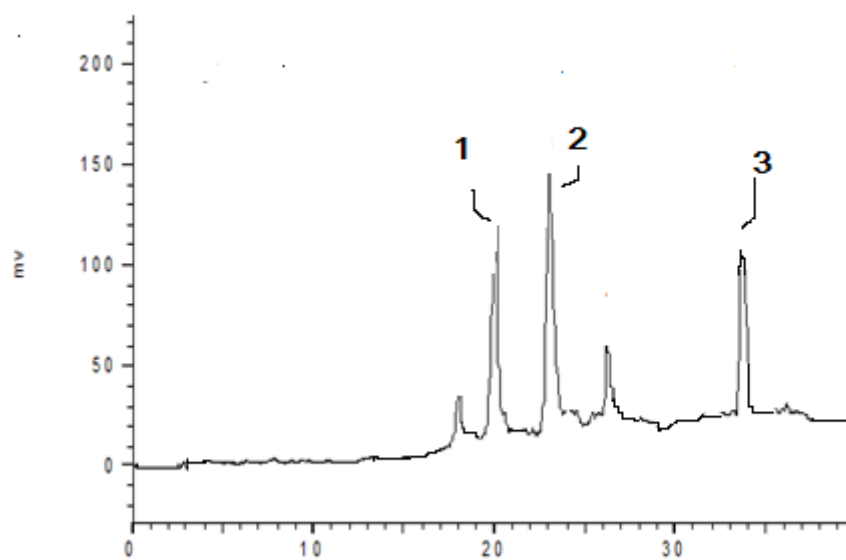
Fig. 6 - Effect of dicentrinone on carrageenan-induced leukocyte migration and plasma leakage into the air pouch. Mice were pretreated one hour before with alkaloid dicentrinone (2.4 mg/kg p.o.), dexamethasone (1 mg/kg, s.c. in sterile saline) or filtered water (vehicle). Pouches were washed with PBS/EDTA 10mM. Cells were counted and plasma leakage was analyzed. In A, number of cells that migrates to the pouches 4 hours after carrageenan. Results are expressed as cell 10^7 /cavity. In B, plasma leakage was measured by Bradford's reaction, results are expressed as protein/mg-1 of protein compared with vehicle (V) vs treated group. The bars express the mean ± SEM of 6 animals, compared with vehicle (V) vs treated group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls. +, denote statistical difference ($P < 0.05$) between naïve (N) and vehicle group.

Fig. 7 - Effect of MEDF on zymosan –induced knee edema formation. Zymosan injection induced a significant articular inflammatory response that was characterized by marked articular oedema formation with six time increase in knee diameter of control group in relation to naïve group. Different groups of mice were orally treated with MEDF (100 mg/kg) or vehicle. Another group of mice were treated subcutaneously with the anti-inflammatory drug dexamethasone (1 mg/kg). Joint inflammation was induced by intra-articular (i.art.) injection of zymosan (500 µg per cavity in 25 µL sterile saline) by inserting a 27.5 G needle through the suprapatellar ligament into the left knee joint cavity, as previously described (Penido et al., 2006; Conte et al., 2008). Control animals received an i.art. injection of an equal volume of sterile saline. The bars express the mean ± SEM of 6-7 animals, compared with vehicle (V) vs treated group. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls.

