

**FREDERICO FORMAGIO NETO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO  
EXTRATO METANÓLICO DAS FOLHAS E DO ALCALÓIDE *N*-  
*1, N*-2, *N*-3-TRIISOPENTENILGUANIDINA OBTIDO DE *Alchornea*  
*glandulosa* POEPP. & ENDL. (EUPHORBIACEAE)**

**DOURADOS MS  
2013**

**FREDERICO FORMAGIO NETO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO  
METANÓLICO DAS FOLHAS E DO ALCALÓIDE *N-1, N-2, N-3-*  
TRISOPENTENILGUANIDINA OBTIDO DE *Alchornea glandulosa* POEPP. &  
ENDL. (EUPHORBIACEAE)**

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

Orientador: CANDIDA APARECIDA  
LEITE KASSUYA

Co-orientador: ANELISE SAMARA  
NAZARI FORMAGIO

**DOURADOS-MS  
2013**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD**

616.047  
F723a

Formagio Neto, Frederico.

Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato metanólico das folhas e do alcalóide N-1, N-2, N-3-triisopentenilguanidina obtido de *Alchornea glandulosa* POEPP. & ENDL. (Euphorbiaceae) / Frederico Formagio Neto. – Dourados, MS : UFGD, 2013.

53 f.

Orientadora: Profa. Dra. Candida Aparecida Leite Kassuya.

Dissertação (Mestrado Ciências da Saúde) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Inflamação – Tratamento. 2. *Alchornea glandulosa*. 3. Anti-inflamatório. I. Título.

**Dedico a minha querida e amada esposa Anelise e minha filha**

**Maria Clara por estarem sempre o meu lado nos  
momentos em que mais precisei. Aos meus pais João  
e Balbina pelo apoio e aos meus irmãos Fernando e**

**Flavia.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela minha vida e pela força e presença em todos os momentos difíceis, me concedendo sabedoria e paciência.

A orientadora Profa. Candida Aparecida Leite Kassuya, pela paciência, amizade e por entender os meus limites e dificuldades.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – UFGD, pela disponibilidade de concretização deste trabalho.

A Alessandra pela amizade, alegria e companherismo.

A Edna e Magaiver pela amizade.

Ao pessoal do laboratório pela ajuda, em especial ao Renan, Ana Claudia e Diana.

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

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

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>iv</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>vi</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>vii</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>x</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Produtos naturais</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2. <i>Alchornea</i> (Euphorbiaceae)</b> .....	<b>5</b>
<b>2.3. <i>Alchornea glandulosa</i> Poepp. &amp; Endl.</b> .....	<b>5</b>
<b>2.4. Inflamação</b> .....	<b>9</b>
<b>2.4.1. Mediadores Inflamatórios</b> .....	<b>11</b>
<b>2.4.1.1 Histamina</b> .....	<b>11</b>
<b>2.4.1.2 Serotonina (5-hidroxitriptamina)</b> .....	<b>12</b>
<b>2.4.1.3 Eicosanóides</b> .....	<b>12</b>
<b>2.4.1.4 Citocinas</b> .....	<b>13</b>
<b>2.4.2. Fármacos utilizados na inflamação</b> .....	<b>16</b>
<b>2.5. Modelos experimentais para desenvolvimento de novos medicamentos</b> ...	<b>19</b>
<b>2.5.1. Modelo de edema de pata induzido por carragenina</b> .....	<b>19</b>
<b>2.5.2. Modelo de pleurisia induzida por carragenina</b> .....	<b>20</b>
<b>2.5.3. Modelo de edema de orelha induzido pela aplicação de óleo de cróton</b> .....	<b>20</b>
<b>2.5.4. Aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO)</b> .....	<b>20</b>
<b>2.6. Alvos moleculares para doenças inflamatórias</b> .....	<b>20</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1 Objetivos geral</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>22</b>
<b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>23</b>
<b>5. ANEXO</b> .....	<b>31</b>
<b>5.1. Artigo científico submetido - Journal of ethnopharmacology</b> .....	<b>31</b>
<b>5.2. Artigo científico - BMC</b> .....	<b>53</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ilustração de folhas e frutos de <i>Alchornea glandulosa</i> Poepp. & Endl. (Euphorbiaceae).....	6
<b>Figura 2:</b> Substâncias isoladas das folhas de <i>A. glandulosa</i> .....	7

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AA - ácido araquidônico**

**AG-1 – Alcalóide guanidínico**

**AINE – anti-inflamatório não esteroideal**

**ANOVA – análise de variância**

**BDNF – fator neutrófico derivado do cérebro**

**CMI – concentração mínima inibitória**

**COX – ciclo-oxigenase**

**COX 1 – ciclo-oxigenase 1**

**COX 2 – ciclo-oxigenase 2**

**DO – densidade óptica**

**EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético**

**EMAG – extrato metanólico de *Alchornea Glandulosa***

**G - protein coupled receptors (receptores acoplados a proteína)**

**GC – glicocorticóides**

**GR – receptor de glicocorticóide**

**H 1, 2, 3 – receptores**

**IKB – proteína inibitória kappa B**

**IL – interleucina**

**IL-1ra – interleucina 1 ra**

**IL1 – interleucina 1**

**IL1 $\beta$  – interleucina 1 beta**

**IL1 $\alpha$  – interleucina 1 alfa**

**IL6 – interleucina 6**

**IL8 – interleucina 8**

**IL17 – interleucina 17**

**IL22 – interleucina 22**

**IL23 – interleucina 23**

**IL26 – interleucina 26**

**I.P - intrapleural**

**LDL – colesterol**

**LOX – lipoxigenase**

**LPS – lipopolissacarídeo**



**LTs - leucotrienos**  
**mg - miligramas**  
**mM – milimolar**  
**mOD – densidade óptica média**  
**MPO – mieloperoxidase**  
**NCIADR – fenótipo de resistência a múltiplos fármacos**  
**NFκB - Fator nuclear kappa B**  
**nm - nanometro**  
**NO - óxido nítrico**  
**NOS – óxido nítrico-sintase**  
**PAF – fator de agregação plaquetária**  
**PBS – salina tamponada com fosfato**  
**PDE4 – fosfodiesterase 4**  
**PGs \_ prostaglandinas**  
**PGD2 – prostaglandina D2**  
**PGG2 – prostaglandina G2**  
**PGE2 – prostaglandina E2**  
**PGE2α - prostaglandina E2 alfa**  
**PGF2α - prostaglandina F2 alfa**  
**PGH2 – prostaglandina H2**  
**PGI2 – prostaglandina I2**  
**PLA2 – enzima fosfolipase A2**  
**PMA – acetato de forbol miristato**  
**SNC – sistema nervoso central**  
**Th – células efetoras**  
**Th 1 – células efetoras 1**  
**Th 17 – células auxiliares 17**  
**TNF-α - fator de necrose tumoral α**  
**TNF-R – receptor de fator de necrose tumoral**  
**TXA2 – tromboxano A2**  
**RGC - receptores de glicocorticóides citosólicos**  
**μL – microlitro**

## RESUMO

*Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae), (sinonímia: *Alchornea irucurama* Casar), conhecida pelo nome popular de “amor seco”, é tradicionalmente utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças inflamatórias e como agente antiúlcera. É distribuída do Sudeste ao sul do Brasil, principalmente na Mata Atlântica e Cerrado. Na tentativa de explorar a indicação etnofarmacológica da espécie, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato metanólico das folhas de *A.glandulosa* (EMAG) bem como do composto isolado, o alcalóide guanidínico N-1, N-2, N-3- triisopentenilguanidine em modelos experimentais *in vivo* de inflamação em camundongos. O efeito de EMAG e do alcalóide foi testado nos seguintes modelos experimentais: edema de pata induzido por carragenina e aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO), edema de orelha induzido por óleo de croton, pleurisia induzida pela carragenina e migração total dos leucócitos em camundongos. Em diferentes grupos de animais tratados oralmente com EMAG (100 e 300 mg/kg) ou com N-1, N-2, N-3-triisopentenilguanidine (5 e 30 mg/kg) submetidos ao edema de pata induzido por carragenina, diminuíam significativamente o edema e a atividade da MPO, quando comparado ao grupo controle. Na pleurisia induzida por carragenina, o tratamento oral com EMAG (100 ou 300 mg/kg) ou com N-1,N-2,N-3-triisopentenilguanidina são capazes de reduzir significativamente a migração de leucócitos totais e interferir com o extravazamento de plasma em camundongos. Finalmente a aplicação tópica de EMAG inibiu de forma significativa o edema de orelha induzido por óleo de croton. Os resultados mostraram que o extrato bruto metanólico de *A. glandulosa* apresentou atividade anti-inflamatória oral e tópica e provavelmente o composto ativo responsável por essa ação, é o alcalóide N-1, N-2, N-3-triisopentenilguanidina. Porém serão necessários mais testes para evidenciar o mecanismo de ação envolvido com a atividade anti-inflamatória oral e tópica.

**Palavras-chave:** *Alchornea glandulosa*; Euphorbiaceae; N-1, N-2, N-3-triisopentenilguanidina; inflamação.

## ABSTRACT

*Alchornea glandulosa* Poepp. & Endl. (Euphorbiaceae) has traditionally been used in folk medicine for the treatment of inflammatory diseases and as an antiulcer agent. This specie can be distributed from southeast to south of Brazil, mainly in the Atlantic Forest and Cerrado. This work aimed to evaluate the anti-inflammatory of methanolic extract from leaves of *A. glandulosa* (MEAG) as well as the isolated compound the guanidine alkaloid *N*-1, *N*-2, *N*-3-triisopentenylguanidine in experimental *in vivo* models of inflammation in mice. The effect of MEAG was studied in the following experimental models: carrageenan-induced paw oedema and increase in myeloperoxidase (MPO) activity, croton-oil-induced ear oedema, carrageenan-induced pleurisy plasma leakage and leukocyte migration in mice. Phytochemical studies revealed the presence of compound alkaloid *N*-1, *N*-2, *N*-3-triisopentenylguanidine that was isolated from MEAG. Different groups of animals orally treated with MEAG (100 and 300 mg/kg) or with *N*-1, *N*-2, *N*-3-triisopentenylguanidine (5 and 30 mg/kg) were submitted to carrageenan-induced paw oedema inducing significantly decrease in paw oedema and in MPO activity when compared to control groups. In carrageenan induced pleurisy, the oral treatment with MEAG (100 or 300 mg/kg) or with *N*-1, *N*-2, *N*-3-triisopentenylguanidine are able to reduce significantly the migration of total leukocyte or interfere with plasma leakage in mice. Finally the topical application of MEAG inhibited in a significant way the ear oedema induced by croton oil. The results showed that crude methanolic extract of *A. glandulosa* exhibited oral and topical anti-inflammatory activity and the active compound responsible for this action is the guanidine alkaloid *N*-1, *N*-2, *N*-3-triisopentenylguanidine.

**Keywords:** *Alchornea glandulosa*; *Euphorbiaceae*; *N*-1, *N*-2, *N*-3-triisopentenylguanidine; inflammation

## 1 INTRODUÇÃO

---

O uso de produtos naturais, principalmente aqueles derivados de plantas, é forma tradicional de promover alívio de doenças, sendo utilizada por mais de cinco milênios em diversas civilizações (SAKLANI & KUTTY, 2008; CALIXTO, 2005).

Além disso, as plantas medicinais são uma das melhores e mais efetivas fontes de compostos candidatos a novas classes de medicamentos, representando rica diversidade natural ao considerarmos a amplitude dos compostos que sintetizam. Muitos dessas substâncias químicas têm se mostrado útil na terapêutica para tratar uma variedade de doenças e males humanos. O conhecimento medicinal tradicional, aliado a técnicas modernas tem acelerado o processo de descoberta de drogas derivadas de plantas (ITOKAWA et al., 2008; SAKLANI & KUTTY, 2008). Entre exemplos estão a morfina e o salicilato que permitiram o desenvolvimento das classes de drogas analgésicas mais utilizadas na medicina e também na medicina veterinária como os opióides e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) (CALIXTO, 2005). Entretanto, acredita-se que apenas 10 a 15% da diversidade vegetal disponível têm sido exploradas quanto a seu potencial farmacológico. Mesmo sofisticados métodos de análises disponíveis como o rastreamento de elevada capacidade “High Throughput Screening”, ainda persistem dificuldades consideráveis na descoberta de princípios ativos de muitas plantas medicinais (SAKLANI e KUTTY, 2008).

No entanto, tem-se verificado um grande avanço científico, envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas, sendo de marcante importância a interação entre a química e a farmacologia. Além disso, quando se procura obter substâncias ativas de plantas, um dos principais aspectos a serem observados consiste nas informações da medicina popular. Cerca dos 75% dos compostos puros naturais, empregados na indústria farmacêutica, foram isolados, seguindo recomendações da medicina popular. Estima-se que no Brasil, 25% dos US\$ 8 bilhões do faturamento da indústria farmacêutica sejam derivados de plantas (SIMÕES et al., 2004).

Assim, diante da importância desse trabalho que busca nas plantas, fontes com potencial medicinal e moléculas com atividades biológicas relevantes para o desenvolvimento e exploração farmacológica. O estudo teve como objetivo avaliar a atividade farmacológica da espécie *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae), conhecida

popularmente como “amor seco”, utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças imune inflamatória e como agente antiúlcera. O efeito do extrato metanólico obtido das folhas e do alcalóide guanidínico *N*-1, *N*-2, *N*-3-triisopentenilguanidina, foi avaliado no edema de pata induzido por carragenina e aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO), edema de orelha induzido por óleo de croton, pleurisia induzida pela carragenina e migração total dos leucócitos em camundongos.

O estudo da avaliação do extrato e do composto isolado estende e corrobora o uso etnomedicinal de *A. glandulosa* como anti-inflamatório.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

---

### 2.1. Produtos naturais

Dentre as diversas formas de terapia para a prevenção e cura de doenças, as plantas foram e são, indubitavelmente, as mais amplamente utilizadas ao longo da história da humanidade. As plantas foram inicialmente usadas na sua forma natural, na preparação de chás, unguentos, emplastos e outros. Mais tarde, especialmente no início do século XIX, serviram como fonte para a obtenção de matéria-prima para a síntese de fármacos. Com o passar dos anos, as plantas emergiram como fontes alternativas para o descobrimento de protótipos que servem como base racional para o desenvolvimento de novos medicamentos (SIMÕES et al., 2004).

No entanto, apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, apenas 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas e 120 compostos de origem natural, obtidos a partir de cerca de 90 espécies de plantas, são utilizadas na terapia moderna. Os produtos naturais estão envolvidos no desenvolvimento de 44% de todas as novas drogas (CRAGG et al., 1997). São inúmeros os exemplos de medicamentos que foram desenvolvidos, direta ou indiretamente, de fontes naturais, especialmente de plantas, incluindo dentre outros a pilocarpina, os digitálicos, os curares, a quinina, a artemisina, a atropina, escopolamina e o cromolin (HOSTETTMANN et al., 2003).

A salicilina é um anti-inflamatório produzido a partir das cascas do salgueiro (*Salix Alba* L., Salicaceae), que quando consumida, é metabolizada em ácido salicílico. Sua ação resultou na descoberta da aspirina comercializada pela primeira vez na Alemanha, pela Bayer®. A aspirina (ácido acetilsalicílico), não é encontrada nesta planta, trata-se de uma modificação estrutural simples (HOSTETTMANN et al., 2003).

Outro exemplo é a papoula, *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae), de onde é extraído o ópio, que é nada mais que o látex seco. Uma cápsula pode fornecer em média de 20 a 50 mg de ópio bruto (PELT, 1983). Os primeiros estudos sobre a composição do ópio foram realizados no início do século XIX, e seu constituinte majoritário foi identificado como o alcalóide morfina. A grande eficácia da morfina como analgésico teve seu justo valor reconhecido depois da invenção da seringa hipodérmica, em 1953, incentivando vários pesquisadores a preparar diferentes derivados semi-sintéticos a

partir da morfina. O ópio contém outros alcalóides com propriedades interessantes como a codeína (antitussígeno), a tebaína (antagonista da morfina), a narcotina (antitussígeno e espamolítico) e a papaverina (espamolítico) (BRUNETON, 1993).

A maioria (60%) dos fármacos anticâncer introduzida na terapêutica nas últimas décadas tem sua origem nos produtos naturais (NEWMAN & CRAGG 2007; BUTLER, 2008; HARVEY, 2008). Uma das plantas mais extensivamente estudadas é *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), conhecida como “vinca”, “Boa-noite”, “Maria-sem-vergonha”, que foram isolados os alcalóides bisindólicos vimblastina (Velban®) e vincristina (Oncovin®), considerados medicamentos indispensáveis para o tratamento da leucemia. A vinorelbina (3, 5-nor-anidrovimblastina, Nalvelbine®) é um derivado sintético utilizado para o tratamento do câncer de mama (HOSTETTSMANN et al., 2003).

Outro alcalóide, a camptotecina, isolada da planta ornamental chinesa *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae), apresenta potente atividade antitumoral, sendo questionado seu sucesso clínico devido à sua elevada toxicidade e pouca solubilidade. Um derivado, o Topotecan (Hycamtin®) foi desenvolvido para o tratamento de casos avançados de câncer do ovário e o análogo irinotecan HCl foi aprovado para o tratamento de câncer do cólon e reto (WALL & WANI, 1996; WAGNER, 1999).

Além destes destacam-se o paclitaxel (Taxol®) e o análogo docetaxel (Taxotere®) isolados das cascas do *Taxus brevifolia* (Taxaceae) utilizado para o tratamento de câncer ginecológicos; a podofilotoxina e os análogos, etoposídeo (Etopophos®) isolados da resina de *Podophyllum emodi* e teniposídeo (Vumon®) e os análogos topotecano (Hycamtin®) e irinotecano (Camptosar®). Estes medicamentos movimentam anualmente um mercado de cerca de 60 bilhões de dólares (PINTO et al., 2002).

A glaucina, alcalóide aporfínico, isolado de *Glaucium flavum* (Papaveraceae), possui atividade broncodilatadora e anti-inflamatória, inibidor da PDE4, e ainda reduz a hiperreatividade a histamina e a acúmulo de eosinófilos no pulmão (PONS et al., 2000).

Com a descoberta destes medicamentos de origem vegetal, é possível entender a busca de novas substâncias bioativas, principalmente por plantas do Brasil, onde a grande maioria das espécies continua sem qualquer estudo químico ou biológico.

## **2.2. *Alchornea* (Euphorbiaceae)**

A família Euphorbiaceae compreende aproximadamente 290 gêneros e 7.500 espécies distribuídas em todas regiões tropicais e subtropicais, principalmente na América e na África. No Brasil, ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies difundidas em todos os tipos de vegetação (BARROSO, 1984). Dentre estes gêneros, destaca-se *Alchornea*, com espécies amplamente utilizada na medicina popular como agentes antidiarréico, anti-inflamatório, anti-reumático e no tratamento de lepra e de doenças cutâneas (TONA et al., 1999, 2000; KHONG-HUU et al., 1972; AJALI, 2000; AGBE e OGUTIMEIN, 1987; SETZER et al., 2000).

Estudos farmacológicos realizados com extratos brutos e compostos isolados de espécies do gênero *Alchornea* revelaram atividades antibacteriana, anti-inflamatória, antiespasmódica, antitripanossômica e antidiarréica (KHONG-HUU et al., 1972; AJALI, 2000; AGBE e OGUTIMEIN, 1987).

O gênero *Alchornea* apresenta como principais constituintes alcalóides hexaidroimidazo-pirimidínicos e guanidínicos, triterpenos, flavonóides e outros compostos fenólicos (HART et al., 1970; LAMIKANRA et al., 1990).

O extrato metanólico das folhas *A. cordifolia*, que contém compostos fenólicos e terpenóides demonstrou efeito contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* (EBI et al., 2001) e atividade tripanocida contra *Plasmodium falciparum* (ADEWUNMI et al., 2001, MUSTOFA et al., 2000).

A fração clorofórmica obtida do extrato metanólico das folhas de *A. sidifolia* apresentou triterpenos e esteroides com atividade antifúngica (BARBO et al., 2002).

*A. latifolia* apresentou atividade citotóxica contra células cancerosas Hep-G2 (carcinoma hepatocelular), MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário) e A-431 (carcinoma epidermóide), atribuída a presença de triterpenos pentacíclicos e flavonóides (SETZER et al., 2000).

Derivados de quercetina com atividade contra bactérias Gram-positiva e negativa foram isolados de *A. laxiflora* (OGUNDIPE et al., 2001).

### 2.3. *Alchornea glandulosa* Poepp. & Endl.

*A. glandulosa* Poepp. & Endl. (sinonímia: *Alchornea irucurama* Casar) é conhecida popularmente como “amor seco”, “tapiá”, “tanheiro de folha redonda”, “tanheiro” ou “canela-raposa” (**Figura 1**). A planta é uma árvore, de caule tortuoso, que ocorre em florestas ciliares do Brasil (CORRÊA, 1984), tradicionalmente utilizada na

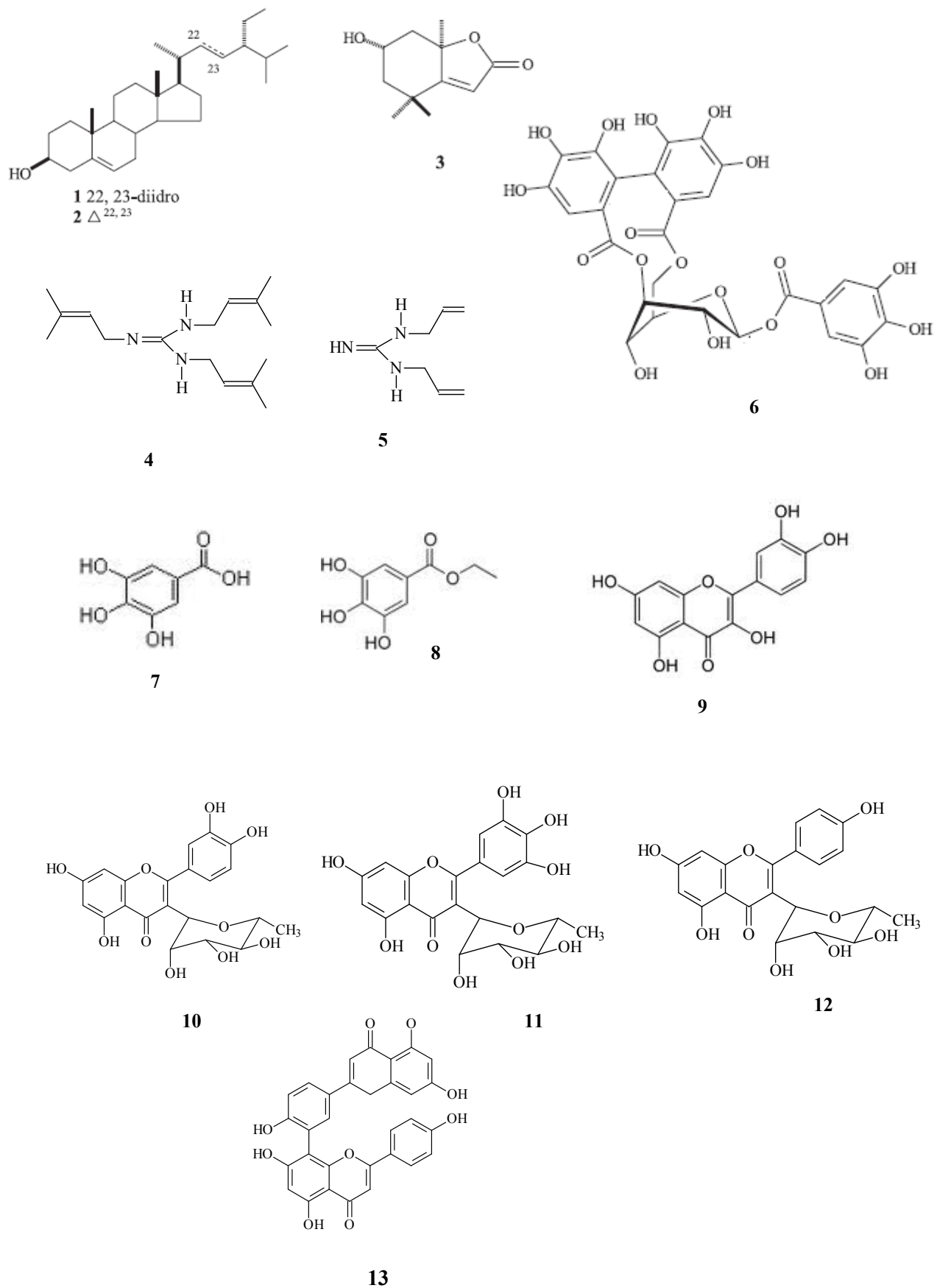


medicina popular para o tratamento de doenças imunes e inflamatórias e como agente antiúlcera para curar úlcera gástrica e gastrite (LOPES et al., 2011).



**Figura 1:** Ilustração de folhas e frutos de *Alchornea glandulosa* Poepp. & Endl. (Euphorbiaceae). <http://domingostringali.blogspot.com.br/2011/04/arvores-nativas-01.html> (acesso 18/12/2012)

Estudos fitoquímicos das folhas relatam o isolamento de esteróides como o sitosterol (1) e estigmasterol (2); de terpeno loliolida (3); de alcalóides guanidínico *N*-1, *N*-2, *N*-3-triisopentenilguanidina (4) e da pteroginidina (5); de um tanino corilagina (6); ácido gálico (7); etil galato (8); dos flavonóides quercetina (9), quercetina-3-*O*- $\alpha$ -raminose (10), miricetina 3-*O*- $\alpha$ -raminose (11), canferol 3-*O*- $\alpha$ -raminose (12) e amentoflavona (13) (Figura 2) (CONEGERO et al., 2003; URREA-BULLA et al., 2004; CALVO et al., 2007).



**Figura 2:** Substâncias isoladas das folhas de *A. glandulosa*.

Devido aos compostos presentes nessa espécie, o qual apresentam diversas propriedades biológicas, *A. glandulosa* foi avaliada frente a vários ensaios biológicos, apresentando moderada atividade antimicrobiana para o extrato bruto metanólico das folhas frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* (CMI = 250 µg/mL) e *Candida albicans* (CMI = 125 µg/mL) e significativa atividade para a fração alcaloidal, frente a *Bacillus subtilis* (CMI= 62,5 µg/mL) e *C. tropicalis* (CMI = 31,2 µg/mL) e moderada (CMI de 125 a 250 µg/mL) frente aos demais microrganismos testados (CONEGERO et al., 2003).

Os resultados da avaliação da atividade antiproliferativa do extrato metanólico das folhas apresentou efeito citostático e citocida, concentração dependente, para as linhagens de melanoma, mama e pulmão, com maior potência para a célula de melanoma. Já para a linhagem que expressa o fenótipo de resistência a múltiplos fármacos NCIADR (mama), apresentou efeito citostático. A fração não produziu aumento da atividade citostática (CONEGERO et al., 2003).

Outros ensaios também mostraram que o extrato e a fração acetato de etila obtida do fracionamento do extrato de *A. glandulosa* resultou na redução da ativação do NFκB (Fator nuclear kappa B; um complexo proteico que desempenha funções como fator de transcrição), e está envolvida na resposta celular a estímulos como o estresse, citocinas, radicais livres, radiação ultravioleta, oxidação de LDL (colesterol) e antígenos virais e bacterianos, desempenhando um papel fundamental na regulação da resposta imunitária à infecção. Segundo Lopes et al. (2011) esses achados enfatizam o potencial antiangiogênico e apoiam seu uso terapêutico para distúrbios que envolvem a angiogênese excessiva, tais como inflamação crônica e crescimento tumoral.

Os efeitos da fração acetato de etila de *A. glandulosa* foram investigados no peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), óxido nítrico (NO) e na produção do fator de necrose tumoral-α (TNF-α) em macrófagos peritoneais ativados com lipopolissacarídeo (LPS) ou phorbol miristato de acetato (PMA). Análise por cromatografia da fração avaliada mostrou vários componentes, incluindo flavonóides, que podem ter atividade anti-inflamatória. Efeitos inibitórios da fração em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e no NO variou de 8,59 ± 7,84% para 70,56 ± 4,16% e 16,06 ± 3,65% para 38,73 ± 3,90%, respectivamente. A produção de TNF-α foi apenas parcialmente inibida nas concentrações testadas. Estes resultados, indicam que a planta tem atividade anti-inflamatória, podendo ter potencial terapêutico no controle de doenças inflamatórias (LOPES et al., 2005).

A partir de evidências do uso etnofarmacológico dessa espécie como agente antiúlcera, o extrato metanólico obtido das folhas de *A. glandulosa* também foi avaliado na atividade antiúlcera e mostrou que a única administração oral (250 mg/kg/uma vez por dia) estimulou a proliferação das células epiteliais gástricas que contribui para a aceleração da cicatrização de úlceras gástricas induzidas por ácido acético. Além disso, nenhum sinal de toxicidade foi observada durante o tratamento com o extrato metanólico de *A. glandulosa* por um período de 14 dias de tratamento (CALVO et al., 2007).

Diante dos estudos farmacológicos e fitoquímicos citados, além da indicação popular, *A. glandulosa* é uma importante opção para futuros trabalhos de pesquisa, e apesar de existirem alguns trabalhos investigando suas atividades biológicas, ainda não existem dados científicos que comprovem sua eficácia anti-inflamatória. Grande parte das plantas utilizadas na medicina popular ainda não foi submetida a estudos que comprovem sua eficácia e segurança e o uso popular não é suficiente para validá-las como medicamentos eficazes e seguros. Afinal, as plantas medicinais não se diferenciam de qualquer outro xenobiótico sintético e a preconização ou autorização oficial do seu uso como medicamento, devem estar fundamentadas em evidências experimentais (SIMÕES et al., 2004). Sendo assim, torna-se relevante investigar a atividade anti-inflamatória do extrato obtido das folhas, assim como do composto *N*-1, *N*-2, *N*-3-triisopentenilguanidina, um alcalóide guanidínico isolado desta espécie, o qual ainda não possui dados científicos acerca de sua atividade biológica.

O interesse por esta classe de compostos é devido a suas diferentes propriedades biológicas. Alcalóides guanidínicos isolados de esponjas, é uma das classes mais importantes de produtos naturais marinhos, são extremamente ativos em testes de atividade antiviral, citotóxica, antibiótica e como inibidores de diferentes classes de enzimas de interesse terapêutico (BERLINCK et al., 2010).