Figures

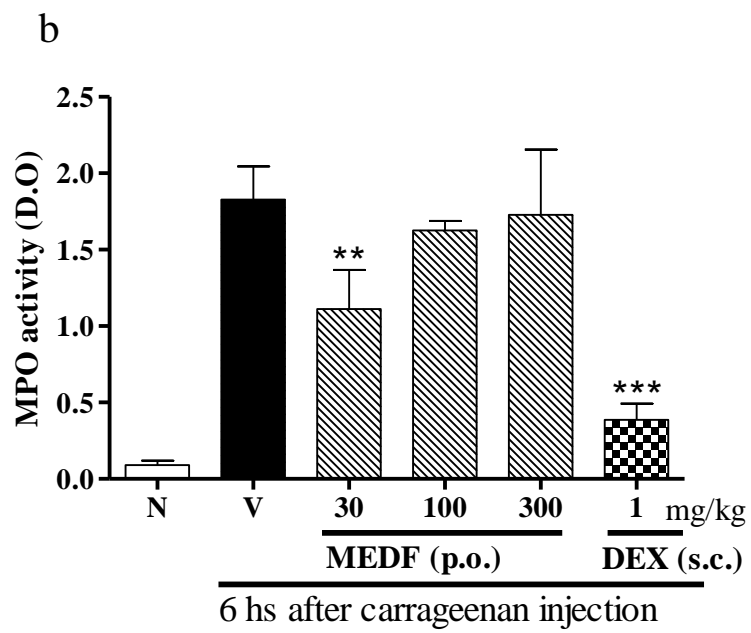
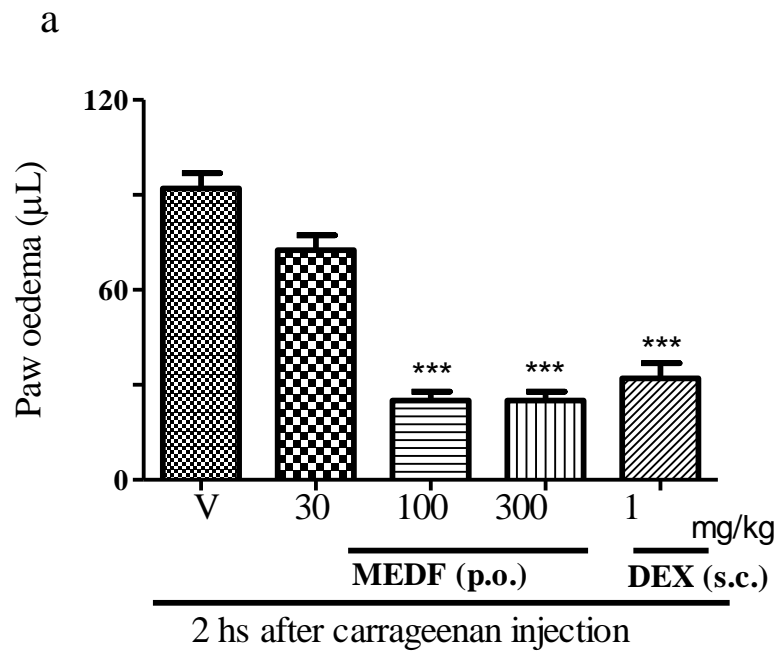
Souza et al. 2013