#### **2.4. Inflamação**

O processo inflamatório caracteriza-se por um processo complexo e multimediado. É uma resposta que pode ser desencadeada por traumas, lesões teciduais e invasão por agentes infecciosos, com a finalidade de eliminar microrganismos e/ou outros agentes irritantes e potencializar o reparo tecidual (MEDZHITOV, 2010). Alguns sinais clássicos da inflamação são vasodilatação e edema, com presença de área

eritematosa, calor no local do dano tecidual, dor e possível perda de função do local afetado (KANTARCI et al., 2005). Este processo envolve uma complexa cascata de eventos bioquímicos e celulares, que incluem extravasamento de fluídos, ativação enzimática, migração celular, liberação de mediadores, sensibilização e ativação de receptores, lise tecidual e de reparo (MEDZHITOV, 2010).

A inflamação é dividida em duas categorias, aguda e crônica, de acordo com o tempo de duração e características patológicas. A inflamação aguda apresenta curta duração (horas). Durante o processo inflamatório agudo, muitos mediadores como o óxido nítrico e prostaglandinas como prostaglandina  $I_2$  ( $PGI_2$ ), prostaglandina  $D_2$  ( $PGD_2$ ), prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) e prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) promovem principalmente vasodilatação, um dos sinais clássicos do processo inflamatório agudo, representado pelo calor e rubor característicos da reação inflamatória (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

Outro sinal precoce da inflamação aguda é a formação do edema, que ocorre devido ao fluxo transvascular de fluido rico em proteínas (plasma) dos compartimentos intravasculares para o interstício devido ao aumento de permeabilidade vascular de capilares e vênulas, como resultado da liberação de histamina, bradicinina, leucotrienos, fatores do complemento, substância P e fator de agregação plaquetária (PAF) no sítio inflamatório (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

A vasodilatação e formação de exsudato são geralmente acompanhadas da marginação, adesão e migração de leucócitos, principalmente neutrófilos. Na fase aguda da resposta inflamatória, ocorre a liberação de vários mediadores em especial componentes do complemento como os fragmentos C3a e C5a, leucotrienos, quimiocinas como a IL-8 e ainda bioprodutos bacterianos como peptídeos N-formilados, que promovem a quimiotaxia de leucócitos e outras células fagocíticas para o sítio da reação inflamatória (ADEREM e SMITH, 2004).

A inflamação aguda pode finalizar-se com a resolução de todos os eventos característicos da reação inflamatória e retorno do tecido lesionado à normalidade ou sua substituição por tecido conjuntivo. Esse processo é chamado de resolução da resposta inflamatória e podem estar envolvidas substâncias resolutivas (mediadores) como a Lipoxina, MAPKinase fosfatase, protecninas, resolvinas, dentre outras (GILROY et al., 2004; ADEREM e SMITH, 2004).

A ausência ou falha do processo resolutivo leva a progressão da resposta tecidual para inflamação crônica caracterizando-se por infiltração de células mononucleares, que incluem macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Os processos inflamatórios crônicos são de duração prolongada estendendo-se de semanas a meses, ou mesmo anos. Durante a inflamação crônica ocorrem simultaneamente: a presença de processo inflamatório ativo, tentativas de reparo tecidual com consequente destruição do tecido e formação de fibrose. Entre as doenças crônicas inflamatórias incluem-se desordens como artrite reumatóide, aterosclerose e lupus eritematoso sistêmico (GILROY et al., 2004; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

O processo inflamatório resulta da liberação de vários mediadores da inflamação, substâncias endógenas ou exógenas, uma vez ativadas desencadeiam, mantêm e ampliam diversos processos envolvidos na resposta inflamatória, podendo sensibilizar fibras nociceptivas periféricas, promovendo a facilitação central da transmissão nociceptiva (SYRIÁTOWICZ et al., 1999; VANEGAS, 2004), levando a uma resposta dolorosa aumentada a um estímulo nocivo, chamado de hiperalgesia (VANEGAS, 2004; SOMMER e KRESS, 2004; COUTAUX et al., 2005).

De maneira geral, os mediadores estão relacionados com a atividade, em que a induzem os seus efeitos ligando-se a receptores específicos existentes nas células-alvo, tendo uma atividade direta (enzimática ou tóxica). São altamente reguladores e depois de libertados pela célula, rapidamente degeneram ou são inativados por enzimas e eliminados. A ação de um mediador pode estimular as células-alvo a libertar outro mediador. Esta segunda resposta pode transmitir os mesmos efeitos da primeira, ampliando-o ou efeitos contrários à primeira, regulando-o (RANG et al., 2007).

#### ***2.4.1 Mediadores Inflamatórios***

Mediadores inflamatórios são substâncias que uma vez liberadas/ativadas desencadeiam, mantem e amplificam os diversos processos envolvidos na resposta inflamatória, como histamina, serotonina, prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs), citocinas, quimiocinas, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) dentre vários outros (RANG et al., 2007).

##### ***2.4.1.1 Histamina***

A histamina, potente vasodilatador e enzima proteolítica, responsável pela vasodilatação, têm ação rápida e precose, mas de curta duração. É distribuída nos mastócitos existentes no tecido conjuntivo adjacente aos vasos sanguíneos, basófilos e plaquetas, é em grande parte armazenada em grânulos existentes nos mastócitos. Seus principais efeitos é a dilatação arteriolar, age como principal mediador da fase de aumento de permeabilidade vascular, induzindo uma contração endotelial e aumentando espaços interendoteliais, exercendo seus efeitos fisiológicos através da interação com três diferentes tipos de receptores acoplados a proteína G (*G protein coupled receptors*), designados H-1: contração da musculatura lisa dos brônquios, intestino e útero, e aumento da permeabilidade dos capilares venosos (drogas anti-histamínicas bloqueiam estes receptores); H-2: aumenta a secreção de ácido gástrico e de muco nas vias aéreas; H-3: afeta principalmente a síntese de histamina e sua liberação (KUMAR et al., 2005; CRIADO et al., 2010)

#### **2.4.1.2 Serotonina (5-hidroxitriptamina)**

A serotonina é um mediador vasoativo pré-formado, responsável pela vasodilatação com ações similar as da histamina. É encontrado, sobretudo nos grânulos densos das plaquetas (conjuntamente com a histamina, a adenosina difosfato e cálcio). É liberada no momento da agregação das plaquetas sendo um importante regulador da função plaquetária. Outros papéis fisiológicos é como neurotransmissor no SNC (humor, apetite, regulação da temperatura, percepção da dor, regulação da pressão arterial, reflexo do vômito, ciclos de sono), estando definitivamente envolvida na fisiopatologia de várias doenças como depressão, ansiedade, enxaqueca, e síndrome do intestino irritável (JONNAKUTY e GRAGNOLI, 2008).

#### **2.4.1.3 Eicosanóides**

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

lipídicos são produzidos pela ação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub>, sobre fosfolípidos de membrana. Agem degradando o ácido araquidônico e liberando os eicosanóides, que são seus derivados, mediadores de diversas condições patológicas, especialmente nos processos inflamatórios (HILÁRIO et al., 2006; KATZUNG, 2010).

O ácido araquidônico pode ser metabolizado pela via da lipoxigenase (LOX), que o converte em derivados hidroperóxidos nos leucócitos, dando origem aos leucotrienos (MAJNO & JORIS, 2004).

O ácido araquidônico também pode ser metabolizado pela via da ciclo-oxigenase (COX), mediada por enzimas que catalisam a biosíntese das prostaglandinas. A ciclo-oxigenase possui duas isoformas distintas a COX 1 e COX 2. A COX 1 é expressa de forma constitutiva em vários tecidos, possui um papel citoprotetor da mucosa gástrica e também está envolvida na sinalização entre as células e na homeostase tecidual. A COX 2 não é expressa constitutivamente, por isso não é detectada em tecidos lesados, porém é induzida por células inflamatórias, dando origem a diversos prostanóides, como por exemplo as prostaglandinas envolvidas nas reações inflamatórias, que são importantes na vasodilatação (KUMAR et al., 2005). Ambas as enzimas catalisam a incorporação de duas moléculas de oxigênio em cada molécula de araquidonato formando os endoperóxidos altamente instáveis prostaglandina G<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub> e PGH<sub>2</sub>). Estes são rapidamente transformados por enzimas isomerase ou sintase em PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> e tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) que são os principais produtos finais bioativos desta reação (KUMAR et al., 2005).

#### ***2.4.1.4 Citocinas***

As citocinas pertencem a uma família de moléculas de sinalização polipeptídicas que são liberadas por várias células em resposta a inúmeros estímulos. São proteínas regulatórias de baixo peso molecular ou glicoproteínas que se liga a receptores específicos de uma maneira autócrina, parácrina e/ ou endócrina (KINDT et al., 2008; JAFFER et al., 2010). Iniciam a sua ação por meio da ligação a receptores específicos provocando alteração da síntese do RNA e de proteínas de diferentes células do organismo (SHEERAN e HALL, 1997). Entre os reguladores mais importantes desse processo destacam-se o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina 1 (IL-1), as quais são produzidas principalmente por macrófagos (VERRI et al., 2006).



A interleucina-1 foi a primeira interleucina a ser descrita. A família das IL-1 compreende onze membros: IL-1F1 a IL-1F11, nova nomenclatura, sendo as mais estudadas a IL-1 $\alpha$  (IL-1F1), IL-1 $\beta$  (IL-1F2), IL-1ra (IL-1F3) e IL-18 (IL-1F4), (DINARELLO, 2009). IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  apesar de apresentarem atividades idênticas, diferem em alguns aspectos, por exemplo, quanto a distribuição. A IL-1 $\beta$  é secretada e possui ação sistêmica, em contrapartida IL-1 $\alpha$  age localmente. Em relação à produção, IL-1 $\beta$  é produzida principalmente por monócitos e macrófagos e IL-1 $\alpha$  é altamente expressa por queratinócitos e células endoteliais. IL-1 $\alpha$  parece estar mais envolvido nas reações de hipersensibilidade, enquanto IL-1 $\beta$  é mais importante na indução da febre, porém, ambas podem desencadear a febre por aumento da síntese de PGE2 pelo endotélio vascular do hipotálamo e pode estimular a produção de células T, bem como a liberação de histamina dos mastócitos no sítio da inflamação (SIMS e SMITH, 2010).

O Fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), foi descoberto em 1975 por Carswell et al. (1975) sendo considerada uma das principais citocinas relacionadas aos processos inflamatórios e imunes, agindo em diferentes partes do corpo. Ele é secretado por macrófagos, linfócitos e monócitos, sendo a presença de lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos o principal estímulo para que isto ocorra. No caso dos colesteatomas, juntamente com outras citocinas, o TNF- $\alpha$  favorece a destruição e a remodelação óssea. O principal estímulo para a sua produção é a presença de lipopolissacarídeos que compõem a membrana das bactérias gram negativas. Após ser produzido e liberado, o TNF- $\alpha$  irá ligar-se a receptores específicos denominados de receptores de TNF (TNF-R) I e II, para que possa produzir o efeito biológico. Os receptores de TNF (principalmente o TNF-RII) podem, ainda, desencadear o gatilho para a apoptose. Entretanto, o mecanismo que determinará qual efeito será dominante ainda não está totalmente esclarecido (ABBAS et al., 1998). Desta forma, o principal efeito fisiológico do TNF- $\alpha$  é promover a resposta imune e a inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de ativá-los, provocando uma série de efeitos no organismo (ABBAS et al., 1998, VITALE e RIBEIRO, 2007)

O TNF- $\alpha$ , quando liberado em baixas concentrações, age nas células endoteliais promovendo vasodilatação e estimulando-as a secretarem um grupo de citocinas (denominadas quimiocinas) que tem ação quimiotática em relação aos leucócitos, promovendo, desta forma, um processo inflamatório local que possibilita o combate a quadros infecciosos. No hipotálamo ele age como pirógeno endógeno induzindo febre,

enquanto que no fígado vai estimular a produção das proteínas da fase aguda do processo inflamatório e de fibrinogênio (ABBAS et al., 1998)

Além destes mediadores inflamatórios, alguns fatores que interferem com a transcrição gênica parecem ser alvos importantes para o controle do processo inflamatório. O fator nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) destaca-se pela sua vasta gama de ações e pelo fato de diversas proteínas estarem integradas na dinâmica de sua ativação (O'NEILL e KALTSCHMIDT, 1997).

O fator de transcrição NF-kB é um fator nuclear (NF) que foi descoberto em 1986, uma vez ativado por agentes como lipopolissacarídeos, possui a capacidade de ligar-se a uma seqüência de 10 pares de bases na região promotora do gene que codifica a cadeia leve k das moléculas de anticorpo das células B (kB) (SEN & BALTIMORE, 1986). É um heterodímero constituído de duas subunidades: p65 (também chamada RelA) e p50. (BAEUERLE & BALTIMORE, 1996; SIEBENLIST, 1997). É encontrado células como neurônios e microglia (KALTSCHIMITD et al., 1994), pode ser ativado por diversos estímulos pró inflamatórios, como, lipopolissacarídeos, citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral e a interleucina 1 $\beta$  (GLEZER et al., 2003; MUNHOZ et al., 2006). Regula a expressão de genes que controlam a adesão celular, proliferação a inflamação e o remodelamento do tecido (PASPARAKIS et al., 2006.)

Dados da literatura demonstram um papel dual do NFkB no SNC, pois em doenças degenerativas foi demonstrado que sua ativação em neurônios promove sua sobrevivência, e sua ativação em células da glia e imunes medeiam processos patológicos inflamatórios (CAMANDOLA e MATTSON, 2007).

A relevância do NFkB decorre da enorme quantidade de genes que sofrem regulação desse fator de transcrição, tais como a Óxido nítrico-sintase (NOS), interleucina 1 $\beta$ , TNF, I $\kappa$ B e genes relacionados a neuroproteção como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), também é reconhecido como um importante modulador dos processos de desenvolvimento, plasticidade, neurodegenerativos e inflamatórios (MATTSON e MEFFERT, 2006).

### **Óxido Nítrico (NO)**

O óxido nítrico (NO), produzido principalmente pelas células endoteliais do tecido lesionado, possui potente ação vasodilatadora, o que leva a um aumento da

permeabilidade vascular. Além disso, atua como regulador do recrutamento de leucócitos e exerce ação citotóxica contra microrganismos. É sintetizado pela NO sintase (NOS), enzima presente em três isoformas, sendo a forma indutível (iNOS) a envolvida nas reações inflamatórias. Esta é induzida em macrófagos e em outras células durante o processo (SAUTEBIN, 2000).

### **Células Th 17**

Os LTh17 representam um novo subtipo de LT efetores, são importantes na proteção contra infecção por microrganismos extracelulares. Originalmente foram descritos em modelos experimentais de doenças autoimunes como encefalite autoimune e artrite induzida por colágeno, que antes acreditava serem mediadas por células Th1. Esta nova via de diferenciação de células Th começou a ser elucidada com a descoberta da citocina IL-23 que, juntamente com IL-1 e IL-6, pode levar ao desenvolvimento de doenças autoimunes em modelos murinos por seu importante papel pró-inflamatório (MESQUITA et al., 2009).

Os LTh17 produzem citocinas IL-22, IL-26 e citocinas da família IL-17. As citocinas dessa família são potentes indutores da inflamação, induzindo à infiltração celular e produção de outras citocinas pró-inflamatórias (MESQUITA et al., 2009; CHEN et al., 2007). Quando a produção da IL-17 fica desregulada ela está diretamente associada a várias condições autoimunes, como: esclerose múltipla, doença intestinal inflamatória, psoríase e lúpus. Em pacientes com artrite reumatóide, os níveis de IL-17 encontrados estão aumentados na sinóvia, onde atua como um importante fator na ativação dos osteoclastos e na reabsorção óssea (MESQUITA et al., 2009; CHEN et al., 2007).

#### **2.4.2. *Fármacos utilizados na inflamação***

Atualmente, medicamentos encontram-se disponíveis para uso como analgésicos e/ou antiinflamatórios, como os corticosteróides e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs).

Os AINEs são utilizados principalmente no tratamento da inflamação, dor e edema, como também nas osteoartrites, artrite reumatoide e distúrbios músculo-esqueléticos. O mecanismo de ação dos compostos desta classe terapêutica envolve a inibição da enzima araquidonato ciclo-oxigenase (COX), a enzima-chave para a síntese dos prostanóides e tromboxanos. Desta forma, através da inibição da COX, os AINEs produzem os efeitos terapêuticos, mas também, numa maior ou menor extensão, alguns efeitos adversos como ulcerações, sangramentos, perfurações e obstruções gastrintestinais (BOMBARDIER et al., 2000; FITZGERALD et al., 2001) Atualmente, sabe-se que existem duas isoformas da enzima ciclo-oxigenase: COX-1 e COX-2. A primeira é uma enzima constitutiva, expressa na maioria dos tecidos do organismo, agindo na produção de prostaglandinas que controlam os processos fisiológicos normais. A segunda é não constitutiva e tem sua expressão aumentada, principalmente, nos processos inflamatórios. Os primeiros AINES desenvolvidos (indometacina, naproxeno, ibuprofeno, entre outros) eram inibidores não seletivos das isoformas de COX e, apesar de terem eficácia comprovada quanto ao efeito anti-inflamatório evidenciado, têm uso contínuo limitado devido a efeitos adversos gastrintestinais como displasia e dor abdominal, além de perfuração ou sangramento gastroduodenal em menor proporção. Esses efeitos adversos apresentados são oriundos da inibição da isoforma 1 da COX. Desse modo, a descoberta da segunda isoforma permitiu o desenvolvimento de uma subclasse de AINEs, os inibidores COX-2 seletivos, que apresentam o efeito terapêutico com a mesma eficácia, sem provocar os efeitos adversos indesejáveis oriundos da inibição da COX-1. Entre esses novos AINEs pode-se incluir celecoxibe, lumiracoxibe e etoricoxibe, indicados principalmente no tratamento da osteoartrite, artrite reumatóide, dor aguda e alívio dos sintomas de dismenorréia primária. (BOMBARDIER et al., 2000).

A aspirina é o AINE mais antigo e amplamente estudado, porém é considerado separadamente dos demais, por seu uso predominante no tratamento das doenças cardiovasculares e cérebro-vasculares, em doses baixas (HOWARD et al., 2004).

Outra classe de fármacos utilizada no controle da dor inflamatória é a dos glicocorticóides (GC). Esta classe possui um amplo espectro de indicações terapêuticas, porém tem seu papel central no tratamento de doenças nas quais estejam envolvidos mecanismos inflamatórios e ativação do sistema imunológico, sendo como fármacos antiinflamatórios a sua principal indicação (LONGUI, 2007). A maioria dos efeitos antiinflamatórios dos glicocorticóides é mediada via receptores de glicocorticóides

citossólicos (RGC), que são encontrados em cada célula do corpo e exercem uma variedade de ações fisiológicas afetando cada sistema do organismo (KIM & BRAR et al., 2009).

Os corticosteróides são o principal controle do processo inflamatório causado pela asma crônica. Ainda há uma grande dificuldade de se encontrar novas terapias com benefício terapêutico similar aos corticosteróides. A administração oral destas substâncias ocorre em pacientes diagnosticados com asma severa, embora sejam claros os efeitos colaterais adversos causados nos pacientes, levando a osteoporose, distúrbios metabólicos graves e alterando o crescimento e comportamento de crianças (WANNMACHER, 2006; BARNES, 2006). Uma forma de diminuir os efeitos colaterais sistêmicos é através da administração de corticoides por inalação. Este é o caso da beclometasona (Pulvinal®), budesonida (Pulmicort®) e fluticasona (Flutivate®), derivados sintéticos da cortisona. Recentemente, foi descoberta a ciclesonida (Alvesco®), um pro-fármaco ativado nas vias aéreas inferiores diminuindo, ainda mais, os efeitos adversos sistêmicos (MUTCH et al., 2007; BARNES, 2006).

Apesar destas classes de substâncias (AINEs e corticosteróides) apresentarem excelentes propriedades anti-inflamatórias e ser utilizado na terapêutica clínica, seu uso produz importantes efeitos colaterais. Tais efeitos incluem irritação gástrica que podem variar desde um simples desconforto até a formação de úlcera. Reações cutâneas variando de leves até mais graves e potencialmente fatais como a síndrome de Stevens-Johnson. Efeitos renais podendo causar insuficiência renal aguda, nefropatia analgésica pelo uso crônico. Outros efeitos menos comuns podem afetar o SNC, distúrbios da medula óssea e alterações hepáticas, porém se já houver comprometimento renal (ADCOCK et al., 2005).

Também temos hoje os fármacos anticitocinas, que provavelmente, representam o maior avanço para o tratamento de inflamação crônica grave em muitos anos. Com o uso desses agentes, o tratamento pode pela primeira vez, visar aspectos específicos na artrite reumatóide. Porém, são difíceis e caros de produzir, o que limita o seu uso (IKEDA et al., 2007).

Atualmente estão disponíveis os fármacos infliximabe e adalimumabe, que são anticorpos monoclonais quiméricos murino/humano contra TNF- $\alpha$ , o etanercepto, um receptor de TNF e anakinra, antagonista de IL-1 (RANG et al., 2007).

Os tratamentos da inflamação por AINES e glicocorticóides que são fármacos um tanto antigos, não tiveram tanto avanço nos últimos anos, em comparação com

outras áreas terapêuticas, como o tratamento da hipertensão por exemplo. O campo desses fármacos parece um tanto inexplorado. A recente controvérsia cercando sobre os efeitos cardiovasculares adversos e retirada do mercado de alguns inibidores seletivos da COX-2, foi um grande golpe para a área dos AINES (FITZGERALD e PATRONO, 2001).

Uma das poucas inovações nessa área tem sido a elaboração de complexos AINES-óxido nítrico, AINES convencionais com grupos doadores de NO fixados por ligações éster. Alguns destes fármacos ainda estão em fase de ensaios clínicos.

Assim, tanto a academia quanto a indústria farmacêutica tem voltado sua atenção aos produtos naturais, na busca de um fármaco efetivo no tratamento das doenças inflamatórias e com efeitos adversos reduzidos (WALLACE e MILLER, 2000).

## ***2.5. Modelos experimentais para desenvolvimento de novos medicamentos***

### ***2.5.1. Modelo de edema de pata induzido por carragenina***

É uma das técnicas mais utilizadas para avaliar a atividade anti-inflamatória, e consiste na avaliação de fármacos, derivados de plantas e/ou compostos com atividade em inibir o edema causado na pata traseira de camundongos pela injeção de um agente flogístico. Os mais utilizados são carragenina, formalina, dextrana, albumina, entre outros (LEBARS et al., 2001).

O uso da carragenina como agente flogístico apresenta inúmeras vantagens como, eficácia em níveis não tóxicos, baixa variabilidade e uma possível elaboração de curva-dose-resposta com fármacos de conhecida eficácia terapêutica (WINTER et al., 1962). O edema inflamatório induzido pela carragenina, que é um polissacarídeo obtido de algas marinhas da família da *Rhodophyciae*, é considerado um modelo padrão para determinar e avaliar a atividade anti-inflamatória (VAJJA et al., 2004).

Esse método consiste em induzir o edema na pata direita do camundongo e comparar com a pata contralateral, na qual é considerado o controle do método. Então o edema é considerado pela diferença do volume das patas, que é mensurado com o auxílio de um pletismômetro por um determinado período de tempo ou por um micrômetro (SHARMA et al., 2004).

A inibição do edema causado por carragenina envolve mecanismo relacionado com a síntese de prostaglandinas, em especial PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2</sub>α, sendo a atividade comparada ao anti-inflamatório não-esteroidal.

### ***2.5.2. Modelo de Pleurisia induzida por carragenina***

A pleurisia em camundongos induzida por carragenina permite a quantificação do volume e da concentração protéica do exsudato formado, além da avaliação da migração de células inflamatórias para a cavidade pleural (SHIVKAR & KUMAR 2004). Este tipo de modelo é utilizado na investigação da fisiopatologia da inflamação aguda e avaliação da eficácia de terapias anti-inflamatórias (ARRUDA et al., 2003).

### ***2.5.3. Modelo de edema de orelha induzido pela aplicação de óleo de cróton***

Esse modelo de edema é usado para avaliar a atividade anti-inflamatória aguda tópica.

A indução de uma inflamação aguda com o agente químico óleo de cróton em orelhas de camundongos tem sido utilizada como modelo para avaliação da ação anti-edematogênica de vários compostos (TUBARO et al., 1985). O óleo de cróton é um irritante vascular que provoca infiltração leucocitária de polimorfonucleares causando edema intercelular. A dermatite se caracteriza pela formação, na epiderme, de edema com pequenas vesículas ao lado de áreas de ulceração recobertas por exsudato fibrinoleucocitário. Na derme, além do edema, há infiltração inflamatória neutrofílica, congestão e dilatação de vasos e também de marginação leucocitária (SWINGLE et al., 1981).

### ***2.5.4. Aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO)***

Essa enzima é encontrada predominantemente em neutrófilos, monócitos e alguns subtipos de macrófagos teciduais. Representa mais de 5% do conteúdo protéico total da célula em neutrófilos e 1% nos monócitos (HANSSON et al., 2006),

É o principal constituinte dos grânulos azurófilos dos neutrófilos, prontamente liberada após ativação por diferentes agonistas, contribuindo para a defesa imune inata do organismo.

## **2.6. Alvos moleculares para doenças inflamatórias**

Apesar do grande número de anti-inflamatórios disponíveis atualmente para uso clínico, ainda não dispomos do anti-inflamatório ideal, com maior especificidade e de menor toxicidade. O desenvolvimento da biologia molecular tem contribuído para o grande progresso na descoberta das drogas anti-inflamatórias mais modernas. Uma das possibilidades é o desenvolvimento de fármacos com ação inibitória sobre enzimas específicas envolvidas na síntese dos mediadores inflamatórios, como as fosfolipases, lipoxigenase, ciclooxigenase-2 (COX-2) e calicreinas.

Os compostos conhecidos como drogas antiinflamatórias supressoras de citocinas estão sendo desenvolvidas no momento e acredita-se que as drogas inibidoras da produção das citocinas possam ser eficazes como analgésicos no controle da dor aguda e crônica.

Muitas doenças podem apresentar características inflamatórias como a doença de Crohn, artrite reumatóide, endotoxemia letal, colite, asma, câncer, doenças inflamatórias pulmonares (McCulloch et al., 2006; MOLFINO e JEFFERY, 2007). A maioria destas doenças tem alta incidência a altas taxas de mortalidade no mundo inteiro, inclusive no Brasil. Por exemplo, as doenças inflamatórias pulmonares estão em quinto lugar em doenças mais freqüentes em todo o planeta, sendo o gasto estimado com todas estas doenças muito elevado (MOLFINO & JEFFERY, 2007).



### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar o potencial anti-inflamatório do extrato metanólico das folhas e do alcalóide guanidínico isolado *N-1, N-2, N-3-triisopentenilguanidina* de *A. glandulosa* (Euphorbiaceae).

### **3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato e do composto *N-1, N-2, N-3-triisopentenilguanidina* em camundongos:
  - no edema agudo de pata induzido por carragenina em camundongos;
  - no aumento da atividade da mieloperoxidase induzido por carragenina em camundongos;
  - na pleurisia induzida por carragenina em camundongos;
  - na contagem total de leucócitos;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato no edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos.

#### 4 REFERENCIAS 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. *Antioxid Redox Signal* 7, 144-152.
- ABBAS A. K., LICHTMAN A. H., POBER J. S. Citocinas. In: *Imunologia celular e molecular*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter 1998, 253-276p.
- ADEREM A., SMITH K. D. 2004. A systems approach to dissecting immunity and inflammation. *Seminars in Immunology* 16, 55-67.
- ADEWUNMI C. O., AGBEDAHUNSI J. M., ADEBAJO A. C., ALADESANMI A. J., MURPHY N., WANDO J. 2001. Ethno-veterinary medicine: screening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties. *Journal Ethnopharmacology* 77, 19-24.
- AGBE S. A. O., OGUTIMEIN, B. 1987. Anti-trypanosomal activity of *Alchornea cordifolia*. *Phytotherapy Research* 1, 151-153.
- AJALI U. 2000. Antibacterial activity of *Alchornea cordifolia* stem bark. *Fitoterapia* 71, 436-438.
- ARRUDA V. A., GUIMARÃES A. Q., HYSLOP S., ARAÚJO M. F., BOM C., ARAÚJO A. L. 2003. *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom stimulates leukocyte migration into the peritoneal cavity of mice. *Toxicon* 41, 99-107.
- BARBO F. E., MEDA C. I., CLAUDIA M., YOUNG M., CORDEIRO I., BLATT C. T. T. 2002. Pentatronol from *Alchornea sidifolia* (Euphorbiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 30, 605-607.
- BARNES P. J. 2006. Drugs for asthma. *British Journal of Pharmacology* 147, 297- 303.
- BARROSO G. M. Sistemática de Angiospermas do Brasil. UFV Imprensa Universitária: Viçosa, 1984, vol. 2.
- BAEUERLE P. A. & BALTIMORE D. 1996. NF-kB: Ten years after. *Cell* 87, 13-20.
- BERLINCK R. G., BURTOLOSO A. C., TRINDADE-SILVA A. E., ROMMINGER S., MORAIS R. P., BANDEIRA K., MIZUNO C. M. 2010. The chemistry and biology of organic guanidine derivatives. *Natural Product Reports* 27, 1871-1907.
- BOMBARDIER C., LAINE L., REICIN A., SHAPIRO D., BURGOS-VARGAS R., DAVIS B., DAY R., FERRAZ M., HAWKEY C., HOCHBERG M. C., KVIEN T. K., SCHNITZER T. J. N. 2000. Comparison of Upper Gastrointestinal Toxicity of Rofecoxib and Naproxen in Patients with Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicinal* 343, 1520-1528.