Fig. 1

a**b**

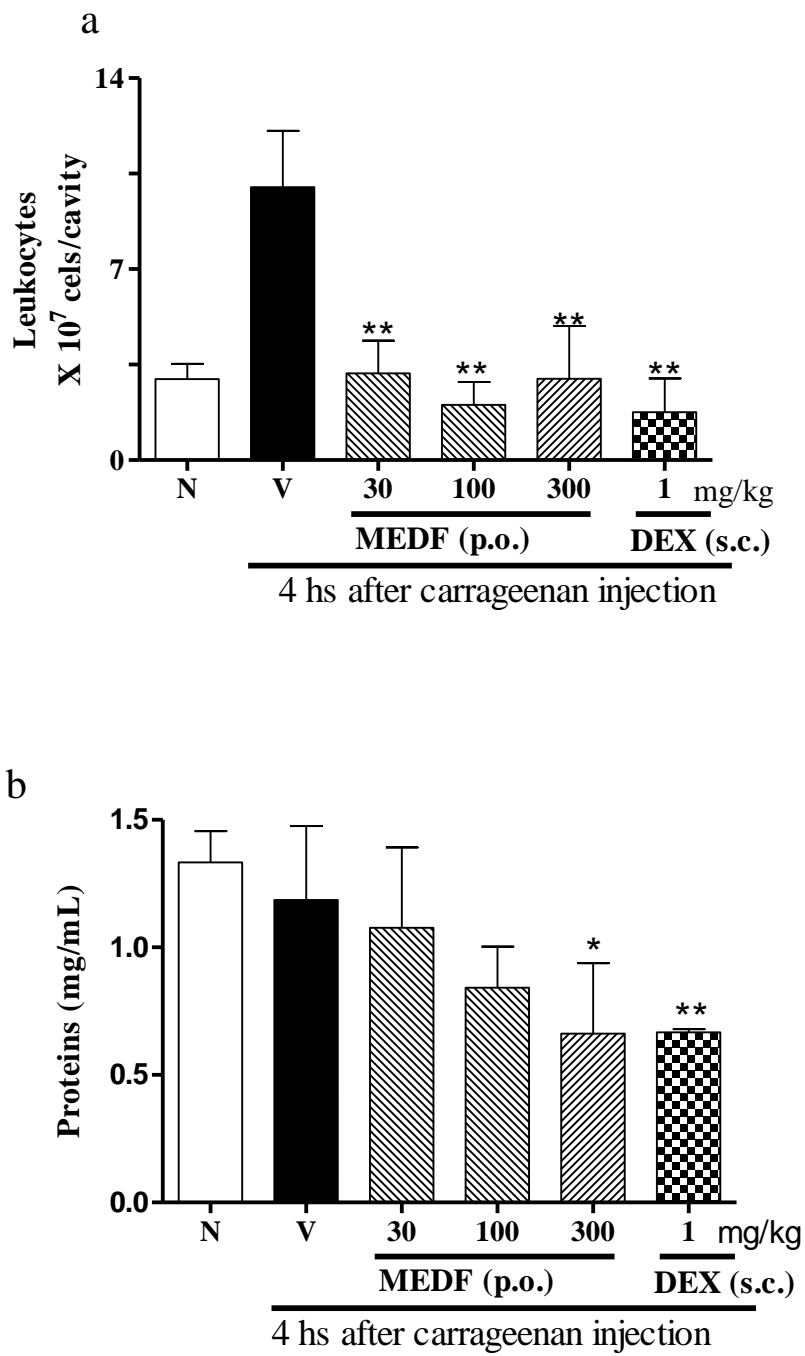
Souza et al. 2013

Fig. 2



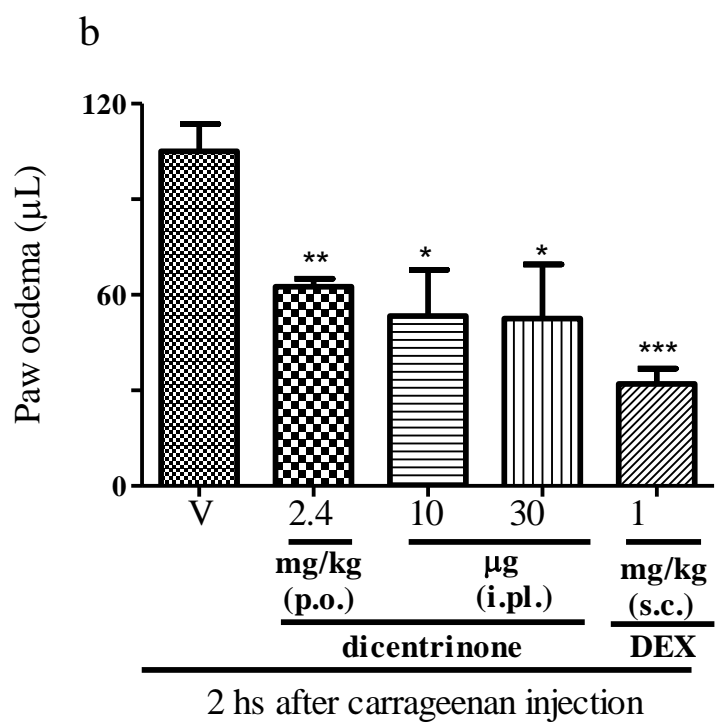
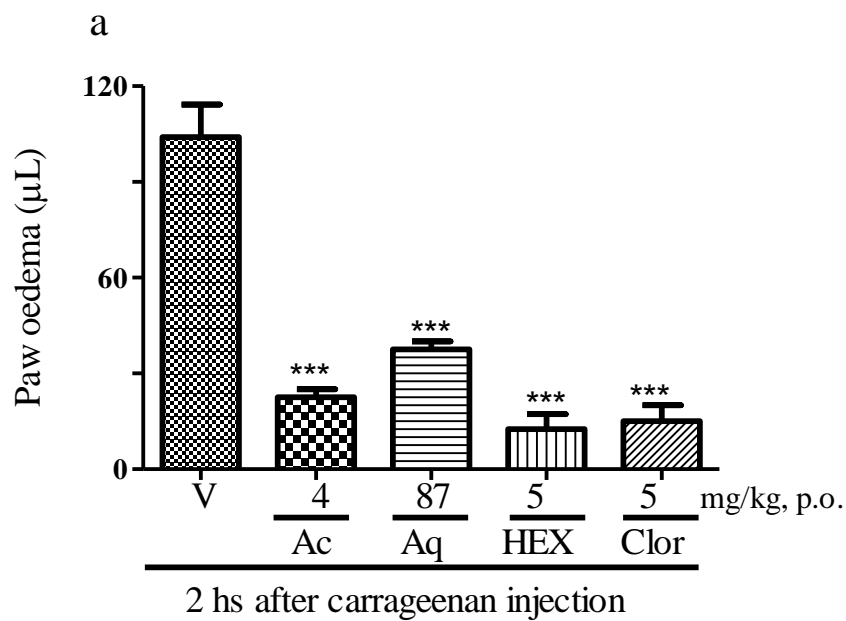
Souza et al. 2013