- BUTLER M. S. 2008. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Natural Product Reports* 25, 475.
- BRUNETON J. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes medicinales*. 2.ed. Paris: Lavoisier. 1993.
- CALIXTO J. B. 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin América. A personal view. *Journal Ethnopharmacology* 100, 131-134.
- CALVO T. R., LIMA Z. P., SILVA J. S., BALLESTEROS K. V. R., PELLIZZON C. H., HIRUMA-LIMA C. A., TAMASHIRO J., BRITO A. R. M. S., TAKAHIRA R. K., VILEGAS W. 2007. Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 30, 451-459.
- CAMONDOLA S., MATTSON MP. 2007. NF-Kappa-B as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 11, 123-32.
- CARSWELL E. A., OLD L. J., KASSEL R. L., GREEN S., FIORE N., WILLIAMSON B. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72, 3666.
- CHEN Z., TATO C. M., MUUL L., LAURENCE A., O'SHEA J. J. 2007. Distinct Regulation of Interleukin-17 in Human T Helper Lymphocytes. *Arthritis & Rheumatis* 56, 2936.
- CONEGERO L. S., IDE R. M., NAZARI A. S., SARRAGIOTTO M. H., FILHO B. P. D., NAKAMURA C. V., CARVALHO J. E., FOGGIO M. A. 2003. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). *Química Nova* 26, 825-827.
- COUTAUX, A., ADAM, F., WILLER, J. C., LE BARS, D. 2005. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine* 72, 359-371.
- CORRÊA M. P. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1984, vol. 1.
- CRAGG G. M., NEWMAN D. J., SNADER K. M. 1997. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products* 60, 52-60.
- CRIADO P. R., CRIADO R. F. J., MARUTA C. W., MACHADO FILHO C. A. 2010. Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: novos conceitos, *Anais Brasileiros de Dermatologia* 85, 195-210.
- DINARELLO, C. A. 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual review of immunology* 27, 519-50.

- EBI G. C., 2001. Antimicrobial activities of *Alchornea cordifolia*. *Fitoterapia* 72, 69-72.
- FITZGERALD G. A, PATRONO C. 2001. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *New England Journal of Medicine* 345, 433-442.
- FITZGERALD J. R., STURDEVANT D. E., MACKIE S. M., GILL S. R., MUSSER J. M. 2001. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 8821–8826.
- GILROY D. W., LAWRENCE, T., PERRETTI M., ROSSI A. G. 2004. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nature Reviews* 3, 104-416.
- GLEZER I, MUNHOZ C. D., KAWOMOTO E. M., MARCOURAKIS T., AVELLAR M. C, 2003. MK-801 and 7-Ni attenuate the activation of brain NF-kappa B induced by LPS. *Neuropharmacology* 45, 1120-1129.
- HANSSON M., OLSSON I., NAUSEEF W. M. 2006. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 445, 214-24.
- HART N. K., JOHNS S. R., LAMBERTO N. J. A., WILLING R. J. 1970. *Australian Journal of Chemistry* 23, 1679.
- HARVEY A. L. 2008. Natural products in drug discovery. *Drug Discov Today* 13, 894.
- HILÁRIO M. O. E., TERRERI M. T., LEN C. A. 2006. Anti-inflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. *Journal of Pediatrics* 82, 206-212
- HOSTETTMANN k., QUEIROZ E. F., VIEIRA P. C. *Princípios ativos de plantas superiores*. 2003, vol. IV.
- HOWARD R. D., DEWOODY J. A., MUIR W. M. 2004. Transgenic male mating advantage provides opportunity for Trojan gene effect in a fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 2934–2938.
- IKEDA K., COX S., EMERY P. 2007. Aspects of early arthritis. *Biological therapy in early arthritis – overtreatment or the way to go?* *Arthritis Research & Therapy* 9, 211-221.
- ITOKAWA H., SHI Q., AKIYAMA T., MORRIS-NATSCHKE S. LEE K. 2008. Recent advances in the investigation of curcuminoids. *Chinese Medicine* 3, 1-13.
- JAFFER U., WADE R. G., GOURLAY T. 2010. Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review, *HSR Proceedings in Intensive Care and Cardiovascular*. *Anesthesia* 2, 161-175.

- JONNAKUTY C., GRAGNOLI C. 2008. What Do We Know About Serotonin? *Journal of Cellular Physiology* 217, 301–306.
- KALTSCHMIDT C, KALTSCHMIDT C, NEUMANN H, WERERTE H, BAEUERTE PA. 1994. Constitutive NF kappa B activity in neurons. *Molecular Cell Biology* 14, 3981-92.
- KATZUNG B.G. *Farmacologia básica e clínica*, 10 ed., AMGH, Porto Alegre, 2010.
- KANTARCI O. H., GORIS A. ET AL. 2005. IFNG polymorphisms are associated with gender differences in susceptibility to multiple sclerosis. *Genes & Immunity* 6, 153-161.
- KHONG-HUU F., LE FORESTIER J. P., GOUTAREL R. 1972. *Tetrahedron* 28, 520.
- KIM K., BRAR P., JAKUBOWSKI J., KALTMAN S., LOPEZ E. 2009. The use of corticosteroids and nonsteroidal antiinflammatory medication for the management of pain and inflammation after third molar surgery: a review of the literature. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics* 107, 630-40.
- KINDT T. J., GOLDSB R. A., OSBORNE B. A. *Imunologia de Kuby*, Artmed, Porto Alegre, 2008.
- KUMAR V., ABBAS A. K., FAUSTO N. In: KUMAR V., ABBAS A. K., FAUSTO N(Eds.). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, seventh ed., Elsevier Saunders, Philadelphia, 2005, 47-86p.
- LAMIKANRA A.; OGUNDAINI A. O., OGUNGBAMILA F. O. 1990. Antibacterial constituents of *Alchornea cordifolia* leaves. *Phytotherapy Research* 4, 198.
- LEBARS D., GOZARIU M., CADDEN S. W. 2001. Animal models of nociception. *Pharmacology* 53, 597-652.
- LONGUI C. A. 2007. Glucocorticoid therapy: minimizing side effects. *Journal of Pediatrics* 83, 163-171.
- LOPES F. C., CALVO T. R., VILLEGAS W., CARLOS I. Z. 2005. Inhibition of hydrogen peroxide, nitric oxide and TNF-alpha production in peritoneal macrophages by ethyl acetate fraction from *Alchornea glandulosa*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28, 1726-30.
- LOPES F., ROCHA A., PIRRACO A., REGASINI L., SIQUEIRA J., SILVA D., BOLZANI V., CARLOS I., SOARES R. 2011. *Alchornea gladulosa* ethyl-acetate fraction exhibits anti-angiogenic activity: preliminary findings from in vitro assay using HUVEC. *Journal of Medicinal Food* 14, 1244-53

- MAJNO G. & JORIS I. 2004. Cells, Tissues and Disease: Principles of General Pathology. Principles of General Pathology 1040.
- MATTSON M. P., MEFFERT M. K. 2006. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death and Differentiation* 13, 852-60.
- McCULLOCH C. A., DOWNEY G. P., EL-GABALAWY H. 2006. Signalling Platforms That Modulate The Inflammatory Response: New Targets For Drug Development. *Nature drug discovery review* 5.
- MEDZHITOV R. 2010. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 140, 771-776.
- MESQUITA Jr. D, CRUVINEL W. M, CÂMARA N. O. S, KÁLLAS E. G, ANDRADE L. E. C. 2009. Autoimmune diseases in the TH17 era. *Brazilian Journal of Medical and Biological research* 42, 476-486.
- MOLFINO N. A, JEFFERY P. K. 2007. Chronic obstructive pulmonary disease: Histopathology, inflammation and potential therapies. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 20, 462-72.
- MUNHOZ C. D., LEPSCH L. B., KAWAMOTO E. M., MALTA M. B., DE SÁ LIMA L., AVELLAR M. C., SAPOLSKY R. M., SCAVONE C. 2006. Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappa-B in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. *Journal of Neuroscience* 26, 3813-20.
- MUSTOFA M., VALENTIN A., BENOIT-VICAL F., PELISSIER Y., KONE-BAMBA D., MALLIE M., 2000. Antiplasmodial activity of plant extracts used in west African traditional medicine. *Journal Ethnopharmacology* 73, 145-151.
- MUTCH E., NAVE R., MCCRACKEN N., ZECH K., WILLIAMS F. M. 2007. The role of esterases in the metabolism of ciclesonide to desisobutyryl-ciclesonide in human tissue. *Biochemical Pharmacology* 73, 1657-1664.
- NEWMAN D. J., CRAGG G. M. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal Natural Products* 70, 461-77.
- OGUNDIPE O., MOODY J. O., HOUGHTON P. J., ODELOLA H. A. 2001. Bioactive chemical constituents from *Alchornea laxiflora* (Benth) Pax and Hoffman. *Journal Ethnopharmacology* 74, 275-280.
- O'NEILL LAJ, KALTSCHMIDT C. 1997. NF-kB: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *TINS* 20, 252-8.

- PASPARASKIS M, LUEDDE, SCHIMIDT-SUPRIAN. 2006. Dissection of the NF-KappaB signaling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell death and differentiation* 13, 861-72.
- PELT J. M. Drogues et plantes Magiques, Fayardd, Paris, 1983.
- PINTO A. C., SILVA D. H. S., BOLZANI V. S., LOPES N. P., EPIFANIO R. A. 2002. Um olhar holístico sobre a química de produtos naturais brasileira. *Química Nova* 25, 45.
- PONS R., SANTAMARIA P., SUCHANKOVA J., CORTIJO J., MORCILLO E. J. 2000. Effects of inhaled glaucine on pulmonary responses to antigen in sensitized guinea pigs. *European Journal of Pharmacology* 397, 187-195.
- RANG H. P., DALE M. M., RITTER J. M., FLOWER R. J. *Pharmacologia*, 6 ed. Elsevier. 2007.
- SAUTEBIN L. 2000. Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy. *Fitoterapia* 71, 48-57.
- SAKLANI & KUTTY. 2008. Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug discovery today* 1, 161-71.
- SEN R. & BALTIMORE D. 1986. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46, 705-16.
- SETZER W. N.; SHEN X. M., BATES R. B., BURNS J. R., MCCLURE K. J., ZHANG P., MORIARITY D. M., LAWTON R. O. 2000. A phytochemical investigation of *Alchornea latifolia*. *Fitoterapia* 71, 195.
- SHARMA J. N., SAMUD A. M., ASMAWI M. Z. 2004. Comparison between plethysmometer and micrometer methods to measure acute paw oedema for screening anti-inflammatory activity in mice. *Inflammopharmacology* 2, 89-94.
- SHEERAN P., HALL G. M. 1997. Cytokines in anaesthesia. *British Journal Anaesthesia* 78, 201-219.
- SHERWOOD E. R., TOLIVER-KINSKY T. 2004. Mechanisms of the inflammation response. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* 18, 385-405.
- SIEBENLIST U. 1997. NF-kB/IkB proteins. Their role in cell growth, differentiation and development. *Biochimica et Biophysica Acta* 1332, 7-13.
- SIMS J. E., SMITH D. E. 2010. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature Reviews Immunology* 10, 89-102.
- SIMÕES, C. M. *Farmacognosia - da Planta ao Medicamento* 5ª ed., Editora da UFSC: Santa Catarina, 2004.

- SHIVKAR Y. M., KUMAR V. L. 2004. Effect of anti-inflammatory drugs on pleurisy induced by latex of *Calotropis procera* in rats. *Pharmacology Research* 50, 335-340.
- SYRIÁTOWICZ J. P., HU D., WALKER J. S., TRACEY D. J. 1999. Hyperalgesia due to nerve injury: role of prostaglandins. *Neuroscience* 94, 587-594.
- SOMMER C., KRESS M. 2004. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neuroscience Letters* 361, 184-187.
- SWINGLE K. F., REITER M. J., SCHWARTZMILLER D. H. 1981. Comparison of croton oil and cantharidin induced inflammations of the mouse ear and their modification by topically applied drugs. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie* 254, 168-76.
- TONA K., KAMBU K., MESIA K., CIMANGA K., DE BRUYNE T., PIETERS L., TOTTE J., VLIENTINCK A. J. 1999. Biological screening of traditional preparations from some medicinal plants used as antidiarrhoeal in Kinshasa, Congo. *Phytomedicine* 6, 59.
- TONA L., KAMBU K., NGIMBI N., CIMANGA K., VLIETINCK A. J. 1998. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *Journal Ethnopharmacology* 61, 57-65.
- TUBARO A., DRI P., DELBELLO G., ZILLI C., LOGGIA R. D. 1985. The croton oil ear test revisited. *Agents Actions* 17, 347-349.
- URREA-BULLA A., SUÁREZ M., MORENO-MURILLO B. 2004. Biological activity of phenolic compounds from *Alchornea glandulosa*. *Fitoterapia* 75, 392-394.
- VAJJA B. N. L., JULURI S., KUMARI M., KOLE L., CHAKRABARTI R., JOSHI V. D. 2004. Lipopolysaccharide – induced paw edema model for detection of cytokine modulating anti-inflammatory agents. *International Immunopharmacology* 4, 901-909.
- VANEGAS, H. 2004. To the descending pain-control system in rats, inflammation-induced primary and secondary hyperalgesia are two different things. *Neuroscience Letters* 361, 225-228.
- VERRI Jr W.A., CUNHA T. M., PARADA C. A., POOLE F. Q. C., FERREIRA S. H. 2006. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? *Pharmacology & Therapeutics* 112, 116-138.
- VITALE R. F., RIBEIRO F. A. Q. 2007. O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. *Revista Brasileira Otorrinolaringologia* 73, 123-127.



WALL M. E. & WANI M. C. 1996. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *Journal Ethnopharmacology* 51, 239-54.

WALLACE J. L., MILLER M. J. 2000. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology* 119, 512-20.

WAGNER A. D. 1999. Working Memory Contributions to Human Learning and Remembering. *Neuron* 22, 19–22.

WANNMACHER L 2006. Tratamento medicamentoso da asma em crianças. *Uso racional de medicamentos: temas selecionados* ISSN 1810-0791, 3, 9.

WINTER C. A., RISLEY E. A., NUSS G. W. 1962. Carrageenan induced odema in hind paw of rats as an assay for anty-inflammatory drugs. *Biology and Medicine* 111, 544-7.

---

### 5.1 Artigo científico submetido - Journal of Ethnopharmacology

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

Journal of Ethnopharmacology

**Anti-inflammatory activity of methanolic extract of the leaves and guanidine alkaloid *N-1, N-2, N-3-triisopentenylguanidine* from *Alchornea glandulosa* in mice**

Frederico Formagio-Neto<sup>a</sup>, Anelise Samara Nazari Formagio<sup>b</sup>, Maria Helena Sarragiotto<sup>c</sup>, Maria do Carmo Vieira<sup>b</sup>, Candida Aparecida Leite Kassuya<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Federal University of Grande Dourados, College of Health Science, Dourados, MS, Brazil

<sup>b</sup> Federal University of Grande Dourados, College of Agricultural Science, Dourados, MS, Brazil

<sup>c</sup> Maringá State University, Chemistry Department, Maringá, PR, Brazil.

\* Corresponding author. Address for correspondence: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados - Itaum, km 12, Dourados, Mato Grosso do Sul, CEP 79804-970, Brazil. Phone: + 55 67 34102327. Fax: + 55 67 34102320. E-mail: [candida2005@gmail.com](mailto:candida2005@gmail.com)

**ABSTRACT**

**ETHNOPHARMACOLOGICAL RELEVANCE:** *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae) has traditionally been used in folk medicine for the treatment of inflammatory diseases and as an antiulcer agent. This specie can be distributed from southeast to south of Brazil, mainly in the Atlantic Forest and Cerrado. Previous phytochemical studies revealed the presence of compound the guanidine alkaloid *N*-1, *N*-2, *N*-3-triisopentenylguanidine in *A. glandulosa*.

**AIM OF STUDY:** This work aimed to evaluate the anti-inflammatory of methanolic extract from leaves of *A. glandulosa* (MEAG) as well as the isolated compound the guanidine alkaloid *N*-1, *N*-2, *N*-3-triisopentenylguanidine in experimental *in vivo* models of inflammation in mice.

**MATERIALS AND METHODS:** The effect of MEAG and *N*-1, *N*-2, *N*-3-triisopentenylguanidine was studied in the following experimental models: carrageenan-induced paw oedema and increase in myeloperoxidase (MPO) activity, croton-oil-induced ear oedema, carrageenan-induced leukocyte migration in pleurisy model.

**RESULTS:** Different groups of animals orally treated with MEAG (100 and 300 mg/kg) or with *N*-1, *N*-2, *N*-3-triisopentenylguanidine (5 and 30 mg/kg) were submitted to carrageenan-induced paw oedema inducing significantly decrease in paw oedema and in MPO activity when compared to control groups. The guanidine alkaloid *N*-1, *N*-2, *N*-3-triisopentenylguanidine that was isolated from MEAG and *N*-1, *N*-2, *N*-3-triisopentenylguanidine (5 and 30 mg/kg) inhibited the paw oedema and in MPO activity in carrageenan induced paw edema model. In carrageenan induced pleurisy, the oral treatment with MEAG (100 or 300 mg/kg) or with *N*-1, *N*-2, *N*-3-triisopentenylguanidine (5 and 30 mg/kg) are able to reduce significantly the migration of total leukocyte or interfere with plasma leakage in mice. Finally the topical

application of MEAG inhibited in a significant way the ear oedema induced by croton oil.

**CONCLUSIONS:** The results showed that crude methanolic extract of *A. glandulosa* exhibited oral and topical anti-inflammatory activity and these properties observed may be due, at least in part, to the presence of bioactive constituents such as the guanidine alkaloid *N*-1, *N*-2, *N*-3-triisopentenylguanidine.

**Keywords:** *Alchornea glandulosa*; Euphorbiaceae; guanidine alkaloid; inflammation.

## 1 Introduction

*Alchornea glandulosa* POEPP. & ENDL. (Euphorbiaceae) (sinon. *Alchornea irucurama* Casar), popularly known as “amor seco”, “tanheiro-de-folha-redonda”, “tanheiro” or “cana-raposa” is found in the southern and southwestern regions of Brazil, mainly in the Atlantic pluvial forest (Lorenzi 1998). Some plants from this genus have been used in folk medicine are commonly for the treatment of inflammatory and gastric diseases (Osabede & Okoye 2003). Concerning the pharmacologic effects, extracts and compounds from *Alchornea* genus exhibited antimicrobial (Abo et al., 1999, Ajali 2000, Ebi, 2001), antiamoebic, antispasmodic, antidiarrheic (Tona et al., 1998; 1999) and antifungal activities (Barbo et al., 2002). Trypanocidal activity and activity against *Plasmodium falciparum* (Adewunmi et al., 2001; Mustofa et al., 2000), cytotoxic activity against the cancer cell lines Hep-G2 and A-431 and potently inhibits topoisomerase II (Setzer et al., 2000) have also been reported.

Phytochemical studies reported that *A. glandulosa* contains sitosterol, stigmasterol, loliolide, *N*-1, *N*-2, *N*-3-triisopentenylguanidine, corilagin, gallic acid,

ethyl and methyl gallate, amentoflavone, pterogynidine and glycosylated derivatives of quercetin, kaempferol and myricetin (Conegero et al., 2003; Urrea-Bulla et al., 2004, Calvo et al., 2007) as major constituents. Pharmacological studies of extract of *A. glandulosa* leaves showed antiulcer properties (Calvo et al., 2007), *in vitro* anti-inflammatory (Lopes et al. 2005), and antiangiogenic activity (Lopes 2011).

The use of medicinal plants contributes significantly to primary health care, especially in developing countries (WHO, 2003). Furthermore, the role of medicinal plants and traditional medicine for developing new drugs is incontestable (Rates, 2001).

Previous scientific research reported the isolation of alkaloids from *A. glandulosa* (Conegero et al., 2003). Hence, aiming to continue working with the phytochemical and biological evaluations of this species, we investigated the ability of methanolic extract and alkaloid guanidine *N*-1, *N*-2, *N*-3-triisopentenylguanidine the *A. glandulosa* for anti-inflammatory activity in some experimental models of inflammation.

## **2 Materials and methods**

### *2.1 Chemical, kits and reagents*

$\lambda$ -Carrageenan, Tween 80%, dexamethasone, ethylenediaminetetracetic sodium salt (EDTA), were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

### *2.2 Plant material*

The methanolic extract (MEAG) and compound *N*-1, *N*-2, *N*-3-triisopentenylguanidine (AG-1) were obtained from *A. glandulosa* leaves, and their structures were established based on spectroscopic studies (Conegero et al., 2003).

The MEAG and AG-1 obtained was dissolved in Tween 80 to administration at doses of 100 and 300 mg/kg (MEAG) and 5 and 30 mg/kg (AG-1). The vehicle is a solution 0.9% saline with Tween 80.

### 2.3 *Animals*

The experiments were conducted using male *Swiss* (20-25g, n=6) 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 UFGD (Nbr. 19/2012).

### 2.4 *Carrageenan-induced paw oedema*

Different groups of mice were orally treated (1 hour before intrapleural injection) with vehicle, MEAG (100 or 300 mg/kg), and AG-1 (5 or 30 mg/kg). Another group of mice were treated subcutaneously (0.5 hour before subcutaneously injection) with the anti-inflammatory drug dexamethasone (1 mg/kg). The animals received a 50  $\mu\text{L}$  s.c. injection into the right hindpaw of carrageenan (300  $\mu\text{g/paw}$ ) suspended in sterile 0.9% saline. The contralateral paw received only saline and was used as control. The thickness of the paw oedema was measured using a digital micrometer (DIGIMESS 110-284) 1h before any treatment and at different time points (0.5, 1, 2, and 4) after the injection of carrageenan. Results were expressed in  $\mu\text{m}$  and

the difference between basal and post-injection values quantified as oedema (Henriques et al., 1987, Kassuya et al., 2009).

### *2.5 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 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% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 was expressed as mOD per mg of protein.

### *2.6 Pleural cell migration*

Different groups of mice were orally treated (1 hour before intrapleural injection) with vehicle, MEAG (100 or 300 mg/kg), and AG-1 (5 or 30 mg/kg). Another group of mice were treated subcutaneously (0.5 hour before intrapleural injection) with the anti-inflammatory drug dexamethasone (1 mg/kg). Pleurisy was induced by the intrapleural injection of 100 µL of 1% carrageenan as previously described (Velo, et al, 1973). Briefly, an adapted needle was inserted into the right side

of the thoracic cavity of the animals to enable intrapleural (i.p.) administration of carrageenan. Naive mice received an equal volume (100 $\mu$ L) of sterile, pyrogenfree saline. After 4 h, the animals were killed and the pleural cavity was washed with 1mL of phosphate-buffered saline (PBS). The exudate volume was measured, and an aliquot of 20  $\mu$ L was diluted in Turck solution (1:20) and used to determine the total number of leukocytes in a Neubauer chamber. Total cell count was performed under light microscopy and the results are reported as the number of cells per ml of pleural fluid.

### *2.7 Croton-oil induced ear oedema in mice*

The MEAG (1 mg/ear) the vehicle or dexamethasone were topical administered to mice 15 min in right ear prior to the application of croton oil. A total of 25  $\mu$ L of 0.3% croton oil (dissolved in acetone) was topically applied to the inner surface of the right ear of each mouse. The left ear remained untreated as negative control.

### *2.8 Statistical analysis*

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

## **3. Results**

The methanolic extract and alkaloid guanidine isolated (Fig. 1) from leaves of *A. glandulosa* were evaluated in assays carrageenan-induced paw oedema, determination



of myeloperoxidase (MPO) activity, pleural cell migration and protein exudation, croton-oil induced ear oedema in mice.

### *3.1 Effects of MEAG and AG-1 on carrageenan-induced paw oedema*

The injection of carrageenan in the paw induced an oedema that peaked at 2 h (Fig. 2C). The oral treatment with MEAG (100 and 300 mg/kg) significantly inhibited oedema formation. The inhibitions were of  $76 \pm 5\%$  and  $79 \pm 3\%$  at doses of 100 and 300 mg/kg, respectively (Fig. 2C). In addition, the inhibition observed in dexamethasone-treated group was  $51 \pm 10\%$  after 2 h of the injection of carrageenan in the paw (Fig. 2C).

The oral treatment with AG-1 (5 and 30 mg/kg) significantly inhibited oedema formation. The maximal inhibitions were achieved at 120 min time points of  $65 \pm 3\%$  and  $36 \pm 6\%$  at doses of 5 and 30 mg/kg, respectively (Fig. 3C). In addition, the inhibition observed in dexamethasone-treated group was  $40 \pm 5\%$  after 2 h of the injection of carrageenan in the paw (Fig. 3C).

### *3.2 Effects of MEAG and AG-1 on carrageenan-induced increase in MPO activity*

The injection of carrageenan (300  $\mu\text{g}/\text{paw}$ ) increased about 2 x the MPO activity after 6 hours (Figure 4A). The oral treatment with MEAG with both doses of 100 and 300 mg/kg decreased significantly the increasing of MPO activity induced by carrageenan. The Fig. 4B showed that oral treatment with dose of 5 and 30 mg/kg of AG-1 inhibited about  $82 \pm 8\%$  and  $44 \pm 5\%$  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  $46 \pm 4\%$  (Fig. 4B).

### 3.3 Effects of MEAG and AG-1 on carrageenan-induced pleurisy

Figure 5A demonstrated that the administration of MEAG orally decreased cell migration, at dose of 100 and 300 mg/kg, with a maximum inhibition of  $64 \pm 9\%$  of  $68 \pm 16\%$  when compared with the control group, 4 hours after the carrageenan injection.

In relation to AG-1 administration, both doses of 5 and 30 mg/kg by oral route inhibited the leukocyte migration, with inhibitions of  $61 \pm 5\%$  and  $85 \pm 5\%$  respectively (Fig. 5B).

### 3.4 Effects of MEAG on croton oil-induced ear oedema

Topical application of croton oil-induced edema at the ears of mice and significant increase in the diameter of treated right ear when compared with the untreated left ear. As shown in Fig. 6, the oral administration of MEAG (1 mg/ear) produced reduction of ear edema in mice. The edema inhibitory rates of MEAG were  $24 \pm 2\%$  of  $17 \pm 2\%$  respectively.

## 4. Discussion

The present study showed inhibitory inflammation properties of oral treatment of methanolic extract of the leaves and the guanidine alkaloid *N*-1, *N*-2, *N*-3-triisopentenylguanidine obtained from *A. glandulosa*, a popularly plant used as an antiulcer agent and against inflammatory diseases in Brazil (Osabede & Okaye 2003). Furthermore, the anti-inflammatory effect, especially in inhibition of leukocyte migration, of the crude extract which has been used by the population as a natural remedy to treat infectious or inflammatory conditions. These facts lead us to investigate the potential anti-inflammatory effect of this plant. Our study corroborated with others

(Lopes et al., 2005) showing the ability of the extract and guanidine alkaloid *N*-1, *N*-2, *N*-3-triisopentenylguanidine from *A. glandulosa* in inhibiting the oedema and leukocyte migration induced by carrageenan in the paw and in the pleura.

The potential anti-inflammatory properties of medicinal plants experimentally induced in rodent's uses the digital micrometer methodology (Sharma et al., 2004) and were evaluated by myeloperoxidase activity that indicated indirectly the leukocyte migration (De Young, 1989). The neutrophils are rich in myeloperoxidase and these cells are important cells in host defense synthesizing several mediators that contribute to inflammatory process. The marked increase in the myeloperoxidase activity (indirect evidence for neutrophil influx) into the paw indicated an inflammatory process induced by carrageenan. The MEAG given by oral route inhibited oedema formation, and myeloperoxidase activity instead of only oedema. Lopes and cols (2005) showed that ethyl acetate fraction (AGF) from *A. glandulosa* leaves inhibited the nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) production in peritoneal macrophages activated with lipopolysaccharide (LPS) or phorbol myristate acetate (PMA). It was also showed that incubation of HUVEC with pterogynidine isolated the *A. glandulosa* resulted in reduced NF $\kappa$ B activity (Lopes et al. 2011). Our study corroborated with study of *in vitro* anti-inflammatory properties and extended the literature of *A. glandulosa* with *in vivo* anti-inflammatory action.

Chemical investigation of the leaves of *A. glandulosa* afforded sitosterol, stigmasterol, the terpenoid loliolide, the guanidine alkaloid *N*-1, *N*-2, *N*-3-triisopentenylguanidine (AG-1), the phenolics and flavonoids compounds (Conegero et al., 2003). Flavonoids present in MEAG, quercetin has proven anti-inflammatory activity, suggesting the importance of a free hydroxyl at 3-position and an unsaturation situated between C-2 and C-3 in the nucleus flavonoid to an inhibitory action the MPO.

The phenolics compounds, methyl and ethyl gallate, showed an anti-inflammatory activity in carrageenan-induced paw edema and in TPA-induced ear edema (Gorzalczany et al., 2011; Kim et al., 2006). Methyl gallate have been demonstrated to possess activity antitumor (Lee et al., 2010), antibacterial (Choi et al., 2008), antiviral (Kane et al., 1988), analgesic (Chae et al., 2010) among other. Once the MEAG has anti-inflammatory activity the isolation and identification of the AG-1 was done (Conegero et al., 2003). The chemical structure of guanidine alkaloid, N-1, N-2, N-3-triisopentenylguanidine (Fig. 1), have amine groups and imine. Presents features replacement isoprenilic of type tipo N-1, N-2, N-3-triisoprenil, which gives lower polarity and lower water solubility relative to the replacement pattern of type N, N-diisoprenil (Regasini et al., 2008). The AG-1 exhibited also antedematogenic and anti-inflammatory action, showing, at least in part, responsible by MEAG anti-inflammatory effect. The effect the AG-1 may be related the relative acidity of amine group's hydrogen.

The MEAG and AG-1 was evaluated in direct leukocyte migration pleurisy model of carrageenan induced inflammation. The results corroborated with observed in paw edema showing the anti-inflammatory efficacy induced by MEAG and AG-1. Thus, the study showed that oral administration of MEAG and AG-1 reduces, in a dose-dependent manner, leukocyte migration and plasma leakage.

This is the study showed that preparations obtained from *A. glandulosa*, and the guanidine alkaloid N-1, N-2, N-3-triisopentenylguanidine, are able to cause inflammation reduction in mice, and the guanidine alkaloid N-1, N-2, N-3-triisopentenylguanidine may be not the only active compound, but it showed activity and certainly contributed to anti-inflammatory effect of raw extract.

## 6. Acknowledgements

The authors are grateful to FUNDECT, UFGD/FCA, UFGD/FCS, CAPES for providing a research grant and fellowships.