Fig.3



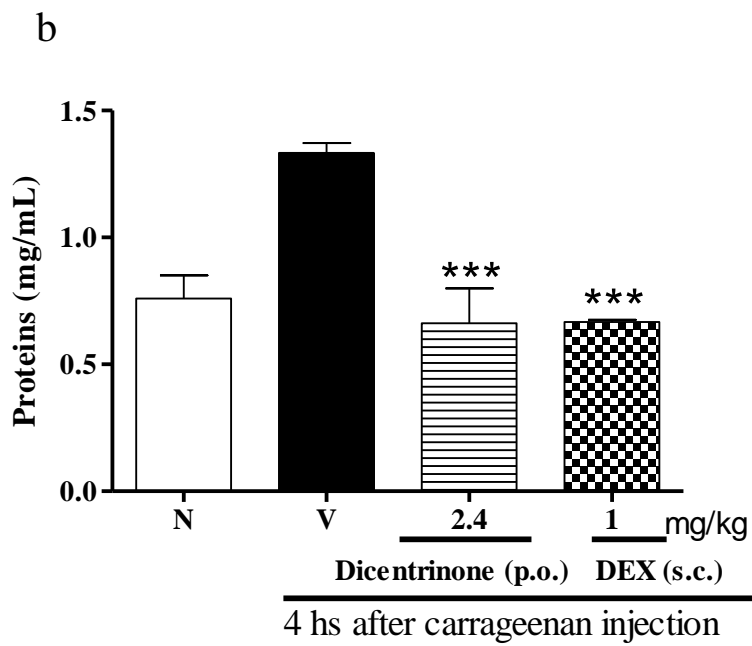
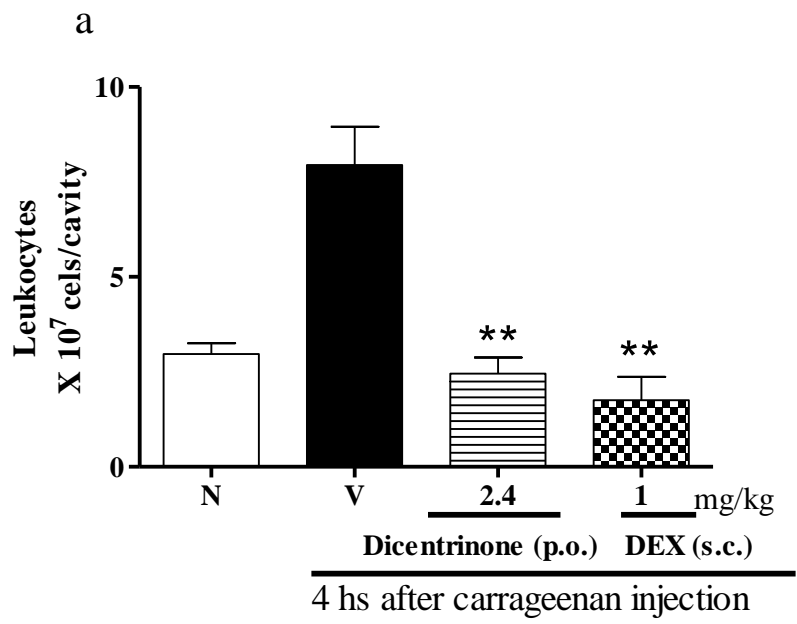
Souza et al. 2013