## 7. References

- Abo, K.A., Ashidi, J.S., 1999. Antimicrobial screening of *Bridelia micrantha*, *Alchornea cordifolia* and *Boerhavia diffusa*. South African Journal of Medical Sciences 28, 167-169.
- Adegunmi, C.O., Agbedahunsi, J.M., Adebajo, A.C., Aladesanmi, A.J., Murphy, N., Wando, J. 2001. Ethno-veterinary medicine: screening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties. Journal Ethnopharmacology 77, 19-24.
- Ajali, U. 2000. Antibacterial activity of *Alchornea cordifolia* stem bark. Fitoterapia 71, 436-438.
- Barbo, F.E., Meda, C.I., Claudia, M., Young, M., Cordeiro, I., Blatt, C.T.T. 2002. Pentatronol from *Alchornea sidifolia* (Euphorbiaceae). Biochemical Systematics and Ecology. 30, 605-607.
- Calvo, T.R., Lima, Z.P., Silva, J.S., Ballesteros, K.V.R., Pellizzon, C.H., Hiruma-Lima, C.A., Tamashiro, J., Brito, A.R.M.S., Takahira, R.K., Vilegas, W. 2007. Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. Biological and Pharmaceutical Bulletin 30, 451-459.
- Chae, H.S., Kang, O.H., Choi, J.G., Oh, Y.C., Lee, Y.S., Brice, O.O., Chong, M.S., Lee, K.N., Shin, D.W., Kwon, D.Y. 2010. Methyl gallate inhibits the production of interleukin-6 and nitric oxide via down-regulation of extracellular-signal regulated protein kinase in RAW 264.7 cells. American Journal of Chinese Medicine 38, 973-983.
- Choi, J.G., Kang, O.H., Lee, Y.S., Oh, Y.C., Chae, H.S., Jang, H.J., Kim, J.H., Sohn, D.H., Shin, D.W., Park, H., Kwon, D.Y., 2008. In vitro activity of methyl gallate isolated from galla rhois alone and in combination with ciprofloxacin against

- clinical isolates of salmonella. *Journal of Microbiology & Biotechnology* 18, 1848-1852.
- Conegero, L.S., Ide, R.M., Nazari, A.S., Sarragiotto, M.H., Filho, B.P.D., Nakamura C.V., Carvalho, J.E., Foglio, M.A. 2003. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). *Química Nova* 26, 825-827.
- 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.
- Ebi, G.C. 2001. Antimicrobial activities of *Alchornea cordifolia*. *Fitoterapia* 72, 69-72.
- Gorzalczany S., López P., Acevedo C., Ferraro G. 2011. Anti-inflammatory effect of *Lithrea molleoides* extracts and isolated active compounds, *Journal Ethnopharmacology*. 133,994-998.
- Gorzalczany, S., López, P., Acevedo, C., Ferraro, G. 2011. Anti-inflammatory effect of *Lithrea molleoides* extracts and isolated active compounds *Journal Ethnopharmacology* 133, 994-998.
- Henriques, M.G., Silva, P.M., Martins, M.A, Flores, C.A, Cunha, F.Q, Assreuy-Filho, J., Cordeiro, R.S. 1987. Mouse paw edema. A new model for inflammation? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 20, 243-9.
- Lee, H., Kwon, Y., Lee, J.H., Kim, J., Shin, M.K., Kim, S.H., Bae, H., 2010. Methyl gallate exhibits potent antitumor activities by inhibiting tumor infiltration of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal of Immunology* 185, 6698-6705.
- Lorenzi H., “Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil,” 3rd ed., Plantarum, São Paulo, 1998.
- Lopes, F., Rocha, A., Pirraço, A., Regasini, L., Siqueira, J., Silva, D., Bolzani, V., Carlos, I., Soares, R. 2011. *Alchornea glandulosa* ethyl-acetate fraction exhibits anti-angiogenic activity: preliminary findings from in vitro assay using HUVEC. *Journal Medicinal Food* 14, 1244-53
- Lopes, F.C., Calvo, T.R., Vilegas, W., Carlos, I.Z. 2005. Inhibition of hydrogen peroxide, nitric oxide and TNF-alpha production in peritoneal macrophages by ethyl acetate fraction from *Alchornea glandulosa*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28, 1726-30.
- Kassuya, C.A., Cremoneze, A., Barros, L.F., Simas, A.S., Lapa, R., Mello-Silva, R., Stefanello, M.E., Zampronio, A.R., 2009. Antipyretic and anti inflammatory

- properties of the ethanolic extract, dichloromethane fraction and costunolide from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae). *Journal Ethnopharmacology* 124, 369-376.
- Kane, C.J., Menna, J.H., Sung, C.C., Yeh, Y.C., 1988. Methyl gallate, methyl-3,4,5-trihydroxybenzoate, is a potent and highly specific inhibitor of herpes simplex virus in vitro. II. Antiviral activity of methyl gallate and its derivatives. *Bioscience Reports* 8, 95-102.
- Kim, S.J., Jin, M., Lee, E., Moon, T.C., Quan, Z., Yang, J.H., Son, K.H., Kim, K.U., Son, J.K., Chang, H.W., 2006. Effects of methyl gallate on arachidonic acid metabolizing enzymes: Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase in mouse bone marrow-derived mast cells. *Archives of Pharmacal Research* 29, 874-878.
- Mustofa, M., Valentin, A., Benoit-Vical, F., Pelissier, Y., Kone-Bamba, D., Mallie, M. 2000. Antiplasmodial activity of plant extracts used in west African traditional medicine. *Journal Ethnopharmacology* 73, 145-151.
- Osabede, P.O., Okoye, F.B.C. 2003. Anti-inflammatory effects of crude methanolic extract and fractions of *Alchornea cordifolia* leaves. *Journal Ethnopharmacology* 89, 19-24.
- Rates, S. M. K. 2001. Plants as Source of Drugs. *Toxicon* 39, 603-613.
- Regasini, L.O, Velloso, J.C.R, Silva, D.H.S, Furlan, M., Oliveira, O.M.M, Khalil, N.M, Brunetti, I.L, Young, M.C.M, Barreiro, E.J, Bolzani, V.S. 2008. Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. *Phytochemistry* 69, 1739-1744.
- Sharma, J.N., Samud, A.M., Asmawi, M.Z. 2004. Comparison between plethysmometer and micrometer methods to measure acute paw oedema for screening anti-inflammatory activity in mice. *Inflammopharmacology* 12, 89-94.
- Setzer, W.N., Shen, X.M., Bates, R.B., Burns, J.R., McClure, K.J., Zhang, P., Moriarity, D.M., Lawton, R.O. 2000. A phytochemical investigation of *Alchornea latifolia*. *Fitoterapia* 71, 195.
- Tona, K., Kambu, K., Mesia, K., Cimanga, K., De Bruyne, T., Pieters, L., Totté, J., Vlietinck, A.J. 1999. Biological screening of traditional preparations from some medicinal plants used as antidiarrhoeal in Kinshasa, Congo. *Phytomedicine* 6, 59.

- Tona, L., Kambu, K., Ngimbi, N., Cimanga, K., Vlietinck A.J. 1998. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *Journal Ethnopharmacology* 61, 57-65.
- Urrea-Bulla, A., Suárez, M., Moreno-Murillo, B. 2004. Biological activity of phenolic compounds from *Alchornea glandulosa*. *Fitoterapia* 75, 392-394.
- Velo, G. P., Dunn, C.J., Giroud, J. P., Timsit, J., Willoughby, D. A. 1973. Distribution of prostaglandins in inflammatory exudate. *The Journal of Pathology* 111, 149–158.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP). Geneva, 2003. 72 p.

### ***Legends to figures***

Figure 1- Structure of alkaloid AG-1

Figure 2 – Effect of methanolic extract from *A. glandulosa* (MEAG) leaves at doses of 100 and 300 mg/Kg administered orally on carrageenan-induced paw edema in mice. Each column represents the mean of 6 animals and vertical lines show the S.E.M. A) at 30 minutes after carrageenan injection; B) at 60 minutes after carrageenan injection, C) at 120 minutes after carrageenan injection, and D) at 240 minutes after carrageenan injection. Asterisks denote the significance levels when compared with control values (carrageenan): \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

Figure 3 – Effect of *N*-1,*N*-2,*N*-3-triisopentenylguanidine (AG-1) at doses of 5 and 30 mg/Kg administered orally on carrageenan-induced paw edema in mice. Each column represents the mean of 6 animals and vertical lines show the S.E.M. A) at 30 minutes after carrageenan injection; B) at 60 minutes after carrageenan injection, C) at 120 minutes after carrageenan injection, and D) at 240 minutes after carrageenan injection.



Asterisks denote the significance levels when compared with control values (carrageenan): \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

Figure 4 - Effect of methanolic extract from *A. glandulosa* (MEAG) leaves and *N*-1,*N*-2,*N*-3-triisopentenylguanidine (AG-1) on carrageenan-induced increase in myeloperoxidase (MPO) activity in mice. Animal received the oral treatment with MEAG (100 and 300 mg/kg, p.o.), AG-1 (5 and 30 mg/kg) and dexamethasone (DEX – 1 mg/kg, s.c) or vehicle and after 1h, an intraplantar injection of carrageenan (300 µg/paw) was performed. In (A), columns show the effect of MEAG and DEX in increasing of MPO activity (m OD) induced by carrageenan injection after 6 hs. In (B), the inhibition induced by compound in increasing of myeloperoxidase (MPO) activity induced by local injection of carrageenan. The bars express the mean±SEM of 5 animals, compared with vehicle (V) vs treated group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls.

Figure 5 – Effects of methanolic extract from *A. glandulosa* (MEAG) leaves (A) and *N*-1,*N*-2,*N*-3-triisopentenylguanidine (AG-1) on total leukocytes (B) induced by carrageenan in the pleural cavity of mice. Animal received the oral treatment with MEAG (100 and 300 mg/kg) or AG-1 (5 and 30 mg/kg), or vehicle, and after 1 h they received an intrapleural injection of Cg (100 ul of a 1% solution/cavity). Control animals received only the vehicles. The bars express the mean ± SEM of 5 animals, compared with vehicle (V) vs treated group. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls.

Figure 6 – Effect of methanolic extract from *A. glandulosa* (MEAG) leaves at doses of 1 mg/ear administered topically on croton oil -induced ear edema in mice. Each column represents the mean of 6 animals and vertical lines show the S.E.M. A) at 4 hs after croton oil application; B) at 6 hs after croton oil application. Asterisks denote the significance levels when compared with control values (croton oil): \*\*\* $P < 0.001$ .