Fig. 4



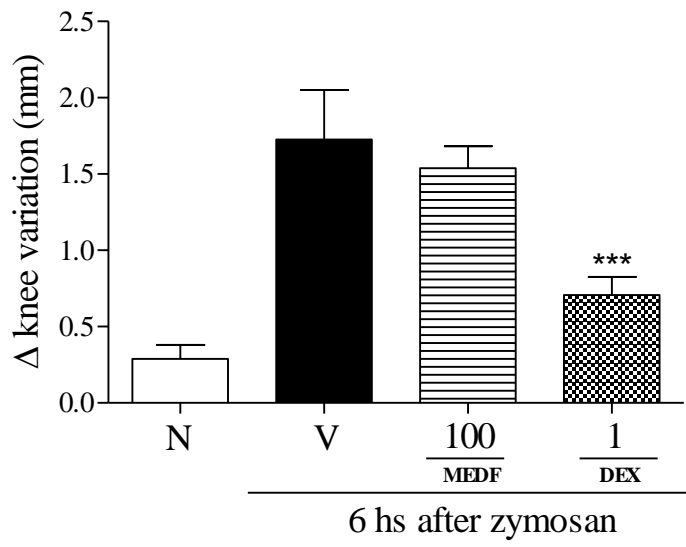
Souza et al. 2013

Fig. 5



Souza et al. 2013

Fig. 6



Souza et al. 2013

Fig. 7

6 ANEXOS

Anexo 1 – Metodologia

Edema de pata induzido por carragenina

Diferentes grupos de camundongos foram tratados por via oral com medf (30, 100 e 300 mg / kg), a fração acetato de (4 mg / kg), fração hexano (5 mg / kg), fração clorofórmio (4 mg / kg) e a fração aquosa (87 mg / kg) ou veículo, outro grupo de animais foram tratados por via subcutânea com a dexametasona (1 mg / kg). Após 1 h, os animais receberam 50 uL de uma s.c. injeção na pata traseira direita de carragenina (300 ng / pata), suspensa em solução salina estéril a 0,9%. A pata contralateral recebeu apenas a solução salina, e foi usada como controle. A espessura do edema da pata foi medida utilizando pletismômetro (LE 7500, PamLab, Espanha) e em pontos de tempo diferentes (0,5, 1, 2, 4) após a injeção de carragenina foi efetuada a medição. Os resultados foram expressos em mL e que a diferença entre os valores basais e após a injeção, quantificada como edema (Kassuya et al. 2009).

Atividade da mieloperoxidase

As amostras para a medida da atividade da MPO foram preparadas como descrito por De Young et. al. (1989), o tecido foi padronizado e homogeneizado em 5% (w / v) de tampão de fosfato 80 mM, pH 5,4, contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio. O homogenato foi centrifugado a 3200 rpm e 4 ° C durante 20 min. Alíquotas (30 ul) de cada sobrenadante foram misturados com 100 ul de fosfato mM de tampão 80, 85 uL de tampão fosfato 0,22 M e 15 mL de 0,017% de H₂O₂ em uma placa de 96 poços. A reação foi provocada com 20 mL de 3,3,3-tetrametilbenzidina (dissolvido em N, N-dimetilformamida). A placa foi mantida a 37 ° C durante 3 min, após o que a reação foi parada pela adição de 30 ul de acetato de sódio 1,46 M, pH 3,0. A actividade enzimática foi determinada através da medição da densidade óptica a 630 nm, e foi expressa como mOD por mg de proteína.

Modelo de bolsa de ar

O modelo de bolsa de ar é induzido por injeções repetidas de ar estéril no dorso do animal ao longo de 7 dias e estudos mostram que esse procedimento leva a formação de uma cavidade com constituição celular semelhante à membrana sinovial (Edwards et al. 1981; Kowanko et al. 1986).