### Figures

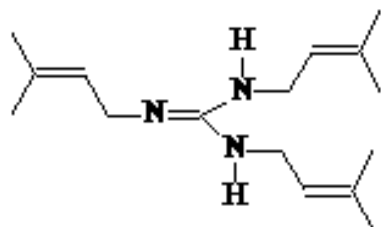


Fig. 1

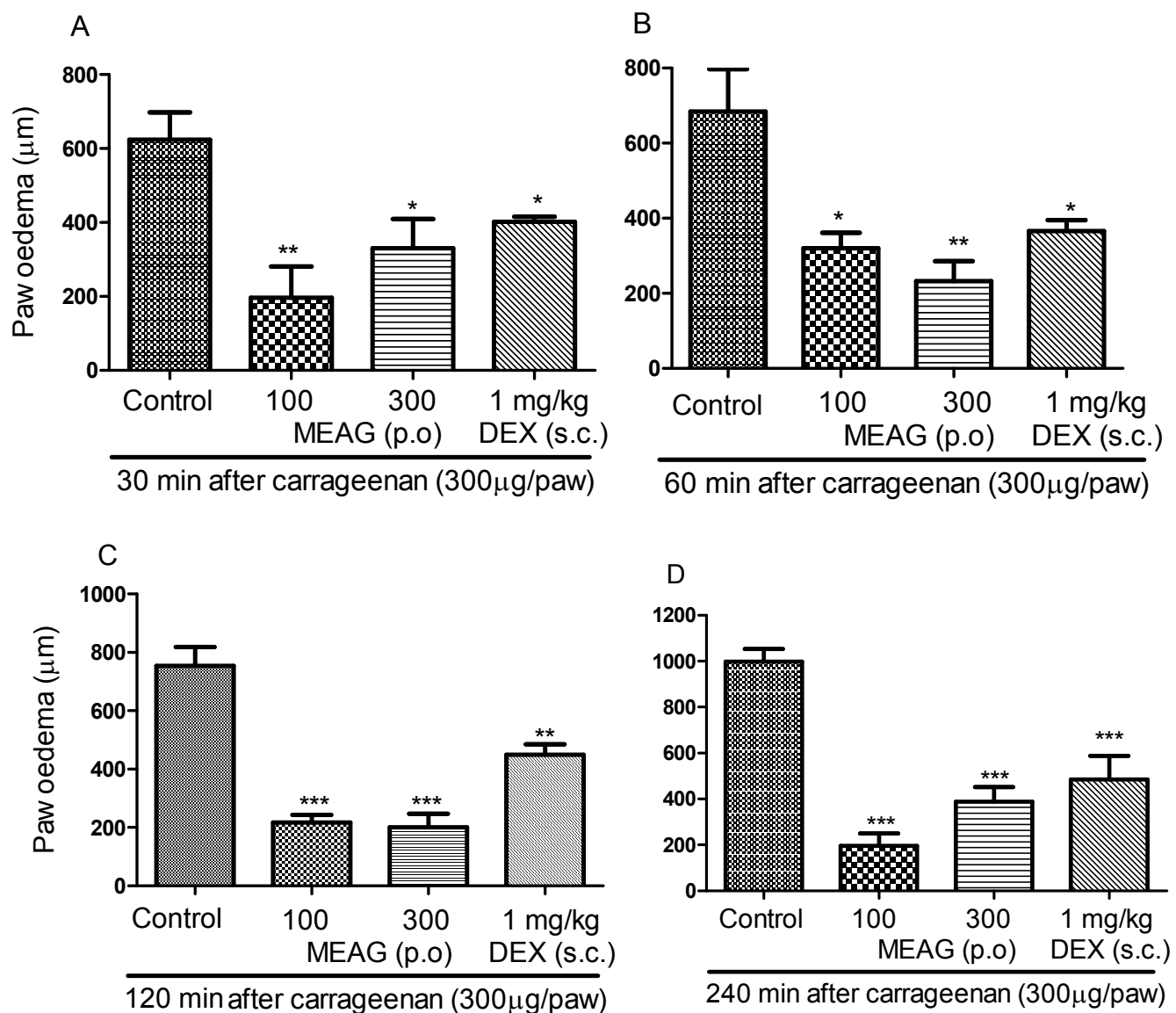


Fig. 2

Formagio-Neto *et al.*, 2013

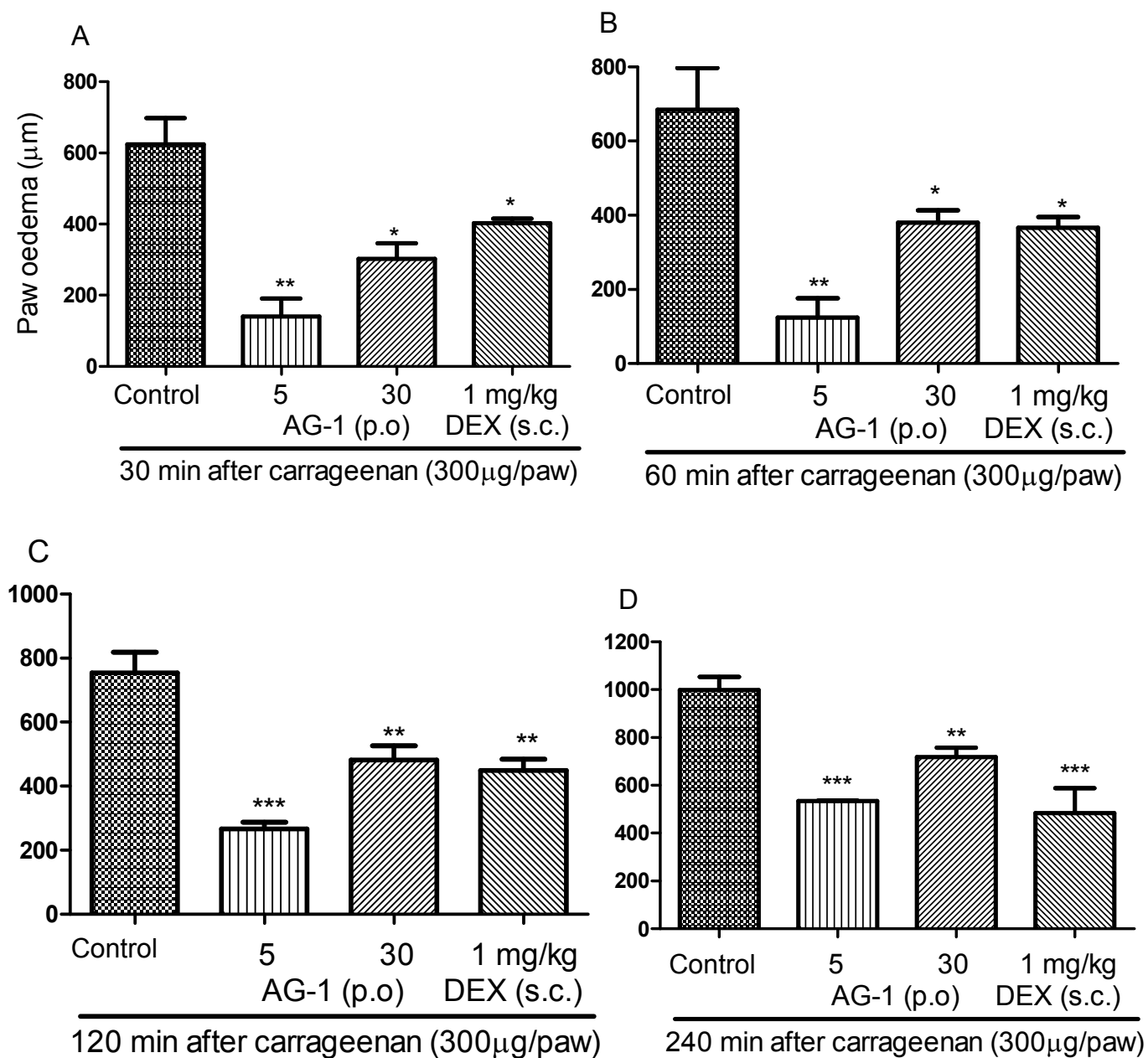


Fig. 3

Formagio-Neto *et al.*, 2013

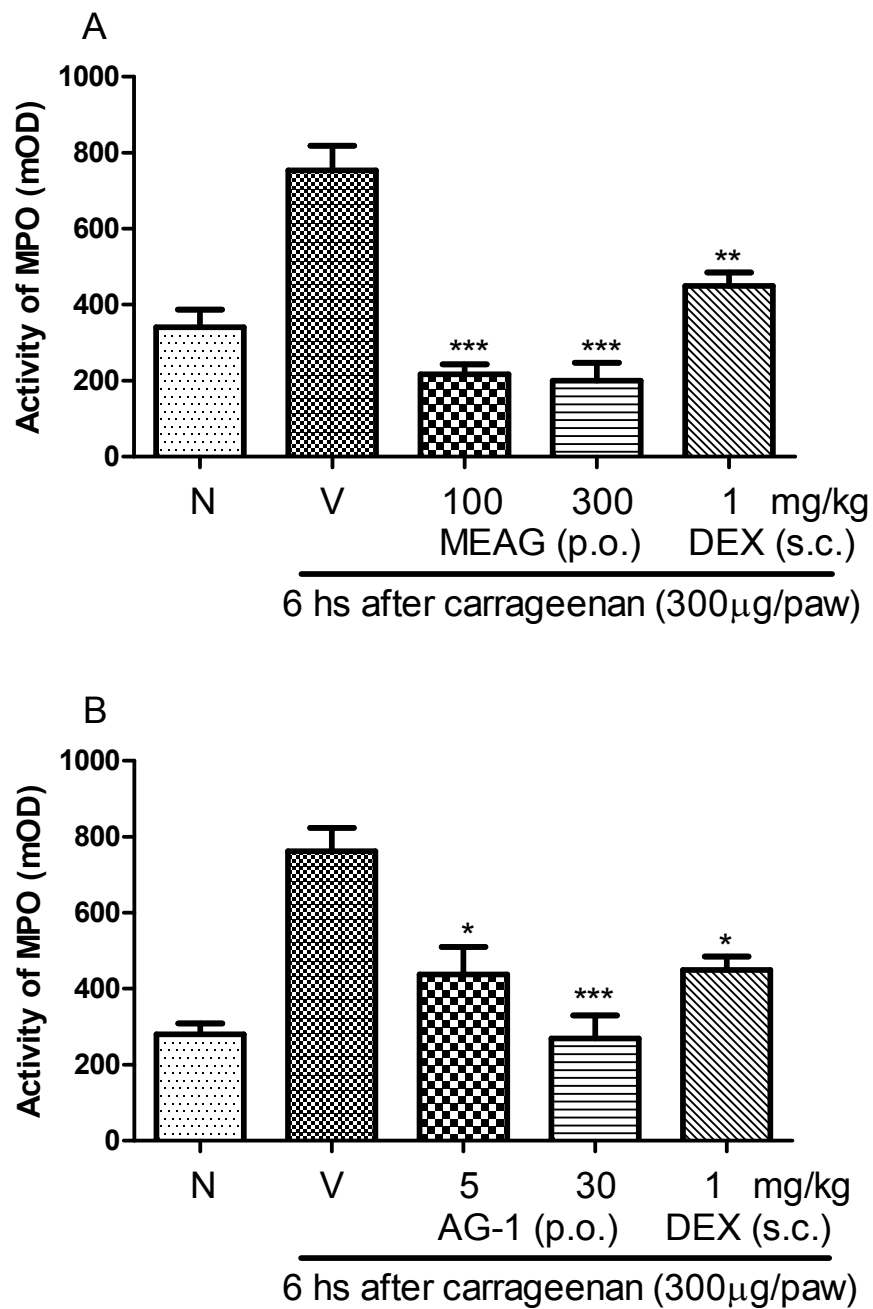


Fig. 4

Formagio-Neto *et al.*, 2013

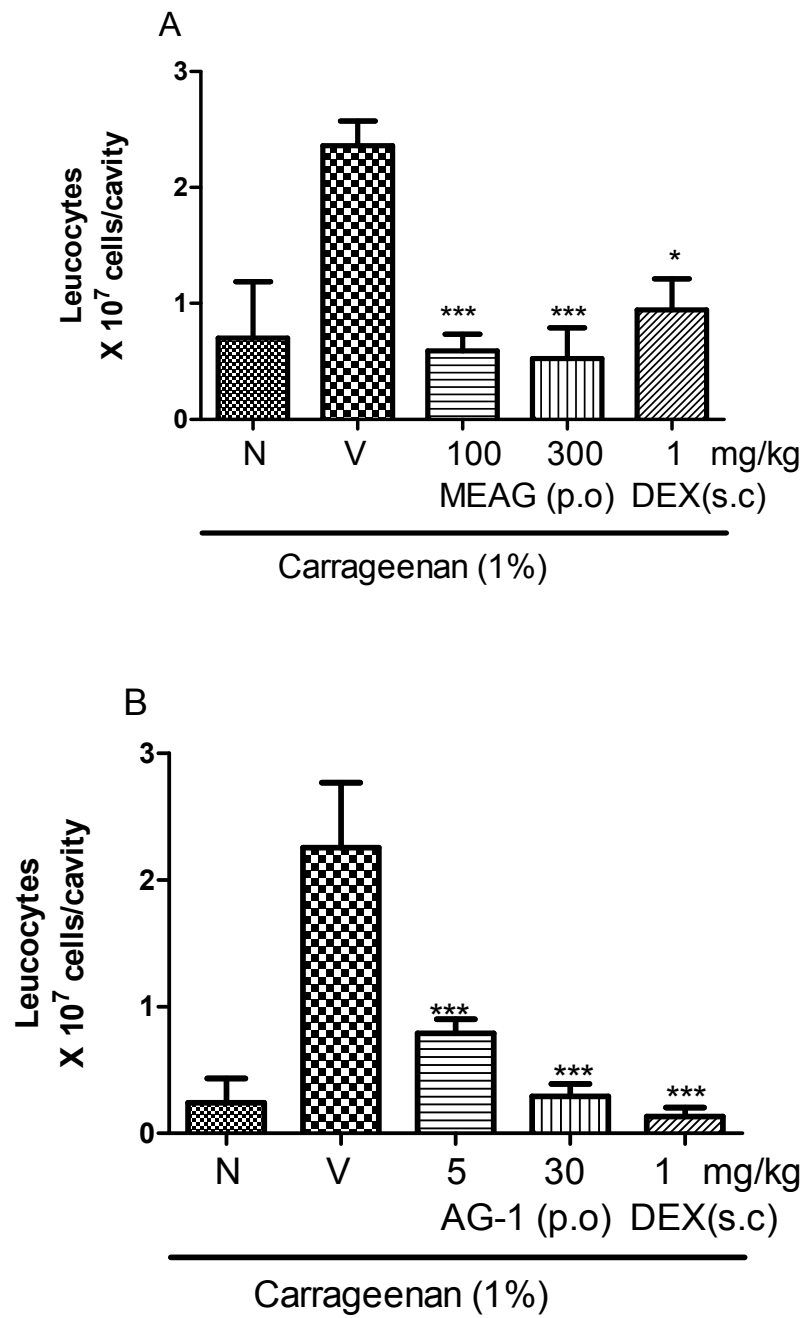


Fig. 5

Formagio-Neto *et al.*, 2013

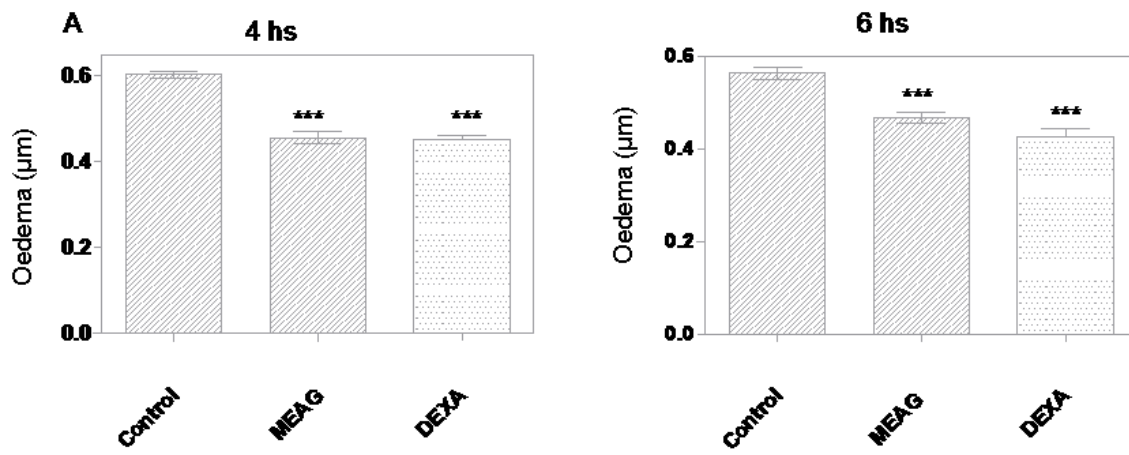


Fig. 6

Formagio-Neto *et al.*, 2013

## 5.2. Artigo científico – BMC

Formagio et al. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2013, **13**:14  
<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/13/14>



### RESEARCH ARTICLE

### Open Access

# The flavonoid content and antiproliferative, hypoglycaemic, anti-inflammatory and free radical scavenging activities of *Annona dioica* St. Hill

Anelise S N Formagio<sup>1\*</sup>, Candida A L Kassuya<sup>2</sup>, Frederico Formagio Neto<sup>2</sup>, Carla R F Volobuff<sup>3</sup>, Edna K K Iriguchi<sup>2</sup>, Maria do C Vieira<sup>1</sup> and Mary Ann Foglio<sup>4</sup>

#### Abstract

**Background:** *Annona dioica* St. Hill (Annonaceae) is a Brazilian plant used in folk medicine for the treatment of several types of rheumatism and diarrhoea. The focus of this work was to evaluate the *in vitro* antiproliferative and antioxidant activity and the *in vivo* hypoglycaemic and anti-inflammatory activity of *A. dioica* and identify the principal constituents of this plant.

**Methods:** The crude methanol extract (EAD) and hexane (HF), chloroform (CF), ethyl acetate (EAF) and hydromethanol fractions (HMF) were evaluated for free radical scavenging activity using the DPPH assay. The EAD and EAF were assayed for hypoglycaemic activity in rats. The EAD was tested in an antiproliferation assay and for anti-inflammatory effects in paw oedema, in addition to myeloperoxidase activity induced by carrageenan (Cg) in mice. The EAF was assayed using chromatographic methods.

**Results:** The fractionation of the EAF through chromatographic methods identified derivatives of the flavonoids quercetin and kaempferol. Among all the tested fractions, the ethyl acetate and hydromethanol fractions were the most potent, exhibiting an IC<sub>50</sub> of 8.53 and 10.57 µg/mL, respectively, which is comparable to that of the commercial antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT). The oral administration of the EAD (100 mg/kg) and EAF (15 mg/kg) inhibited the increase of glucose levels, resulting in a hypoglycaemic effect. The EAD (30 to 300 mg/kg) exhibited an anti-oedematogenic effect in Cg-induced paw oedema in a time- and dose-dependent manner. The results showed a reduction of MPO activity by *A. dioica* 6 h after the induction of paw oedema at all doses tested with maximal inhibition at 300 mg/kg.

**Conclusions:** Our results reveal for the first time that compounds contained in the *A. dioica* leaves exert anti-inflammatory, hypoglycaemic, antiproliferative, and antioxidant effects. The antioxidant activity may be associated with the presence of flavonoids.

**Keywords:** *Annona dioica*, Flavonoids, Antioxidant, Hypoglycaemic, Antiproliferative, Anti-inflammatory

#### Background

Plants have been used as a source of new medicinal compounds throughout history and continue to serve as the basis for many of the pharmaceuticals used today [1]. Standard experimental scientific methods are useful for the validation of ethnopharmacological knowledge regarding herbal medicine.

*Annona dioica* St. Hill. (Annonaceae) is a shrub found in Brazil throughout the states of São Paulo, Minas Gerais, Paraná and Mato Grosso. It is commonly referred to as “ceraticum”, “arixicum” and “ariticum”. In Brazil, the fruits and leaves of this plant are used to treat rheumatism, and the seeds are used to treat diarrhoea [2]. In Paraguay, the leaves are used to make tea or are gargled as an anti-catarrhal, while the edible fruits possess sedative properties. The seeds are used as insecticides or in the treatment of parasitic infections of the skin [3]. Chemical studies of the wood of *A. dioica* resulted in

\* Correspondence: [aneliseformagio@ufgd.edu.br](mailto:aneliseformagio@ufgd.edu.br)

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