No experimento foram utilizados camundongos machos da linhagem Swis (18-22g) inicialmente os animais foram randomizados de forma aleatória e divididos em grupos: controle, controle positivo (dexametasona s.c 1 mg/Kg), grupo EMDF (30 mg/Kg v.o), grupo EMDF (100 mg/Kg v.o), grupo EMDF (300 mg/Kg), grupo dicentrinona (2,4 mg/Kg v.o). Inicialmente os animais foram anestesiados com a mistura de cetamina e xilazina (3:1), no dia 0 foi efetuada a injeção subcutânea na região dorsal do corpo do animal de ar de 4 mL de ar estéril, no dia 3 na bolsa pré formada foi injetado mais 2 mL de ar estéril e no dia 6, os animais foram tratados e após 1 hora foi efetuada a injeção de 350 µL de uma solução de carragenina a 0,1% após 4 horas os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, e a bolsa de ar foi lavada com 1 mL de PBS EDTA a 10 mM foi efetuado o recolhimento do exsudato formado em seguida foi feita a contagem de leucócitos totais e posteriormente a centrifugação do material por 2 minutos a 4°C cujo sobrenadante formado foi utilizado para dosagem dos níveis de proteínas pelo método de Bradford (Bradford 1976; Garcia-Ramallo et al. 2002; Piornedo Rdos et al. 2011)

Indução da inflamação articular

Diferentes grupos de camundongos foram tratados por via oral com EMDF (100 mg / kg), veículo. Outro grupo foi tratado por via subcutânea com a dexametasona (1 mg / kg). A inflamação das articulações foi induzida por injeção intra-articular (i.art.) de zymosan (500 ng por cavidade em 250 µL de solução salina estéril) através da inserção de uma agulha de 27,5 G através do ligamento suprapatelar para dentro da cavidade do joelho esquerdo no joelho contralateral foi injetada apenas solução de salina a 0,9% e utilizado como controle, no tempo de 6 horas os joelhos foram medidos com auxílio de um micrometro digital (Digimess) (Penido et al. 2006; Conte et al. 2008). Os animais controle receberam uma i.art. a injeção de um volume igual de solução salina estéril.

Toxicidade aguda

A toxicidade aguda do EMDF foi determinada utilizando camundongos fêmea Swiss (25-35 g), que foram mantidas sob condições padrão. Os animais (n = 5 por grupo) foram mantidos em jejum 12 horas antes da experiência. Os animais foram administrados com uma dose única de EMDF a uma dose de 2000 mg / kg e 5000 mg / kg parâmetros como: mortalidade, peso corporal, consumo de água e ração e comportamento foram observados por 7 dias (OECD 2001; Kumar 2010).

Anexo 2 – Carta de aprovação do CEP/UNIGRAN



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS UNIGRAN

Dourados, 09 de Julho de 2010.

Prezados Pesquisadores:

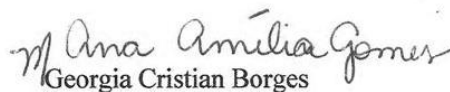
Cândida Aparecida Leite Kassuya

Magaiver Andrade Silva

O Projeto de vossa autoria 109/10, intitulado: “AVALIAÇÃO ANTIINFLAMATORIA E ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DE EXTRATOS E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Duguetia furfureceae* (ANNONACEAE)” foi integralmente APROVADO pelo CEP-UNIGRAN e poderá ser conduzido. Os pesquisadores atenderam as recomendações dos relatores.

Ressalto que os relatórios semestrais devem ser apresentados ao Comitê para acompanhamento e que alterações em seu projeto devem ser avisadas previamente a coordenação.

Respeitosamente,


Georgia Cristian Borges

Coordenadora do CEP-UNIGRAN

Ana Amélia Gomes
Secretária Executiva CEP-UNIGRAN

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Centro Universitário da Grande Dourados
R: Balbina de Matos, 2121 – Fone: (67) 3411-4207 / Fax: 3411-4167 – CEP: 79824-900 – Dourados – MS
E-mail: comitedeetica@unigran.br